



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

**FACULTAD DE MEDICINA- ESCUELA DE GRADUADOS - UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
PROGRAMA PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
TESIS DE DOCTORADO**

**EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE UN CANAL CATIÓNICO
INMUNOREGULADOR POR UN NITROALQUENO DERIVADO
DEL SALICILATO EN LA SOBREVIDA DE TRASPLANTES**

Lic. Germán Galliussi

*Laboratorio de Síntesis Orgánica y Desarrollo de Fármacos, Institut Pasteur de Montevideo
Laboratorio de Inmunoregulación e Inflamación, Institut Pasteur de Montevideo*

ANII

cap

COMISIÓN
ACADEMICA
DE POSGRADO

eelo
PHARMA

CRTI
UMR 1064
Centre de Recherche en
Transplantation et Immunologie



Programa para la Investigación Biomédica



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



COMISIÓN
ACADEMICA
DE POSGRADO



FACULTAD DE MEDICINA - ESCUELA DE GRADUADOS - UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
PROGRAMA PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
TESIS DE DOCTORADO

EFFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE UN CANAL CATIÓNICO INMUNOREGULADOR POR UN NITROALQUENO DERIVADO DEL SALICILATO EN LA SOBREVIDA DE TRASPLANTES

Estudiante: Germán Galliussi

Directora Académica: Mercedes Segovia, MD, PhD.

Laboratorios

- *Laboratorio de Inmunoregulación e Inflamación, Institut Pasteur de Montevideo*
- *Laboratorio de Síntesis Orgánica y Desarrollo de Fármacos, Institut Pasteur de Montevideo*

Tribunal

- Ana María Ferreira, PhD.
- Mariana Seija, MD, PhD.
- Adriana Tiscornia, MD, PhD.

ÍNDICE

RESUMEN DE LA TESIS.....	5
INTRODUCCIÓN	7
Trasplantes: Características generales	8
Bases y mecanismos inmunológicos de la respuesta inmune frente al alotrasplante ..	10
Reconocimiento de aloantígenos.....	10
Modelo de alotrasplante de piel murino en contexto de antígenos menores	12
Activación de linfocitos T en la alorespuesta	14
Regulación y mecanismos de tolerancia en el contexto del alotrasplante	15
Terapias de uso clínico para disminuir el rechazo de los trasplantes	20
Clasificación y mecanismos de acción de las drogas inmunosupresoras	21
Anticuerpos depletantes.....	22
TMEM176B como regulador de la respuesta inmune.	27
Compuestos con el grupo funcional nitroalqueno como potentes fármacos antiinflamatorios no convencionales.	31
Desarrollo de nitroalquenos de segunda y tercera generación.....	34
Hemoxigenasa-1 cumple funciones inmunomoduladoras en trasplantes.....	43
HIPÓTESIS.....	52
OBJETIVOS.....	54
Objetivo general	55
Objetivos específicos	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
Animales	57
Cultivo de células dendríticas derivadas de médula ósea.....	57
Modelos animales de trasplante y tratamientos	58
Western blot.....	58
Expresión génica de HO-1 por qPCR.....	59
Análisis proteómico por espectrometría de masa.	60
Marcación y análisis por citometría de flujo	61
Reacción linfocitaria mixta (MLR).....	62
Ensayo de proliferación de linfocitos T APC-free	62

Ensayo de maduración de BMDC	62
Ensayos de activación e inhibición de Akt y MAPKs.....	63
Actividad TMEM176B <i>in vitro</i>	63
Ánálisis estadísticos	64
RESULTADOS	65
SANA prolonga la sobrevida de alotrasplantes.	66
La actividad iónica de TMEM176B es activada por SANA	68
El efecto de SANA observado en trasplantes es dependiente de Tmem176b.....	70
La sobrevida del aloinjerto de piel en contexto de antígenos menores no es prolongada por inhibir la actividad del inflamasoma NLRP3.....	71
SANA induce <i>in vitro</i> la expresión de HO-1 en macrófagos y células dendríticas.....	72
SANA induce la expresión de HO-1 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> en células dendríticas de manera parcialmente dependiente de Tmem176b.....	74
La regulación de la expresión de HO-1 a través de TMEM176B activado por SANA tiene como intermediario un mecanismo dependiente de Akt.	76
SANA modula la maduración de células dendríticas.....	78
SANA inhibe la proliferación de linfocitos T <i>in vitro</i>	81
El efecto inhibitorio de proliferación de linfocitos T es dependiente de HO-1 en el MLR	83
SANA prolonga la sobrevida y promueve a los linfocitos Tregs en el injerto de manera dependiente de HO-1.....	84
La combinación de SANA con un inmunosupresor específico mejora los efectos en la aceptación de trasplantes.	88
DISCUSIÓN	92
CONCLUSIONES	104
PERSPECTIVAS	106
AGRADECIMIENTOS.....	109
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	112
ANEXO.....	142
Anexo 1: Artículo publicado relacionado a esta tesis	143
Anexo 2: Tablas de listas de proteínas del análisis proteómico de macrófagos THP-1 tratados con SANA (Figura 2.7A)	155

RESUMEN DE LA TESIS

RESUMEN DE LA TESIS

Los trasplantes de órganos y tejidos representan la solución definitiva cuando se produce un fallo funcional. Sin embargo, la baja disponibilidad de donantes, el rechazo crónico y los efectos secundarios relacionados con las altas dosis de inmunosupresores son un problema no resuelto en medicina, siendo un principal desafío el desarrollo de estrategias terapéuticas que prevengan el rechazo crónico y promuevan tolerancia a largo plazo. Los nitroalquenos, son compuestos con importantes propiedades antiinflamatorias, entre las cuales se ha descrito que inducen a Hemoxigenasa-1, además de que también activan canales iónicos. Como parte de estas moléculas, se ha sintetizado en nuestro laboratorio al ácido 5-(2-nitroetenil) salicílico (SANA), un nitroalqueno derivado del salicilato, el cual completó con éxito un ensayo clínico de Fase-I a/b para enfermedades relacionadas al metabolismo y la obesidad. Se ha estudiado por un lado que la inducción de Hemoxigenasa-1 promueve efectos inmunomoduladores en trasplantes, y por otro, estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el canal catiónico TMEM176B aparece como un actor inmunoregulador en el contexto del alotrasplante. Este canal también ejerce un papel inmunoregulador en otros contextos patológicos, como por ejemplo su inhibición farmacológica o delección genética promueve una respuesta inmunitaria antitumoral. Con estos antecedentes, el objetivo de esta tesis fue el estudio del SANA como modulador de la alorespuesta y sus mecanismos de acción. Se realizaron experimentos en modelos animales de trasplante, donde el principal modelo que utilizamos consistió en un alotrasplante de piel en contexto de antígenos menores (se injerta piel de macho a hembra) donde los ratones WT o *Tmem176b*^{-/-} fueron tratados diariamente con SANA desde el día -1 antes del trasplante hasta el día 15 después de la cirugía. Se analizó la sobrevida del injerto y el infiltrado de células del sistema inmunológico en el injerto de piel y los ganglios linfáticos drenantes. Los resultados confirmaron que el SANA prolonga la sobrevida de alotrasplantes y es un activador del canal iónico TMEM176B. Además, muestran que SANA prolonga la sobrevida del aloinjerto de manera dependiente de TMEM176B, mostrando un mecanismo donde la activación de TMEM176B por SANA aumenta la expresión de Hemoxigenasa-1 (HO-1) en células dendríticas tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo dependiente de la fosforilación de AKT. En injertos de piel de ratones tratados con SANA, se ha observado un incremento de células T reguladoras (Tregs) CD4⁺ FoxP3⁺ dependiente de HO-1, además que la combinación de SANA con el anti-CD3 (Fab) (anticuerpo inmunosupresor) potencia el efecto *in vivo* a nivel de la sobrevida e incremento de Tregs en el aloinjerto. En suma, la activación farmacológica de TMEM176B con SANA promueve la inducción de HO-1 que modula la alorespuesta y prolonga la sobrevida del injerto.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Trasplantes: Características generales

Los trasplantes de órganos y tejidos son procedimientos muy aplicados en la clínica cuando un paciente presenta una falla orgánica funcional irreversible. En la actualidad, más allá de los avances científicos que se están realizando en búsqueda de otras soluciones, el trasplante continúa siendo la solución definitiva. Para ello, es necesario encontrar un donante compatible para realizar la intervención. Los trasplantes consisten en un procedimiento quirúrgico en el cual se extrae del donante el órgano/tejido a trasplantar, implantándolo en el individuo receptor. Dependiendo del tipo de órgano a trasplantar, el donante puede ser un individuo vivo (ejemplo: trasplante renal) o no vivo cuando el órgano es imprescindible para las funciones vitales (ejemplo: trasplante de corazón).

El éxito del trasplante depende de muchas variables, destacando en lo biológico la compatibilidad entre donante y receptor, y el manejo de las complicaciones post trasplante (1).

Los trasplantes para el tratamiento de enfermedades humanas han ido aumentando durante los últimos 60 años, siendo el trasplante de células hematopoyéticas, riñón, hígado y corazón los más comunes que se realizan en la práctica clínica (2–5). Otros trasplantes como el de pulmón y páncreas, si bien son más complejos, se han vuelto más frecuentes (6–9). Si bien aún se encuentran en fase de estudio, algunos centros de salud ya están realizando trasplantes de mano y cara (10), además que se está avanzando en la realización de trasplantes de otros órganos y tejidos. En relación a esto, recientemente se han realizado trasplantes de corazón que utilizaron como donantes cerdos modificados genéticamente, con el objetivo de atender la problemática de la disponibilidad de donantes llevando lo que sería un xenotrasplante hacia algo con mayor similitud a un alotrasplante (11,12). Las terapias basadas en células madre también son una estrategia que se está investigando para afrontar este problema, donde se ha publicado recientemente un estudio en pacientes con diabetes tipo I, mostrando resultados favorables en la restitución de la funcionalidad de los islotes pancreáticos (13).

Como referencia de la dimensión que tienen estos procedimientos, solo en Estados Unidos se realizan actualmente 40.000 trasplantes de riñón, corazón, pulmón, páncreas e intestino por año (12 trasplantes/100.000 habitantes) datos de United Network for Organ Sharing; <https://unos.org/data/transplant>) y según datos del Observatorio Global de Donación y Trasplante (sigla en inglés, GDOT: <http://www.transplant->

observatory.org/export-database/). En Uruguay se trasplantaron durante el año 2024 a 170 pacientes (5 trasplantes/100.000 habitantes), siendo el trasplante renal el más realizado (138 pacientes). En nuestro país, toda la información sobre trasplantes y la coordinación con los distintos centros asistenciales es organizada en el Instituto Nacional de Donación y Trasplante (INDT), ubicado en el Hospital de Clínicas Dr. Manuel Quintela (<https://www.indt.gub.uy/>).

Los trasplantes son categorizados de acuerdo a la variabilidad genética que existe entre donante y receptor, lo que determina la compatibilidad entre ambos (14). De esta manera, los tipos de trasplantes pueden ser:

- **Autotrasplante:** El tejido se extrae y se implanta en el mismo individuo. La probabilidad de rechazo es prácticamente nula (Ejemplo: injertos de piel)
- **Singénico:** Donante y receptor son individuos distintos, pero de la misma especie e idénticos genéticamente. En la especie humana, este caso aplica únicamente a hermanos gemelos idénticos. La probabilidad de rechazo es casi nula.
- **Alogénico:** Donante y receptor son de la misma especie, pero distintos genéticamente. La probabilidad de rechazo es alta.
- **Xenogénico:** Donante y receptor son de diferente especie. La probabilidad de rechazo es muy alta.

En humanos, la situación más frecuente es la realización de trasplantes de órganos sólidos alogénicos, debido a que en general es de un individuo a otro que tienen polimorfismos genéticos, volviendo al injerto susceptible de ser rechazado. Por este motivo, es importante determinar la compatibilidad entre el donante y el receptor, para la cual existen pautas bien establecidas (que no desarrollaremos debido a que no es el foco de este trabajo).

Dada la complejidad de disponibilidad de donantes y las extensas listas de espera, varios países en el mundo han implantado medidas políticas para paliar esta problemática (15). Sin embargo, los trasplantes continúan siendo un desafío para la medicina, debido a que luego de conseguir donante y hacer la intervención, la etapa postrasplante tiene sus complicaciones propias desde un punto de vista biológico y terapéutico. A los efectos de esta tesis de doctorado, me interesa resaltar que el rechazo de los trasplantes es un problema principal debido a que afecta a la calidad de vida del paciente y su entorno, además de generar altos costos al sistema de salud.

Se definen distintos tipos de rechazo de un órgano/tejido de acuerdo con el tiempo en que ocurre luego del trasplante y el tipo de respuesta inmune involucrada (16):

- **Rechazo Hiperagudo:** Sigue en cuestión de minutos inmediatos al trasplante, explicado entre otras posibles causas durante el procedimiento, por la presencia de anticuerpos e inmunidad prestablecida en el receptor que desencadena una respuesta inmediata contra el injerto (Ejemplo: incompatibilidad de grupos sanguíneos ABO).
- **Rechazo agudo:** Sigue en el orden de días y meses posteriores al trasplante y se debe, principalmente, a la generación de una respuesta inmune del receptor contra el injerto, a causa de la incompatibilidad genética entre donante y

receptor. Dicha respuesta es desencadenada por aloantígenos expresados en el órgano proveniente del donante.

- **Rechazo crónico:** Ocurre bastante tiempo después del trasplante en el orden de años. Consiste en una respuesta inmune a bajo grado que implica una lenta y progresiva pérdida de funcionalidad del órgano transplantado, hasta que finalmente pierde completamente su función y viabilidad.

Los rechazos agudos e hiperagudos (los cuales no serán objeto de desarrollo en este trabajo), se pueden evitar mediante estudios previos de compatibilidad donante-receptor y con tratamientos postrasplante basados en drogas inmunosupresoras, en las cuales se profundizará más adelante. El manejo terapéutico que evite el rechazo crónico de los trasplantes continúa siendo una necesidad médica insatisfecha.

En ese sentido, es importante profundizar en el conocimiento de las vías celulares y moleculares implicadas en el rechazo del injerto, en parte porque es necesario encontrar nuevas dianas terapéuticas para eventualmente desarrollar estrategias para su modulación farmacológica. Este trabajo se enmarca en ese concepto, por lo que a continuación describiremos los mecanismos inmunológicos principales de la alorespuesta.

Bases y mecanismos inmunológicos de la respuesta inmune frente al alotrasplante

De una manera global se podría decir que la respuesta inmunológica que media el rechazo de trasplantes es similar a la que ocurre con infecciones de microorganismos patógenos, debido a que se reconocen antígenos extraños (o no propios). Si bien la inmunidad innata y adaptativa juegan un papel fundamental en el rechazo de órganos, nos focalizaremos en la respuesta adaptativa debido a que es la que toma relevancia en nuestro trabajo.

Reconocimiento de aloantígenos

Un paso crítico para desencadenar la respuesta del sistema inmune del receptor (alorespuesta), es el reconocimiento del antígeno proveniente del donante (aloantígeno) por el sistema inmune adaptativo del receptor. Se reconocen tres tipos de mecanismos de reconocimiento de aloantígenos por los linfocitos T aloreactivos del receptor: aloreconocimiento *Directo, indirecto y semidirecto* (17,18) (Figura 1.1).

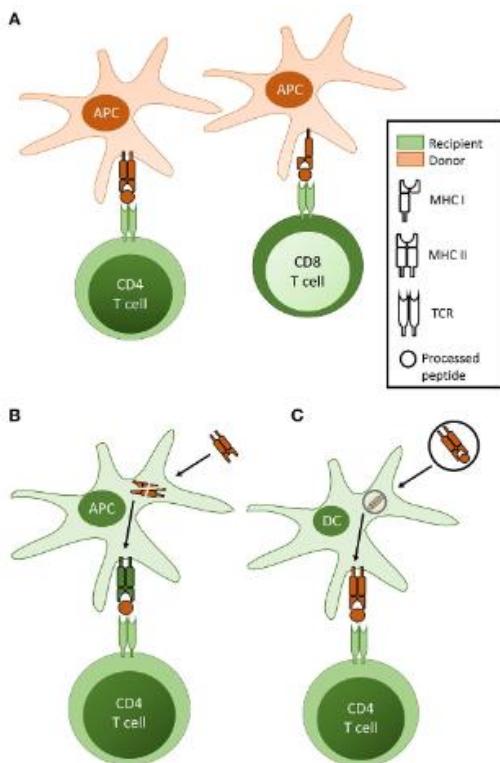


Figura 1.1. Mecanismos de reconocimiento de aloantígenos. A) Reconocimiento directo: linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ reconocen moléculas de MHC-II/I en células presentadoras de antígenos (del inglés APC) provenientes del donante. B) Reconocimiento indirecto: los aloantígenos provenientes del donante, incluyendo a las propias moléculas MHC-II, son procesados por APCs del receptor y se presentan sus péptidos en moléculas de MHC-II propias para ser reconocidos por las células T. C) Reconocimiento semidirecto: Las células dendríticas del donante pueden transferir aloantígenos por diferentes mecanismos (vesículas, contacto célula-célula) a una célula dendrítica del receptor para que esta lo presente y sea reconocido por células T. Tomado de Siu 2018 *Frontier Immun.*

En el mecanismo de reconocimiento directo, los linfocitos T del receptor reconocen aloantígenos presentados por leucocitos del donante. Estos leucocitos como por ejemplo las células dendríticas, son capaces de migrar a través de la linfa hacia ganglios regionales cercanos al sitio del trasplante (1,19). Este fenómeno ocurre en etapas tempranas postrasplante y puede iniciar una respuesta inmune inflamatoria que lleva rápidamente a un rechazo agudo (20). A diferencia de la respuesta convencional, se ha visto que hay una alta frecuencia (entre 1 y 10%) de células T que pueden reconocer aloantígenos en forma directa (21–24). El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) es el principal aloantígeno que puede ser reconocido por los linfocitos T y desencadenar una respuesta inmune deletérea hacia el tejido transplantado. En el caso del reconocimiento directo, las células T del receptor reconocen MHC extraño proveniente del donante sin haber tenido ningún tipo de procesamiento. La explicación de que linfocitos T puedan reconocer un MHC extraño sin procesar es compleja y puede ser variada. La alta frecuencia de células T mencionada anteriormente puede ser una de las posibles explicaciones, donde las moléculas de MHC extraño (sin importar con que péptido esté acomplejado) no estaban presentes en el proceso de selección negativa en el receptor (25), dando lugar a un alto repertorio que pueda reconocerlas (23,26). Otra explicación puede ser el mimetismo molecular, siendo el alopéptido el que toma un papel protagónico, haciendo que el complejo péptido-MHC se parezca mucho a un complejo péptido extraño-MHC propio (27–29), mecanismo propuesto también en el contexto de autoinmunidad. El aloreconocimiento directo puede llevar a activar células T CD4⁺ y CD8⁺ (Figura 1.1A).

El reconocimiento indirecto consiste en que aloantígenos provenientes del donante como el MHC, pueden ser procesados por células presentadoras (APC) del receptor y presentarse como péptidos en MHC de clase II del receptor, desencadenando la activación de células T CD4⁺ (30). Si bien se conoce que mediante este mecanismo indirecto se activan T CD4⁺, algunos estudios muestran que también pueden activarse células T CD8⁺ mediante presentación cruzada de péptidos derivados del donante presentados en MHC de clase I por APCs del receptor (31). *Este mecanismo de reconocimiento de aloantígenos está asociado a una respuesta más prolongada, la cual se ha asociado al rechazo crónico (32).* Por otro lado, se lo asocia a respuestas desencadenadas por antígenos menores (mH) que usualmente son péptidos derivados de proteínas que muestran cierto grado de polimorfismo (33) (Figura 1.1 B).

Además del reconocimiento directo e indirecto de aloantígenos existe un mecanismo de reconocimiento semidirecto. Los leucocitos tienen la capacidad de intercambiar moléculas como ARN y proteínas mediante contacto célula-célula, liberación de vesículas endosomales y/o mediante nanotubos intercelulares (34–36). En trasplantes de órganos sólidos y médula ósea se transfieren moléculas de MHC de clase I y II entre células dendríticas de donante y receptor (36–38), adquiriendo las células proteínas de MHC alogénicas que activan a los linfocitos T (39–41). Si bien hay evidencias experimentales *in vitro* que sostienen esta transferencia de aloantígenos entre células, aún no están claros los mecanismos específicos de este reconocimiento y cómo esto incide en el rechazo (Figura 1.1 C).

Se ha mencionado que las moléculas de MHC son los antígenos más importantes en la respuesta inmune a trasplantes, pero además existe una variedad de proteínas llamadas antígenos menores, las cuales son capaces de desencadenar respuestas de rechazo y activar linfocitos T aloreactivos (33,42–44). Existen tres tipos de antígenos menores de acuerdo al sitio del que derivan: 1) antígenos menores derivados de variantes alélicas de proteínas polimórficas, 2) codificados por genes localizados en el cromosoma Y (importante en modelos de antígenos menores de acuerdo al sexo) y 3) proteínas ausentes en el receptor, pero no en el donante (45). Muchos péptidos derivados de este tipo de proteínas mencionadas pueden ser reconocidos por linfocitos T aloreactivos CD4⁺ y CD8⁺ del receptor, pudiendo ser procesadas previamente por APCs del donante y/o receptor para su presentación en forma directa o indirecta (46–49).

Teniendo en cuenta la forma en que se reconocen los aloantígenos y cómo repercute esto en la sobrevida de los trasplantes, a continuación, desarrollaremos el modelo experimental de trasplantes que utilizaremos durante nuestros estudios doctorales.

Modelo de alotrasplante de piel murino en contexto de antígenos menores

En este trabajo se utilizará como modelo experimental de estudio el alotrasplante de piel en ratones. Para nuestros estudios realizaremos trasplante de piel en contexto de antígenos menores, el cual representa y se aproxima a la situación de un trasplante alogénico HLA idéntico en humanos, donde se logra encontrar un donante con alta compatibilidad de antígenos mayores (HLA) pero la alorespuesta y el rechazo puede

suscitarse por los antígenos menores (33,44). Por otro lado, este modelo tiene la ventaja técnica de ser una cirugía sencilla y se pueden estudiar diferentes tipos de compatibilidad dependiendo de las características genéticas de los ratones donantes y receptores que se utilicen.

El trasplante de piel con incompatibilidad de antígenos menores realizado en este trabajo utiliza ratones de la cepa C57BL/6, donde el sexo del donante es macho y el receptor es hembra.

El modelo murino de alotrasplante de piel utilizado en este trabajo, consiste técnicamente en colectar piel de la cola del donante macho e implantarla mediante sutura quirúrgica en la región subescapular de la hembra receptora. Debido a que donante y receptor son de la misma cepa (C57BL/6), los antígenos mayores aportados por las moléculas de MHC son altamente compatibles, no así los antígenos menores dado que donante y receptor son de sexo diferente, desencadenándose la respuesta alogénica por antígenos derivados del donante macho (H-Y), estableciéndose un contexto de incompatibilidad menor.

Estos antígenos menores H-Y del ratón macho, consisten en péptidos derivados de proteínas codificadas por los genes del cromosoma Y, a las cuales el sistema inmune dirigirá la respuesta. La expresión de estos es ubicua y pueden encontrarse en diversos tejidos como la piel, testículos, pulmón, riñón, páncreas, hígado, cerebro y timo (50). Se expresan en la superficie celular formando complejos con las moléculas de MHC de clase I y II, pudiendo ser reconocidos por los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺, respectivamente (46). En los ratones, la magnitud de la respuesta inmune contra los antígenos del macho varía, dependiendo del haplotipo del MHC. El antígeno H2^b presente en la cepa C57BL/6 desencadena una respuesta especialmente fuerte, particularmente por parte de los linfocitos T CD8 y restringidas al locus D^b, siendo los epítopenos H2D^b Uty y Smcy los que desencadenan las respuestas más fuertes. El gen *uty* codifica el epítopeno WMHHNMLDI o Uty, mientras en humanos, el péptido UTY corresponde al péptido homólogo asociado a las moléculas HLA-B60 y HLA-B8 (MHC-I). El péptido KCSRNRQYL o Smcy está contenido en una proteína codificada por el gen *smcy*, donde en humanos su péptido homólogo se asocia con las moléculas HLA-A2 y HLA-B7 (MHC-I) (46).

En los modelos de aloinjerto de piel murina, la respuesta H2D^b está bien caracterizada y se ha demostrado que, sin mediar ningún tratamiento, las hembras rechazan la piel del macho, aproximadamente 25 días después del injerto. Si se añade un segundo injerto, el rechazo ocurre, en promedio, 15 días después (47,51). La respuesta T CD8 específica del antígeno es máxima alrededor de dos semanas postrasplante y sería la responsable del rechazo, aunque es necesaria la intervención de los linfocitos T CD4 cooperadores (47,52).

Los linfocitos T son el componente celular crítico en la alorespuesta (53) y cuando estos reconocen a los aloantígenos, se activan, proliferan y se diferencian para cumplir funciones efectoras contra el órgano transplantado (54–57). Este proceso es similar al que ocurre en las respuestas inmunes descritas frente a patógenos microbianos.

Activación de linfocitos T en la alorespuesta

De manera global, la activación de los linfocitos T requiere que ocurran tres señales: el reconocimiento de aloantígenos a través de la unión del complejo MHC-péptido de las APCs y el TCR (Señal 1); una señal de coestimulación (Señal 2) y la producción de citoquinas (señal 3).

En el caso del alotrasplante, la señal 1, , puede ocurrir a través de los mecanismos de aloreconocimiento explicados anteriormente. Muchos órganos contienen APCs residentes como células dendríticas que al ser trasplantados pueden llevarlas consigo y luego en el hospedero logran migrar hacia el ganglio, presentando moléculas de MHC de clase I y II a linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ respectivamente (reconocimiento directo). Por otro lado, APCs del receptor pueden migrar hacia el tejido transplantado y captar aloantígenos que serán procesados y presentados, transportándolos nuevamente al ganglio drenante para que sean reconocidos por las células T (reconocimiento indirecto). Una vez que los linfocitos T reconocen a los aloantígenos, pueden activarse, permitiendo que estos proliferen y desencadenen una respuesta que finaliza con el rechazo del órgano transplantado (54-57). Las células T vírgenes CD4⁺ y CD8⁺ al activarse pueden diferenciarse a T cooperadoras o citotóxicas respectivamente. Además, la señal 2 de coestimulación es necesaria e importante junto al reconocimiento del aloantígeno para su activación, siendo relevante la expresión de moléculas coestimuladoras en las APC como CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2). Estas son reconocidas por el receptor CD28 que se expresa constitutivamente en las células T CD4⁺ y CD8⁺. Una vez que suceden las dos señales, se inducen cascadas de señalización que promueven la producción de interleuquina IL-2, expansión clonal y generación de células T efectoras (58,59). Además, se han descrito otras moléculas coestimuladoras en las células T relacionadas al CD28 que involucran a las vías ICOS-B7h y PD-1 con PD-L1/PD-L2 (60). En el caso de ICOS es una molécula coestimuladora positiva, mientras que PD-1 - PD-L1/PD-L2 consiste en una vía coestimuladora negativa importante para mantener la autotolerancia (60). Otra proteína importante con función coestimuladora inhibitoria es CTLA-4 (CD152), expresada en células T activadas y T reguladoras (Tregs) perteneciente a la familia de CD28, la cual interacciona con CD80/86 (B7-1/2) de las APCs (61,62). Los miembros de la familia de los receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR) son otras moléculas coestimuladoras descritas capaces de activar células T. De estas, destacamos la interacción CD40 (expresado en APCs) con CD154 (CD40L, expresado en células T) (63,64). *Estas vías de señales coestimuladoras son puntos de control inmunológico cuando son bloqueadas o reguladas, permitiendo inducir mecanismos de tolerancia (65,66).*

Por último y como ya mencionamos, para una óptima generación de linfocitos T efectores y de memoria se requiere una señal 3 que complementa a la señal 1 y 2 (67). Dos ejemplos claros de tercera señales que potencian respuestas T-CD8 son la cooperación de las células T-CD4 y la presencia de citoquinas inflamatorias (68). El papel de los linfocitos T-CD4 para la activación de los T-CD8 es dependiente del estímulo antigénico, donde en una inflamación limitada, la activación de los T-CD8 depende críticamente de la cooperación de los CD4 para desencadenar una respuesta inmune

primaria (69–71). Contrariamente, en infecciones por patógenos los niveles de inflamación son altos, no requiriendo la cooperación de los T-CD4 (72,73). En cambio, la generación de linfocitos T-CD8 de memoria en un contexto de infección sí depende de la cooperación de los T-CD4 a partir de la activación inicial de los CD8 (74–76).

Los mecanismos más relevantes descritos por los cuales las células T-CD4 ayudan a activar a las CD8 son la señalización CD40-CD154 y la producción de interleuquina 2 (IL-2), tanto en el desarrollo de linfocitos efectores y de memoria (67,72,73,77–82). En contextos de alotrasplantes, la generación de respuestas aloreactivas primarias y de memoria por parte de linfocitos T-CD8 sucede en ausencia de la ayuda T-CD4, aunque en términos de frecuencia y funcionalidad, una óptima alorespuesta requiere de la cooperación de los T-CD4 (81–83). La producción de citoquinas proinflamatorias es también una tercera señal (68), conociéndose mediante estudios *in vitro* que la IL-12 y el interferón de tipo I (IFN) son capaces de generar respuestas T-CD8 (84–86). En trasplantes, se ha evaluado *in vivo* el papel del IFN tipo I en la alorespuesta y el rechazo de trasplantes de piel de incompatibilidad menor y mayor, donde se reportó que este no es crítico en el rechazo agudo ni en la generación de células T-CD8 de memoria (87). En este sentido, los estudios indican que el entorno inflamatorio en el cual se activan los linfocitos T determinará el destino final de estas células y existen terceras señales redundantes en la generación de alorespuesta por células T aloreactivas (87–89).

Una vez que los linfocitos T son activados, las células T cooperadoras CD4⁺ efectoras son capaces de producir citoquinas proinflamatorias, provocando daño al tejido transplantado mediante inflamación mediada por citoquinas. En cambio, las T CD8⁺ que reconocen aloantígenos de forma directa o indirecta se diferencian a células citotóxicas (CTLs) que actúan sobre las células del tejido transplantado para su destrucción.

Las células T cooperadoras son también capaces de activar linfocitos B vírgenes convirtiéndolos en aloreactivos (90,91). Esto lleva a que se produzcan aloanticuerpos que reaccionan con aloantígenos, más frecuentemente con moléculas de MHC del donante, tanto de clase I o clase II. Los aloanticuerpos pueden desencadenar una respuesta contra el trasplante similar a la que ocurre en infecciones, activando el sistema complemento y a células como macrófagos, neutrófilos y Natural Killers (NK) (92).

Como ya se ha comentado, el mayor desafío es evitar que ocurra el rechazo. Para esto uno de los mayores objetivos en esta área de estudio es lograr una tolerancia específica de antígeno o generar mecanismos de regulación de la respuesta inmune contra los aloantígenos. Dado que algunos de estos mecanismos son de relevancia en este trabajo de tesis, pasaremos a desarrollarlos además de contextualizarlos dentro de diferentes estrategias para lograr una inmunomodulación.

Regulación y mecanismos de tolerancia en el contexto del alotrasplante

Anteriormente describimos como se activa y desencadena la respuesta inmune que lleva al rechazo de trasplantes, consecuencia que se pretende evitar. Para esto, es

deseable que se desencadenen mecanismos de tolerancia que logren regular la alorespuesta, activando mecanismos regulatorios.

La tolerancia inmunológica se define como la serie de mecanismos activos que evitan una respuesta efectora contra un antígeno, sin perjuicio de las respuestas inmunes contra otros antígenos. Los antígenos capaces de desarrollar tolerancia inmune se los denomina tolerogénicos, contrario a los que inducen respuestas inmunes que son inmunogénicos. Específicamente en la inmunología de trasplantes, la tolerancia se define como *los mecanismos activos que evitan una respuesta inmune efectora contra los aloantígenos, implicando la protección del mismo. No obstante, las respuestas frente a otros antígenos no propios continúan ejerciéndose y se preservan*. Clínicamente, esto se manifiesta en la ausencia de rechazo agudo y crónico del órgano/tejido injertado manteniéndose su funcionalidad.

El principal mecanismo de tolerancia de un organismo en homeostasis es la tolerancia frente a antígenos propios, denominada autotolerancia, que en definitiva tiene como objetivo evitar fenómenos autoinmunes. Para esto, los linfocitos, como principales actores de la inmunidad adaptativa, deben pasar un filtro en los órganos linfoideos, siendo seleccionados dependiendo de la fuerza con la que reconocen antígenos propios. Los mecanismos de tolerancia eliminan entonces linfocitos que expresen receptores con alta afinidad hacia estos antígenos, pudiendo ocurrir esto en órganos linfoideos primarios (*tolerancia central*) o bien en tejidos periféricos y órganos linfoideos secundarios (*tolerancia periférica*). La comprensión de estos mecanismos ayuda para el desarrollo de herramientas que permitan manipular el sistema inmune para prevenir el rechazo de los trasplantes, además de contribuir en el desarrollo de terapias para otras patologías como las enfermedades autoinmunes, infecciones y cáncer.

Como se ha mencionado anteriormente, la tolerancia central ocurre en órganos linfoideos primarios. En lo que respecta al desarrollo de tolerancia de los linfocitos T, este proceso ocurre principalmente en el timo, donde sucede la maduración de estas células con el objetivo de eliminar los clones de células T autorreactivas. El primer proceso es la *selección positiva*, la cual ocurre en la corteza tímica donde las células epiteliales aquí presentes expresan complejos MHC-péptido a los timocitos (linfocitos T en desarrollo), sobreviviendo únicamente aquellos timocitos que son capaces de reconocerlos, etapa en la que además se define si expresará CD4 o CD8. Una segunda etapa es la *selección negativa*, en la cual el objetivo ya es eliminar los clones de linfocitos T que tengan un TCR con alta afinidad por antígenos propios (93). Esta ocurre en la médula tímica en un trabajo coordinado entre mTEC (células epiteliales medulares tímicas) y células dendríticas. Las mTEC mencionadas expresan y presentan un amplio repertorio de antígenos propios derivados de proteínas circulantes o asociadas a células del organismo, presentes en los tejidos periféricos. Esta expresión ectópica de antígenos propios es controlada por el gen AIRE (del inglés “Autoimmune REgulator”) (94), aunque recientemente se describió que puede ser independientes de este gen (95). El gen AIRE puede sufrir mutaciones que causan una enfermedad autoinmune llamada Síndrome Autoinmune Poliendrócrino tipo 1 (sigla en inglés, APS1), en la cual se afectan varios órganos endócrinos como las paratiroides, glándulas adrenales, islotes pancreáticos, así

como la piel y otros tejidos (96). Cuando los linfocitos T cuyo TCR reconoce con alta afinidad a los antígenos propios presentados por las células medulares, se desencadena la señalización mitocondrial para conducir a la apoptosis, eliminando así a estos linfocitos autorreactivos. Por otro lado, las células que pasaron con éxito el proceso de selección, abandonan el timo hacia la circulación periférica como linfocitos T maduros. Sin embargo, no todas las células T que reconocen antígenos propios son eliminadas. Algunas se diferencian a Tregs específicas para el antígeno propio que reconocieron y también abandonan el timo para ejercer funciones reguladoras en la periferia. Del total de las células autorreactivas que se generan en el timo, entre el 25 y 40 % logran escapar a los tejidos periféricos y para ello el sistema inmune tiene previsto otros mecanismos de tolerancia que se llevan a cabo en la periferia (97).

La tolerancia periférica ocurre en tejidos periféricos y en los órganos linfoides secundarios. A través de mucha evidencia recopilada durante décadas, se ha podido demostrar que los mecanismos de tolerancia periférica en alotrasplantes son similares a los que ocurren para los antígenos propios (98). La tolerancia es deseable para los trasplantes debido a que es específica de antígeno y evitaría efectos asociados a una inmunosupresión inespecífica (99). La importancia de comprender los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la génesis de la tolerancia a aloantígenos podría ayudar a solucionar el rechazo crónico del órgano transplantado y la pérdida del mismo, a diferencia de las estrategias terapéuticas actuales, que son más eficaces en prevenir y revertir el rechazo agudo. *En la inducción de tolerancia periférica se destacan principalmente tres mecanismos: la inducción de anergia, deleción de linfocitos T aloreactivos y regulación por Tregs.* Los dos primeros serán desarrollados brevemente y luego, desarrollaremos más profundamente el último, ya que es el mecanismo más involucrado en nuestro trabajo.

La inducción de anergia (o inactivación funcional) se trata de un proceso en los que una proporción de linfocitos T aloreactivos quedan viables sin capacidad funcional de respuesta (64,100). Estas células son incapaces de desencadenar la señalización después del reconocimiento del antígeno por el TCR, producen muy bajos niveles de IL-2 y no pueden proliferar (101–103). En este sentido, el bloqueo de la coestimulación (señal 2) de las células T logra inducir mecanismos de tolerancia en modelos de trasplantes murinos y primates no humanos (65,66,104). Esto se basa en los mecanismos que se desencadenan al abortarse la activación por ausencia de coestimulación después que ocurre el reconocimiento del antígeno por el TCR, como por ejemplo la producción de IL-2 que se ve impedida por la disminución de la actividad de las vías de señalización de las MAPK (del inglés, Mitogen-activated protein kinase) y de AP-1 (105). En modelos murinos de trasplante de piel y órganos sólidos se han estudiado dos principales puntos de bloqueo de coestimulación que son a nivel de las interacciones CD28-CTLA-4 y CD154-CD40, mediante el tratamiento con la molécula de CTLA-4 fusionada con la región Fc de IgG (CTLA-4-Ig) y con anticuerpos anti-CD154 mAb o CD40 mAb, respectivamente (106–109). También se están evaluando en trasplantes el bloqueo de otras señales de coestimulación como ICOS, CD134, CD137 y CD27 (60).

Un ejemplo de un inhibidor de la coestimulación que ha tenido resultados prometedores en ensayos clínicos de pacientes receptores de trasplantes renales es el belatacept, un antagonista de CD28 que compite con este uniéndose con alta avidez a CD80/86 (110–113). El tratamiento con este inhibidor de la coestimulación ha logrado prolongar la sobrevida con una mejor función renal en los pacientes trasplantados que recibieron belatacept respecto a los tratados con ciclosporina (110,111).

La deleción o eliminación clonal de las células T es uno de los mecanismos fisiológicos más importantes de regulación de la respuesta inmune. Esta eliminación de linfocitos T puede ser a través de vías que desencadenan muerte celular de forma activa o pasiva (114,115). Un ejemplo de muerte celular activa es la muerte inducida por activación (del inglés, AICD), la cual ocurre cuando una célula T recibe varias señales a través del TCR, sucesivos ciclos de división (116) y altos niveles de factores de crecimiento como IL-2 (117), sumando una segunda señal a través de receptores de muerte que inducen apoptosis como Fas (CD95) o receptores de TNF (118–120). En cambio, la muerte celular pasiva consiste en estímulos externos como estrés extracelular, deprivación de nutrientes y/o factores de crecimiento, acción de drogas citotóxicas o irradiación. Este tipo de muerte celular pasiva es regulada por proteínas promotoras de la sobrevida celular de la familia de las Bcl-2 (121). Se ha visto en modelos de alotrasplante cardíaco y de médula ósea que al sobreexpresar a Bcl-xL (miembro de la familia Bcl-2) no se induce la tolerancia por bloqueo de coestimulación CD28-CD80/86 o CD40-CD154 y los trasplantes son rechazados (115,122).

Además de la deleción y la anergia como mecanismos inmunoreguladores de la alorespuesta, se conoce que los linfocitos T reguladores (Tregs) participan activamente en la regulación inmune y en la inducción de tolerancia en trasplantes (123).

Las Tregs son una proporción de entre el 5 al 15% del total de células T de la sangre circulante y se clasifican en dos principales grupos dependiendo del lugar donde se generan, ya sea en el timo (denominados Tregs naturales, nTregs) o en la periferia (Tregs inducidos, iTregs) (123). La mayoría de las Tregs presentes en el bazo y ganglios linfáticos son nTregs derivadas del timo, mientras en la lámina propia, tejidos tipo linfoideos del intestino y en el resto de los tejidos del organismo la mayoría son iTregs generadas a partir de células T vírgenes a causa de una respuesta inmune desencadenada (124,125).

Estas células son esenciales en el sistema inmune para mantener la homeostasis y evitar respuestas autoinmunes hacia antígenos propios mediante la supresión de células T efectoras y la funcionalidad de las APCs (126,127).

En el ratón, las nTregs se caracterizan fenotípicamente por expresar el factor de transcripción FoxP3. En los modelos murinos, las Tregs que están presentes en tejidos trasplantados y tejidos linfoideos periféricos son los linfocitos T reguladores CD4⁺ FOXP3⁺ CD25⁺ (128,129). En el humano, FoxP3 se expresa en los Tregs activados, en los Tregs vírgenes y en las células T efectoras. En este caso, las células T reguladoras activadas se identifican por ser CD45RA⁻ con alta expresión de FoxP3 (FoxP3^{high}) y baja para CD127 (CD127^{low}) (130).

En un contexto de homeostasis, las Tregs pueden suprimir la respuesta inmune por diferentes mecanismos a nivel de la inmunidad innata o adaptativa para prevenir autoinmunidad y regular la homeostasis.

Los mecanismos funcionales por los cuales las Tregs regulan la respuesta inmune puede ser tanto a nivel de las células presentadoras, linfocitos B, células Natural Killer (NK), directamente sobre los linfocitos T efectores o por liberación de citoquinas antiinflamatorias/supresoras (Figura 1.2).

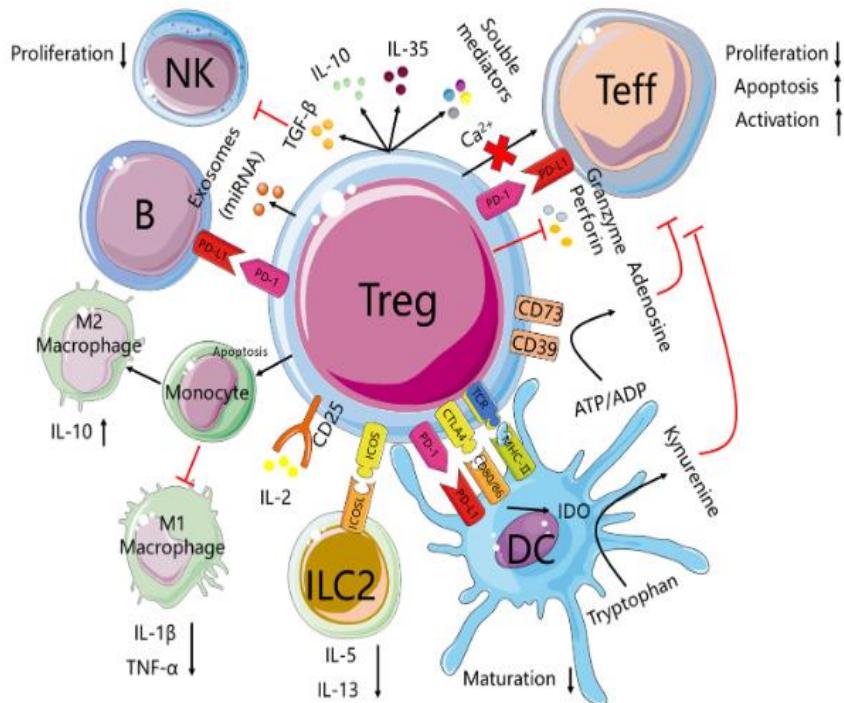


Figura 1.2. Mecanismos funcionales de las Tregs. Las Tregs actúan de forma directa e indirecta sobre distintas células del sistema inmune. En primer lugar, son células que pueden secretar citoquinas y factores solubles que modulan a otras células, como por ejemplo TGF-β, IL-10, IL-35, etc. También son capaces de secretar exosomas con miARN hacia otras células, además de liberar granzimas y perforinas que promueven apoptosis en células T efectoras. Las Tregs al tener alta expresión de CD25, logran secuestrar IL-2 dejando sin disponibilidad a las Teff y las NK, impidiendo la proliferación. Pueden afectar la función de los linfocitos B por la interacción PD-1/PD-L1 y a las DCs por PD-1/PD-L1 y CTLA-4/CD80-86. En las DCs, al bloquear las moléculas coestimuladoras, se induce la acción de IDO produciendo quinurenina que inhibe a las Teff. La expresión de CD39 en las Tregs convierte ATP a ADP incrementando niveles de adenosina que afecta a la proliferación de Teff. Las Tregs promueven la diferenciación de macrófagos a un fenotipo M2 previniendo que lo hagan a M1. Estas células también pueden inhibir secreción de citoquinas de las ILC2 vía interacción ICOS/ICOSL. Tomado de Lu et al, 2021, *Transplant Immun*.

Uno de los mecanismos funcionales de las Tregs es la secreción de citoquinas que suprinen y modulan la respuesta inmune, siendo las más importantes TGF-β e IL-10. En el caso de TGF-β, esta citoquina inhibe el metabolismo, la activación y la proliferación de las células NK (131), induce apoptosis de células T CD4⁺, deja incompetentes a la T CD8⁺ efectoras (132) y promueve la conversión de células dendríticas y macrófagos a fenotipos inmunosupresores (133,134). Por otro lado, la IL-10 inhibe la actividad

efectora de las Th17 (135), disminuye la capacidad de presentación de antígenos de las células dendríticas y la secreción de factores proinflamatorios (136). Las células Tregs también ejercen su función reguladora mediante contacto con otras células, siendo relevante que estos linfocitos expresan constitutivamente a CTLA-4, el cual interactúa con CD80/86 sobre las células dendríticas inhibiendo su maduración, impidiendo que las células T efectoras sean activadas (127). La interacción con CTLA-4 induce la actividad de una enzima presente en las células dendríticas que es clave en la inhibición de la activación de T efectoras, la indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO), la cual se encarga de convertir triptófano a quinurenina, siendo este último metabolito liberado al medio extracelular e importante para inhibir la activación de las T efectoras (137). Otra interacción célula-célula es a través de PD-1 en las Tregs sobre PD-L1/2 en la superficie de otros linfocitos T, inhibiendo las respuestas que pudieran desencadenarse (138). Los exosomas también cumplen un rol en la función de los Tregs, donde se ha reportado que pueden transportar micro ARNs (miARN) a otras células blanco para regular su metabolismo y funciones (139). Las Tregs pueden ocasionar desórdenes metabólicos en las células blanco, siendo que estos linfocitos expresan CD25 (receptor de IL-2, IL-2R) que reduce la disponibilidad de IL-2 para que sea reconocida por células T efectoras y por lo tanto no permite que proliferen (140). Además, las Tregs liberan Granzimas A/B que provocan muerte de células T CD8⁺ y otras células blanco en forma dependiente de perforinas (141). Otro mecanismo importante por el cual los Tregs modulan la proliferación de células efectoras y por ende la respuesta inmune es la disminución de los niveles de ATP extracelular, dado que estas células expresan en su membrana CD39, proteína que convierte ATP a AMP, provocando un aumento en el nivel de adenosina que inhibe la proliferación de linfocitos T efectores (142).

De lo anteriormente expuesto, se puede desprender el interés de desarrollar estrategias terapéuticas que induzcan los mecanismos de tolerancia para modular la respuesta y prolongar la sobrevida del trasplante. Por esta razón, a lo largo del tiempo se han ido desarrollando distintas terapias que permiten evitar un rechazo a corto y mediano plazo, algunas basadas en inmunosupresión sistémica y otras más dirigidas a inducir los mecanismos de tolerancia descritos.

Terapias de uso clínico para disminuir el rechazo de los trasplantes

Un objetivo principal en el terreno de la trasplantología, es encontrar nuevas estrategias para inducir tolerancia específica al donante. Estas permitirían una mayor sobrevida del trasplante sin necesidad de inducir una inmunosupresión inespecífica. Las actuales drogas utilizadas como terapia postrasplante para prevenir el rechazo agudo son inmunosupresores sistémicos, los cuales en su mayoría son inespecíficos que depletan linfocitos o bloquean vías de señalización necesarias para ejercer la respuesta inmune. Así, las drogas inmunosupresoras presentan tres efectos: 1) el terapéutico, evitando el rechazo agudo del trasplante; 2) consecuencias no deseadas por la inmunodeficiencia sistémica, aumentando las chances de infecciones o cánceres 3) toxicidad no inmune en tejidos sanos. Los efectos secundarios y la toxicidad son la principal dificultad que presenta la utilización de forma crónica de estas drogas inmunosupresoras inespecíficas,

generando un problema en la calidad de vida de los pacientes trasplantados, los que en muchos casos abandonan por completo el tratamiento.

Clasificación y mecanismos de acción de las drogas inmunosupresoras

Estas drogas pueden clasificarse de acuerdo a su componente molecular, donde tenemos pequeños compuestos químicos (incluyendo la subfamilia de los glucocorticoides), proteínas (por ejemplo, anticuerpos e inmunoglobulinas intravenosas) y proteínas de fusión, y (143).

Los pequeños compuestos químicos son drogas que han sido y son muy utilizadas en la clínica, las cuales se caracterizan porque inhiben blancos involucrados en importantes vías de señalización para la funcionalidad del linfocito T. Este grupo de inmunosupresores tienen la particularidad de tener un efecto sistémico, es decir que afecta al sistema inmune en forma no específica.

Dentro de este tipo de inmunosupresores encontramos drogas cuyo objetivo es impedir la expansión de linfocitos T efectores aloreactivos, utilizadas generalmente combinadas unas con otras de acuerdo a los distintos protocolos que se ajustan a las características y al estado de los pacientes trasplantados. La Azatioprina, fue uno de los primeros inmunosupresores con el que se logró observar un efecto inmunosupresor de amplio espectro en trasplantes de órganos (144). Este fármaco se caracteriza por su conversión en el organismo a 6-mercaptopurina que interfiere en la síntesis de ADN, necesaria para la división celular de los linfocitos T en la expansión clonal.

Luego se comenzaron a utilizarse *inhibidores de la calcineurina*, enzima dependiente de calcio que participa en la transcripción de la IL-2 y es importante en la estimulación del crecimiento y diferenciación de los linfocitos T. La Ciclosporina es uno de los inhibidores de calcineurina utilizados en la clínica para trasplantes (145), cuyos efectos adversos asociados se deben mayormente a la alta concentración que pueden incluir nefrotoxicidad, hipertensión, hiperlipidemia, hiperplasia gingival, temblores, inducción de diabetes mellitus postrasplante, síndrome urémico hemolítico y cambios en la piel (146). Otro inhibidor de la calcineurina muy utilizado actualmente en la clínica para prevenir el rechazo agudo de trasplantes es el Tacrolimus (FK506). Esta forma un complejo con la proteína “FK506-binding protein 12” (FKBP12), que inhibe a la calcineurina en forma más potente que la ciclosporina (147,148). El Tacrolimus también tiene efectos secundarios nefrotóxicos y síndrome urémico-hemolítico, con una menor probabilidad de hiperlipidemia, hipertensión y problemas cutáneos, mientras que aumenta la incidencia de diabetes postrasplante (143). El uso de Tacrolimus se ha ido incrementando continuamente por encima de la Ciclosporina, aunque muchas terapias para trasplantes se programan alternando ambos inmunosupresores de acuerdo a los riesgos potenciales dependiendo del perfil y antecedentes del paciente (por ejemplo, edad, hipertensión, diabetes, obesidad).

Las drogas *inhibidoras de la síntesis de purinas* son otra opción disponible actualmente para terapias postrasplante. Esta familia farmacológica provoca inmunodeficiencia sin afectar otros órganos (149,150). Además de la Azatioprina ya mencionada, en este grupo se destaca el Micofenolato, prodroga que al ingresar al organismo se protona y se

convierte a ácido micofenólico, cuyo mecanismo de acción implica la inhibición de la Inosina monofosfato deshidrogenasa, enzima clave en la síntesis de purinas. Se ha mostrado que el micofenolato combinado con inhibidores de calcineurina mejora la sobrevida del paciente y previene el rechazo agudo del trasplante a mediano y largo plazo (151,152). Sin embargo, presenta importantes efectos secundarios a nivel gastrointestinal (diarreas crónicas) y a nivel hematológico anemia y leucopenia.

Otro grupo importante de drogas inmunosupresoras son los blancos de la rapamicina (del inglés *mTOR*), proteína intracelular clave en muchas funciones celulares, entre ellas la regulación del crecimiento, proliferación y muerte celular, debido a que está muy ligado al ciclo celular (153,154). Como su nombre lo indica, es un blanco de la Rapamicina, también llamada Sirolimus, droga inmunosupresora que también se compleja a FKBP12 e inhibe a *mTOR*, pero no puede inhibir la calcineurina (155). La inhibición de *mTOR* bloquea la señalización de los receptores de citoquinas, evitando que se active el ciclo celular y permita proliferar al linfocito. Los principales efectos secundarios de la Rapamicina incluyen hiperlipidemia, trombocitopenia y problemas en la cicatrización de heridas, junto a otros como necrosis en riñones trasplantados, reducción de concentraciones de testosterona, proteinuria, úlcera bucal, lesiones cutáneas y neumonitis.

En suma, estas drogas inmunosupresoras inespecíficas que son y han sido utilizadas en la clínica para el tratamiento y manejo del rechazo agudo de los alotrasplantes, *ejercen efectos sistémicos que causan muchas complicaciones asociadas a la inmunodepresión general en el paciente, dejándolo susceptible a muchas patologías como infecciones oportunistas y distintos tipos de cáncer. Por este motivo, se han ido desarrollando otras estrategias que tienen como diana moléculas específicas en los linfocitos T, con el fin de ser más focalizadas a la alorespuesta sin una supresión inmune sistémica.*

En este sentido, un grupo farmacológico más reciente y muy relevante son los inmunosupresores proteicos, dentro del cual se destacan los anticuerpos que suelen tener acción depletante de linfocitos.

Anticuerpos depletantes.

Este grupo de anticuerpos se caracterizan por bloquear proteínas claves en los linfocitos y que su inhibición determina la eliminación de los mismos, dejando al organismo inmunodeprimido en forma específica y no sistémica. Algunos ejemplos de este tipo de anticuerpos son los anti-CD3 (depletante de linfocitos T), los anti-CD52 (Alemtuzumab) depletantes masivos de poblaciones de linfocitos (156) y los anti-CD20 (Rituximab) depletantes de linfocitos B (157).

A continuación, nos enfocaremos en los *anti-CD3*, debido a que se conoce que estos logran depletar específicamente a corto plazo linfocitos T efectores (incluyendo los aloreactivos) y luego se promueve la generación de Tregs. Hay trabajos que muestran resultados prometedores en el uso de estos anticuerpos en distintos modelos animales de trasplantes, así como de enfermedades autoinmunes (158–162). Además, éstos se han ido perfeccionando a lo largo del tiempo para disminuir los efectos secundarios.

El primer anti-CD3 utilizado en la clínica fue el OKT3 (Muromonab), un anticuerpo murino monoclonal específico para reconocer CD3 humano (163,164). Este anticuerpo reconoce al CD3, una proteína de la membrana celular asociada al receptor de las células T (TCR) y que forman el complejo CD3-TCR. La unión del anticuerpo contra el CD3 desencadena una secreción masiva de citoquinas conocida como “tormenta de citoquinas”, la cual lleva a efectos secundarios severos (165,166). Estos efectos inmunogénicos están relacionados a la región Fc del anticuerpo, reconocida por los receptores (FcRs) presentes en las APCs que permite una unión con el complejo CD3-TCR, lo que deriva en la activación de la célula T (162). Siendo un anticuerpo de origen murino, el OKT3 es altamente inmunogénico en humanos (167,168) y además posee potentes propiedades mitogénicas que promueven la proliferación de células T y secreción de citoquinas. Los efectos secundarios más observados para el OKT3 fueron fiebre, náuseas, vómitos, dolor de cabeza, sumado a la presencia de síndromes “*flu-like*”. Al margen de los efectos secundarios, los ensayos con el OKT3 han mostrado resultados prometedores en trasplantes renales, hepáticos y cardíacos (169).

En vista de los efectos no deseados ocasionados por el OKT3, se comenzaron a desarrollar otros anticuerpos anti-CD3 mediante ingeniería genética para eliminar/disminuir estos efectos, destacándose cambios a nivel estructural de la inmunoglobulina con mutaciones en la región Fc, a los que se les denomina “FcR-nonbinding anti-CD3” (del inglés FNB anti-CD3). Así se logró el desarrollo de anti-CD3 humanizados o enteramente humanos (Figura 1.3) (170–173) y también de los fragmentos Fab del anti-CD3 murino que ha mostrado importantes efectos en la prolongación de trasplantes (160).

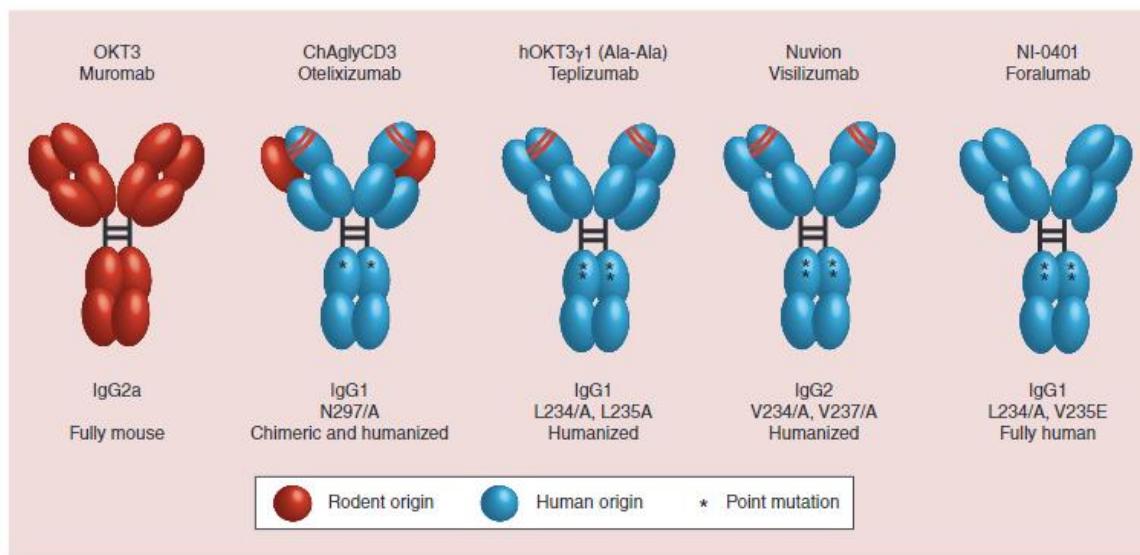


Figura 1.3. Nueva generación de anticuerpos anti-CD3 humanizados y completamente humanos.

Debido a los efectos no deseados mostrados por el anti-CD3 de origen murino OKT3 a causa de su inmunogenicidad, se han desarrollado mediante ingeniería genética anticuerpos humanizados y totalmente humanos. Estos son modificados principalmente en la región Fc que es la responsable de desencadenar los mecanismos inmunogénicos, conservando en las regiones Fab secuencias de origen murino (Otelixizumab, Teplizumab y Visilizumab) o bien siendo totalmente humano (Foralumab). Tomado de *Kuhn & Weigner, 2016 Immunotherapy*.

Los mecanismos de acción de los anti-CD3 en trasplantes y diferentes enfermedades autoinmunes ocurren en dos etapas: una primera etapa inicial que se caracteriza por la depleción de linfocitos T y una segunda donde lo que predomina es la inducción de mecanismos de tolerancia que promueven la generación de linfocitos T reguladores (Tregs) (159,161).

En la primera etapa de depleción de linfocitos T efectores, el anticuerpo anti-CD3 reconoce la cadena épsilon del CD3 en el complejo CD3-TCR del linfocito y esto desencadena una señalización de activación. Sin embargo, esto es seguido por una inducción de anergia o apoptosis, o bien ocurre un proceso llamado modulación antigénica donde la célula T queda impedida de reconocer antígenos a causa de la internalización o desprendimiento del complejo CD3-TCR (159,174–176). Estos efectos ocurren luego de la administración del anti-CD3 y en un corto plazo. Posteriormente, comienzan los efectos de inducción de tolerancia a largo plazo que estarán a cargo de la generación de Tregs. Un posible nexo reportado entre estas dos etapas es que los macrófagos fagocitan cuerpos apoptóticos resultantes de la etapa de depleción T, lo que desencadena la producción de TGF-β (161), muy importante en respuestas inmunes reguladoras e inductor de Tregs adaptativas CD4⁺FOXP3⁺ (176). Además, TGF-β inhibe la activación y proliferación de linfocitos T efectores y bloquea la maduración de células dendríticas (177,178). Al generarse las Tregs se logra regular la alorespuesta inhibiendo a las células T efectoras, ya sea directamente o a través de la inducción de células dendríticas con fenotipo tolerogénico (ver Figura 1.4).

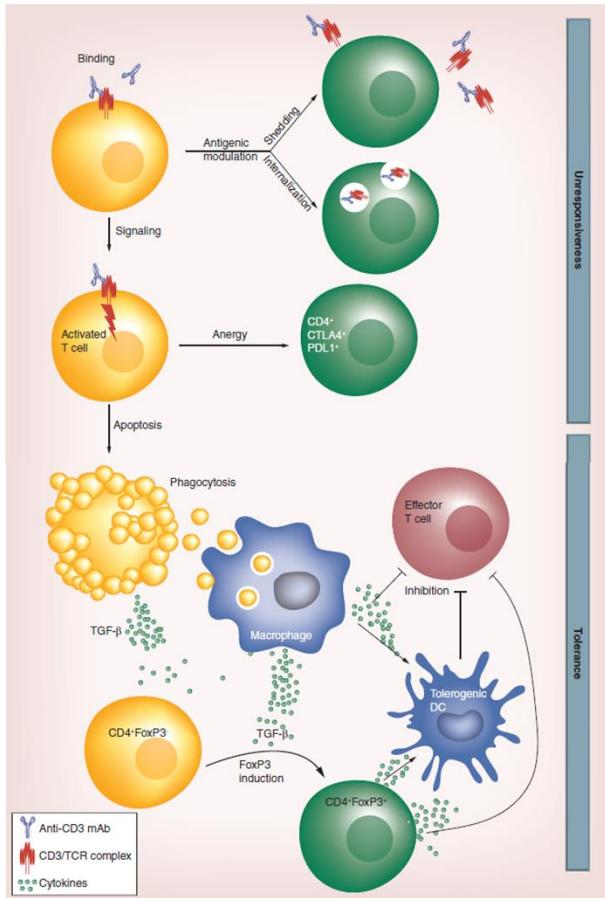


Figura 1.4. Mecanismo de inducción de tolerancia por administración de anti-CD3. La unión del anti-CD3 al complejo CD3/TCR de la célula T lleva a una primera etapa de depleción mediante inducción de anergia, apoptosis o modulación antigenica (privación del linfocito T de reconocer antígenos al internalizar o desprender el complejo CD3/TCR). Luego, se suscita una segunda etapa de inducción de tolerancia donde a partir de la fagocitosis de cuerpos apoptóticos por los macrófagos se secreta TGF-β que induce Tregs CD4⁺FOXP3⁺, permitiendo inducir células dendríticas tolerogénicas y la inhibición de células T efectoras. Tomado de Kuhn & Weigner, 2016 *Immunotherapy*.

Únicamente el OKT3 fue aprobado en 1986 por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (del inglés FDA) para su uso en pacientes con trasplantes de órganos sólidos. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, el OKT3 mostró severos efectos secundarios y derivó en que se continuase trabajando en el área, surgiendo entonces los anticuerpos humanizados o enteramente humanos que están siendo evaluados en ensayos clínicos (162,179–182).

Conociendo las propiedades de inducción de tolerancia de los anti-CD3 con las modificaciones en la región Fc que disminuyen significativamente los efectos no deseados, es que surge el interés de aplicarlo en combinación con otros fármacos en protocolos de terapias para trasplante. De hecho, estos anticuerpos están en etapa de estudios y ensayos clínicos para trasplantes y enfermedades autoinmunes como la diabetes tipo-I (183).

A modo de resumen, en la Figura 1.5 se muestra, en forma esquemática, los blancos terapéuticos de los distintos inmunosupresores utilizados en la clínica.

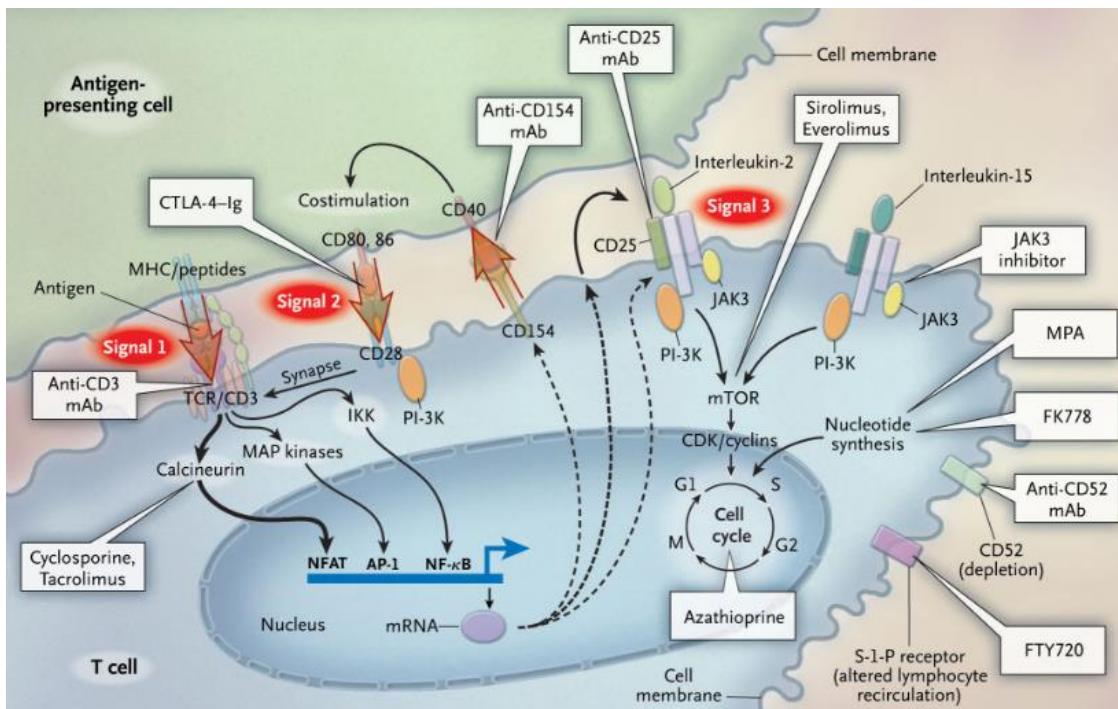


Figura 1.5. Blancos moleculares de drogas y anticuerpos inmunosupresores en el linfocito T. A nivel de la señal 1 del TCR/CD3 tenemos al anticuerpo monoclonal anti-CD3 y río abajo a los inhibidores de la calcineurina: Ciclosporina y Tacrolimus. En la señal 2 de coestimulación CD80/86-CD28 se puede bloquear la señalización con anticuerpos como el anti-CD154 mAb. En la señal 3 de reconocimiento de citoquinas inflamatorias se puede inhibir la señalización desencadenada por la IL-2 bloqueando su receptor con anti-CD25 o bien con los inhibidores de mTOR como el Sirolimus. Otro punto de acción de los inmunosupresores es la síntesis de ADN, donde actúa la Azatioprina, el micofenolato mofetil (MPA) y el FK778. Tomado de *Halloran, 2004, NEJM*.

Del análisis exhaustivo de las bases inmunológicas de las respuestas aloreactivas que llevan al rechazo de los trasplantes, surge el interés de encontrar blancos moleculares que se puedan regular farmacológicamente por drogas no inmunosupresoras y que logren desencadenar mecanismos inmunomoduladores, evitando los estados de inmunosupresión general de los pacientes.

En este sentido, el grupo de investigación del Laboratorio de Inmunoregulación e Inflamación se viene dedicando al estudio de la regulación del sistema inmune en diferentes tipos de patologías, principalmente en cáncer, infecciones virales y trasplantes (184–186). Específicamente en los trabajos que involucran a los trasplantes, se ha visto que la prolongación de la sobrevida y la modulación de la alorespuesta es dependiente de la presencia de un canal iónico denominado TMEM176B (185), el cuál será descrito a continuación. En complemento a esto, la asociación con el grupo de diseño de fármacos de la Dra. Virginia López (actualmente Laboratorio de Síntesis Orgánica y Desarrollo de Fármacos), quienes han desarrollado un potente regulador de este blanco farmacológico, permitió la ejecución de los estudios de este trabajo que irán siendo abordados a lo largo del documento.

TMEM176B como regulador de la respuesta inmune.

El estudio de la implicancia de los canales iónicos en inmunología ha sido de mucho interés en la ciencia y nuestro laboratorio se ha focalizado en estudiar específicamente al canal catiónico TMEM176B, nombrado también “Tolerance-related and induced transcript” (TORID) (187). De hecho, nuestro equipo de investigación mostró por primera vez la función de TMEM176B como un canal catiónico no selectivo y sensible a entornos con pH ácido.

TMEM176B es una proteína transmembrana que se encuentra localizada intracelularmente en membranas de vesículas y organelos (185,188). Este canal pertenece a la familia de las proteínas transmembrana 4A (MS4A) que comparte un 30% de identidad con su proteína homóloga TMEM176A, perteneciente también a la familia MS4A (188,189). A nivel de órganos y tejidos, se encuentra altamente expresado en órganos linfoides primarios y secundarios, colon, pulmón e hígado (188,190), mientras que a nivel celular se expresa en células mieloides, principalmente en macrófagos y células dendríticas (DCs), aunque también se lo ha identificado en células ROR γ T⁺ como las ILC3, linfocitos Th17 y T γ (191). En células dendríticas, la expresión de TMEM176B se asocia a la modulación de la maduración (190,192).

Específicamente en células dendríticas, se conoce en ratón que *Tmem176b* es expresado tanto en DCs convencionales de tipo 1 y 2 (cDC1 y cDC2), estando más altamente expresado en las cDC2 (185,190,193). En relación con esto, se ha observado en los ganglios drenantes del tumor que la expresión de *Tmem176b* en cDC2 es respaldada por células T reguladoras, lo que sugiere una función inmunoreguladora de este canal (194). Además, esto ha sido asociado a la regulación de la migración de estas células (195).

Los principales mecanismos que le confieren su función inmunoreguladora conocidos hasta el momento para este canal catiónico son: la presentación cruzada de antígenos y la inhibición del inflamasoma NLRP3. TMEM176B está localizado en membranas de vesículas como el aparato de Golgi, endosomas y fagosomas de células dendríticas humanas y murinas (185,191,196), siendo un importante regulador del pH endofagosomal al tratarse de un canal transportador de iones (Figura 1.6).

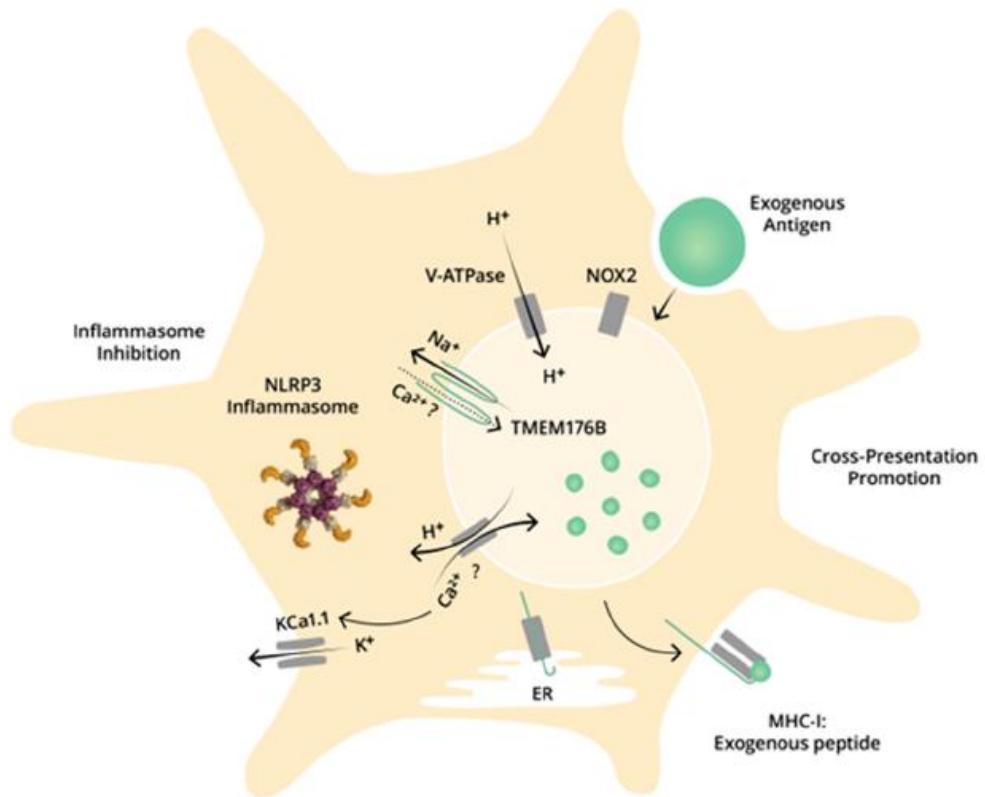


Figura 1.6. Mecanismos funcionales desencadenados por TMEM176B en DCs. TMEM176B promueve la presentación cruzada de antígenos e inhibe al inflamasoma NLRP3. Este canal se encuentra mayormente presente en membranas de vesículas endofagosomales donde equilibra las concentraciones iónicas en el lumen del endosoma, regulando el pH hacia la neutralidad. Esta condición es crítica para desencadenar la presentación cruzada de antígenos a células T CD8⁺ en moléculas de MHC-I. TMEM176B también inhibe al inflamasoma NLRP3, regulando mecanismos iónicos dependientes de la disminución de Ca²⁺ citosólico que posiblemente se dirija hacia el lumen endosomal a través de TMEM176B. Tomado de Hill, M. et al; 2022, *Frontiers in Cell and Develop. Biol.*

En modelos de trasplantes de corazón en ratas, se ha estudiado que la expresión de Tmem176b está asociada a la tolerancia inmune, detectando que los niveles de expresión de Tmem176b en los animales que prolongaron a mediano y largo plazo el trasplante eran significativamente mayores (188). En modelos de alotrasplante de piel en ratones, se observó que en animales transplantados y tratados con células dendríticas tolerogénicas, necesitan de Tmem176b para ejercer su función prolongar la sobrevida del injerto (185). Por lo tanto, el papel de este canal a nivel de las células dendríticas tiene implicancias en la modulación de la aloperspuesta. Este efecto sobre los trasplantes de piel por la expresión de Tmem176b en células dendríticas tolerogénicas es explicado por la inducción de linfocitos T reguladores CD8⁺CD11c⁺ (185). La presencia de Tmem176b en las células dendríticas tolerogénicas es necesaria para la presentación cruzada de antígenos del donante, mecanismo que promueve la generación de Tregs CD8⁺CD11c⁺ (185).

La presentación cruzada de antígenos es un mecanismo fisiológico en donde una célula dendrítica procesa antígenos extracelulares y los presenta en moléculas de MHC de clase I a células T CD8⁺, a diferencia de la vía de antígenos exógenos clásica donde son presentados en MHC de clase II a los linfocitos T CD4⁺. Este mecanismo es posible gracias a que las células dendríticas logran mantener un pH neutro fago/endosomal durante al menos dos horas luego de la endo/fagocitosis (197). Nuestro equipo ha descrito que TMEM176B regula el pH endofagosomal y que su delección génica altera el pH alcalinizándolo, afectando a la presentación cruzada (196). Esto se debe a que TMEM176B es un canal iónico sensible a pH ácido, detectando la acidificación endofagosomal, permitiendo que se active y regule la conductancia de cationes para dejar un pH neutro (185). Esto sucede activamente en la DC para promover la presentación cruzada (197–202). Si bien se trata de un mecanismo que desencadena respuestas inmunes, se conoce que en algunas circunstancias puede promover tolerancia inmune (203), dejando a la generación de Tregs CD8⁺ (204). La función reguladora de las Tregs CD8⁺CD11c⁺ ha sido caracterizada en otros modelos de patologías inmunes, como por ejemplo en un modelo murino de artritis inducida por colágeno tipo-II, modelo animal representativo de la artritis reumatoide en humanos (205).

Se ha estudiado también a TMEM176B como molécula inmunoreguladora en otros escenarios fisiopatológicos que involucran al sistema inmune, como por ejemplo en tumores y en infección viral de COVID-19 (184,186). En contextos tumorales, tanto la delección génica como la inhibición farmacológica de TMEM176B, desencadena respuestas inmunes antitumorales mediante la acción de linfocitos T CD8⁺, potenciando los efectos de las inmunoterapias con anti-CTLA4 y anti-PD1 (184). En este sentido, TMEM176B está regulando respuestas efectoras que son necesarias para combatir los tumores, favoreciéndose que estos logren evadir al sistema inmune y progresar. Por esta razón, en contextos tumorales la inhibición de TMEM176B es importante para el control de la enfermedad.

La otra cara de la moneda ocurre en contextos de infecciones virales, como en la enfermedad COVID-19 provocada por el coronavirus SARS-CoV2 causante de la pandemia en el año 2020. Esta infección se caracteriza por una hiperinflamación y una débil respuesta de los linfocitos T contra el virus (206–210). Lo que sucede es que la inflamación exacerbada en respuesta al virus, donde el inflamasoma se encuentra activado, provoca una disfunción en las células T que las lleva hacia un fenotipo exhausto (211). TMEM176B controla la activación del inflamasoma desencadenada por la infección viral, lo cual permite modular la inflamación y permitir que se restablezca la funcionalidad de los linfocitos T cuando se aplica una inmunoterapia bloqueando el eje PD-1/PD-L1 (186). En este caso, la presencia y acción de TMEM176B es favorable para el control de la patología.

En contextos de enfermedades autoinmunes, la lógica del rol de TMEM176B es similar al descrito en infecciones virales, aunque probablemente difiera en varios aspectos mecanísticos. Trabajos no publicados de nuestro equipo, han mostrado en un modelo de EAE (encefalopatía aguda experimental) utilizada como correlato de la Esclerosis

Múltiple en pacientes, que los animales *Tmem176b*^{-/-} desarrollan una enfermedad clínica más severa. Esto sugiere que TMEM176B es un factor protector en autoinmunidad. En acuerdo con ello, se ha reportado que este canal está expresado genéticamente en pacientes con Esclerosis Múltiple, donde la presencia de una mutación en la secuencia aminoacídica de TMEM176B estaría probablemente asociada a la enfermedad, aunque esto último no está formalmente probado (212). Por otro lado, se ha reportado en artritis reumatoidea, otra patología autoinmune, que la expresión de TMEM176B en sangre periférica ha sido asociada a la respuesta clínica de terapias con anti-TNF (213). Todos estos datos y estudios conocidos acerca de TMEM176B en las distintas patologías que involucran al sistema inmune, refuerzan la idea de la funcionalidad de TMEM176B como proteína inmunoreguladora. Tomando en cuenta trabajos previos (185) y lo descrito anteriormente, es esperable que en trasplantes la acción de TMEM176B sea favorable para modular respuestas contra el rechazo, lo cual será profundizado en este trabajo.

Como se ha mencionado, en estudios realizados en contextos tumorales e infecciones virales, TMEM176B es un inhibidor del inflamasoma NLRP3 (184,186). La activación de este multicomplejo es dependiente de los niveles citosólicos de cationes y aniones, destacándose el K⁺ y el Ca²⁺ (214–217). En ensayos con BMDCs estimuladas con LPS y ATP, Nigericina o cristales de alúmina, las células deficientes en TMEM176B mostraron mayor liberación de IL-1 β y activación de Caspasa-1 (184), indicando que TMEM176B regula al inflamasoma NLRP3 inhibiéndolo. Esta inhibición se ha visto que es a través de un mecanismo de control del calcio citosólico por TMEM176B, permitiendo que se activen los canales de potasio dependientes de calcio (184).

TMEM176B es una proteína que puede ser regulada farmacológicamente, donde nuestro grupo está trabajando y ha patentado a BayK8644 (bloqueador de canales de Ca²⁺) (218) como un inhibidor de TMEM176B en el contexto tumoral, favoreciendo a que se desencadenen respuestas antitumorales (184). Así como BayK8644 actúa como inhibidor de la actividad de este canal, es posible que haya fármacos que promuevan la actividad iónica de TMEM176B. En este sentido, se conoce que los ácidos grasos nitrados son activadores de canales iónicos de calcio TRP (219).

Estos compuestos han sido muy estudiados como potentes antiinflamatorios (220–222), donde su acción sobre los canales de calcio TRPs (sigla en inglés “Transient Receptor Potential”) ha sido descrita en el trabajo de J.M Beckel y W. de Groot (219). Estos canales están presentes en neuronas sensoriales primarias y cumplen una función importante en la sensación de dolor, incluido el que es asociado a la inflamación. Este trabajo muestra específicamente que los ácidos grasos nitrados activan los canales TRP en estas neuronas (223–225), produciendo una serie de cambios en ellas que concluyen en una modulación y/o resolución de las respuestas inflamatorias y de dolor.

Especulamos entonces que este tipo de moléculas sirvan como activadores de TMEM176B, lo que permitiría obtener efectos inmunomoduladores favorables en la aceptación de trasplantes. En nuestro grupo, integrantes de los Laboratorios de “Biología Vascular y Desarrollo de Fármacos” y de “Síntesis Orgánica y Desarrollo de

Fármacos” han estudiado a compuestos que contienen el grupo funcional nitroalqueno como potenciales fármacos, habiendo diseñado y sintetizado nuevas generaciones de moléculas con diferentes potencialidades farmacológicas dependiendo de la enfermedad y su contexto.

Compuestos con el grupo funcional nitroalqueno como potentes fármacos antiinflamatorios no convencionales.

En los últimos años, se ha avanzado en el estudio biológico de diferentes compuestos que contienen el grupo funcional nitroalquenilo como potentes antiinflamatorios no convencionales (en el sentido que no inhiben a ninguna de las COX). Por definición, llamaremos “compuesto nitroalqueno” a cualquier molécula orgánica que contenga un grupo funcional nitroalquenilo, es decir un grupo nitro (-NO₂) unido covalentemente a un carbono insaturado (con doble enlace, Figura 1.7). Esta estructura determina la generación de un centro electrón atrayente en el carbono beta adyacente al grupo nitro, determinando que estos compuestos sean potentes electrófilos. Esta propiedad les permite a estos compuestos formar aductos covalentes reversibles mediante *la reacción de adición de Michael* con residuos nucleofílicos de aminoácidos presentes en proteínas como cisteínas e histidinas o tioles de bajo peso molecular (GSH o Cys libres) (226). La reacción de adición de Michael es una adición 1,4 (adición conjugada) de un carbanión (nucleófilo donador de Michael) a un doble enlace de un compuesto α, β insaturado (electrófilo aceptor de Michael) (Figura 1.8) (227).



Figura 1.7. Esquema genérico de la estructura de un nitroalqueno

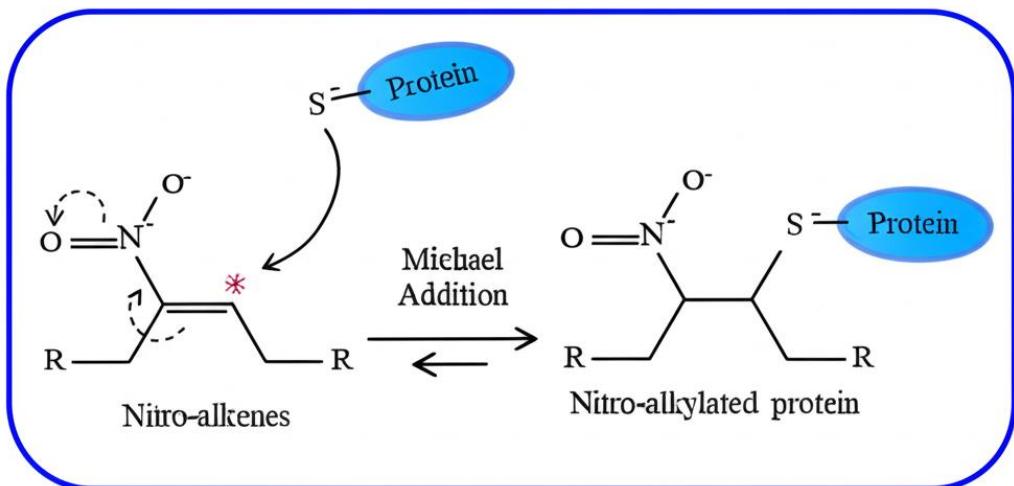


Figura 1.8. Reacción de adición de Michaeli. Los nitroalquenos tienen la propiedad de generar un centro electrón atrayente en el carbono beta adyacente al grupo nitro, lo cual permite formar aductos con nucleófilos de bajo peso molecular o bien con residuos de cisteínas e histidinas de proteínas. Esta unión permite que los nitroalquenos puedan unirse en forma reversible con proteínas de importante interés biológico donde pueden ejercer diferentes efectos. Adaptado de: Villacorta, L. et al; 2016; *Frontier in Biosciences*

Existen nitroalquenos que se sintetizan *in vivo*, en forma endógena (228). Por ejemplo, los ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoleico conjugado (cLA) pueden ser nitrados en el organismo de forma natural. Esta nitración endógena puede ocurrir en ácidos grasos provenientes de la dieta o fuentes endógenas que reaccionan con especies reactivas del nitrógeno (por ejemplo: radical óxido nítrico, peroxinitrito y ácido nitroso) junto a mediadores inflamatorios como radicales superóxidos, peróxido de hidrógeno y radicales peroxilo lipídicos (228,229). La formación mediante reacciones por radicales libres ocurre generalmente en sitios con condiciones inflamatorias y de estrés oxidativo, aunque también pueden sintetizarse en el estómago con fuentes de ácidos grasos insaturados y grupos nitro provenientes de la dieta, siendo catalizada la reacción de síntesis por el ácido presente en el estómago (Figura 1.9).

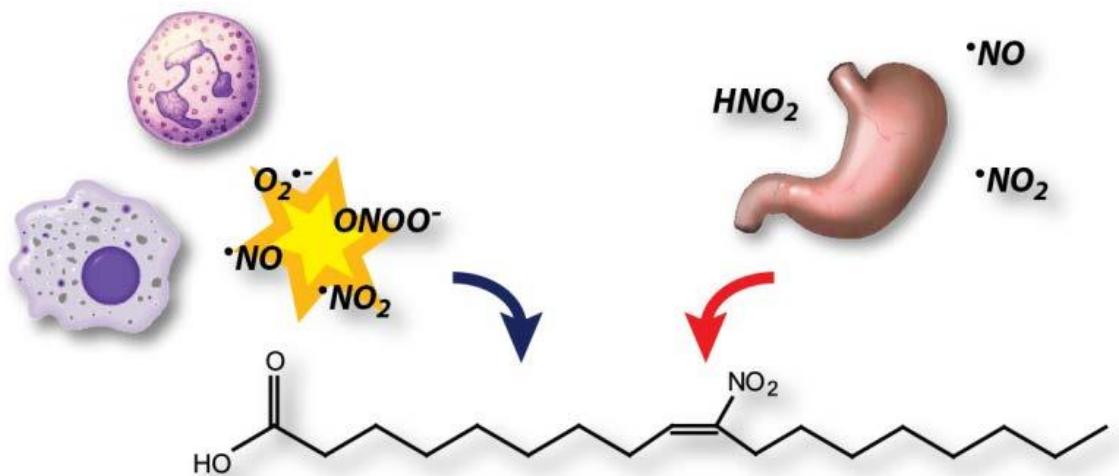


Figura 1.9. Síntesis endógena de nitroalquenos. Los ácidos grasos nitrados pueden ser sintetizados en forma endógena en el organismo mediante dos formas. En condiciones inflamatorias y de estrés oxidativo pueden ser formados mediante reacciones con radicales libres como se muestra a la izquierda de la figura. Otra forma es la formación en el estómago, donde la presencia de ácido cataliza la síntesis a partir de fuentes dietéticas de grupo nitro como se muestra a la derecha. Tomado de: *The physiological generation of nitro-fatty acids*; B.A. Freeman; <http://www.pharmacology.us/Faculty/BruceFreeman>)

Debido a la reactividad de las cisteínas e histidinas, los nitroalquenos son capaces de formar aductos con proteínas de relevancia biológica, causando efectos importantes en determinados contextos. Se ha estudiado que los nitroalquenos derivados de ácidos grasos tienen potentes propiedades antiinflamatorias debido a que pueden actuar sobre importantes componentes y vías de señalización de procesos inflamatorios o antiinflamatorios. Es así que se ha mostrado que los nitroalquenos inhiben las vías proinflamatorias NF- κ B y el inflamasoma NLRP3 (230–232), mientras que activan vías antiinflamatorias, citoprotectoras y antioxidantes como Nrf2-Keap1 (233), PPAR- γ (234) y Heat Shock Factor-1 (HSF-1) (235) (Figura 1.10).

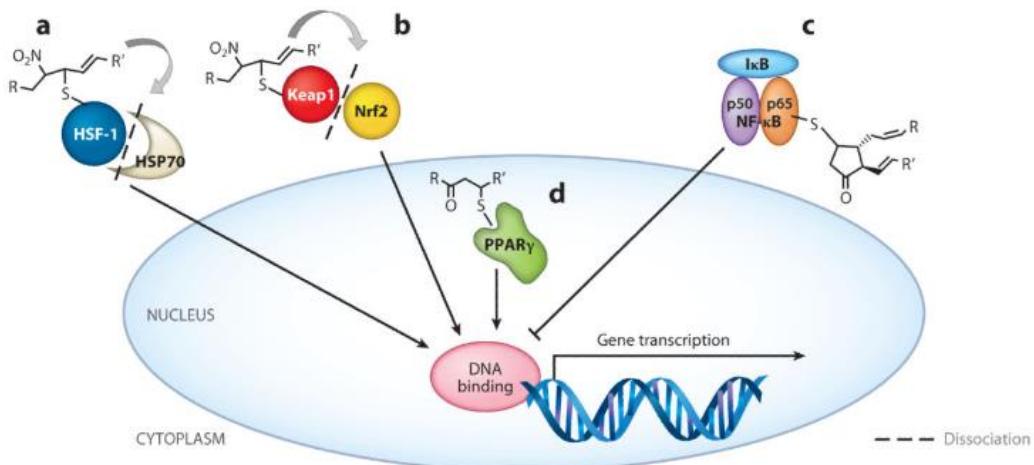


Figura 1.10. Vías de señalización de los nitroalquenos derivados de ácidos grasos. A) Activación de HSR: se unen a HSP70 que deriva en la liberación y traslocación al núcleo de HSF-1 para inducir expresión de genes dependientes de HSR. B) Activación de Nrf2-Keap1: Se unen a Keap1 que provoca la disociación y translocación al núcleo de Nrf2 para inducir la expresión de genes antioxidantes. C) Inhibición de NF-κB: Se unen a la subunidad p65 impidiendo su translocación al núcleo y la expresión de citoquinas proinflamatorias dependientes de esta vía. D) Activación de PPAR-γ: se unen covalentemente a los receptores PPAR y actúan como agonistas parciales, estimulando la transcripción génica. Tomado de *Delmastro-Greenwood, Freeman y Wendell, 2014, Annu. Rev. Physiol.*

Los primeros hallazgos acerca de los nitroalquenos como compuestos antiinflamatorios han mostrado que los ácidos grasos nitrados inducen a la enzima antioxidante y citoprotectora Hemoxygenasa-1 (HO-1) en células endoteliales, esto de manera dependiente e independiente a la activación de la vía Nrf2-Keap1 (236,237). A la inducción de esta enzima se le atribuyen importantes propiedades antioxidantes y citoprotectoras (238), además de haberse reportado que HO-1 modula el rechazo de trasplantes (239,240). Por este motivo, a la inducción de HO-1 la consideraremos para estudiarla como posible mecanismo inmunomodulador de la alorespuesta por nitroalquenos, describiendo más adelante sus características y propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras.

Como se mencionó anteriormente, otro efecto relevante para nuestro trabajo es que los nitroalquenos pueden tener relevancia en diferentes procesos biológicos como la regulación de canales iónicos. En particular se ha estudiado que los ácidos grasos nitrados son capaces de regular canales de transporte de cationes, específicamente los TRP (del inglés Transient Receptor Potential) (219).

Desarrollo de nitroalquenos de segunda y tercera generación

El grupo de investigación de los Doctores Carlos Batthyány y Virginia López del Laboratorio de Biología Vascular y Desarrollo de Fármacos y del Dr. Carlos Escande del Laboratorio de Patologías del Metabolismo y el Envejecimiento del Institut Pasteur de Montevideo, han trabajado en el diseño, síntesis y caracterización de propiedades farmacológicas de nuevos compuestos nitroalquenos. Lo racional de estudiar estas

nuevas familias farmacológicas surge a partir del descubrimiento que los ácidos grasos insaturados y nitrados (descritos *in vivo*) poseen muchas propiedades benéficas para el organismo, pero desde un punto de vista farmacológico presentan la desventaja de que pierden las propiedades del grupo nitroalqueno de manera muy rápida. Durante su metabolización, no solo son catabolizados a través de la de la β -oxidación de ácidos grasos, sino que son rápidamente saturados a nivel hepático, perdiendo las propiedades electrofílicas del grupo nitroalqueno que es como ejercen sus acciones biológicas sobre los blancos moleculares deseados. La aducción a tioles de proteínas plasmáticas como la albúmina también puede afectar a la biodisponibilidad de estos compuestos y afectar su acción farmacológica (241). En función de dichas observaciones y tomando en cuenta las diferentes patologías a tratar, es que dichos investigadores comenzaron a diseñar nuevos fármacos tratando de preservar el grupo funcional nitroalqueno, asociándolo a sillas estructurales que mejoren su biodisponibilidad y la especificidad de los mismos en diferentes patologías.

Es así que surgen *los nitroalquenos de segunda generación* derivados del α -tocoferol o comúnmente conocido como vitamina E (242). El raciocinio en el diseño de estos nitroalquenos basados en la estructura compleja del α -tocoferol compuesta por un grupo cromanol y una cola isoprenoide, consistió en adicionar el grupo nitroalqueno unido al cromanol para lograr su transporte hacia las placas de ateroma específicamente, donde buscaban que ejerciera la función antiinflamatoria propia de los nitroalquenos (Figura 1.11).

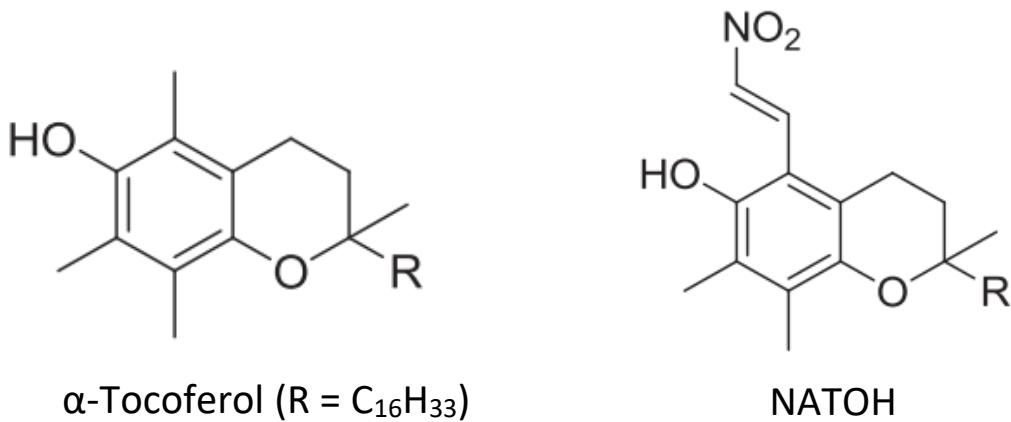
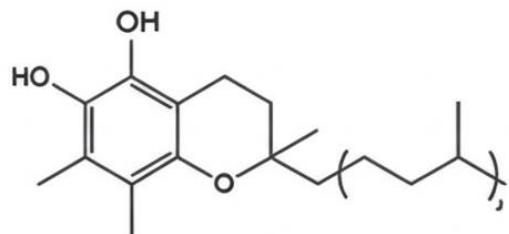


Figura 1.11. Estructura del α -Tocoferol (izquierda) y del Nitroalqueno del α -tocoferol, NATOH (derecha).
Tomado de Rodríguez-Duarte et al, 2019, *Br J Pharmacol*.

A diferencia de los ácidos grasos, el transporte y procesamiento del α -tocoferol en el organismo luego de que es ingerido y absorbido se transporta por los quilomicrones hacia el hígado, luego es captado por proteínas transportadoras de tocoferoles como la α -TPP (del inglés α -tocopherol transport protein) y distribuido hacia el organismo por lipoproteínas de baja densidad (LDL), permitiendo la llegada intacta de la estructura y el grupo nitroalqueno a los sitios específicos con mayor biodisponibilidad (243). Este nitroalqueno ha sido estudiado como potencial fármaco modulador de la inflamación

crónica a bajo grado presente en las placas de ateroma en aterosclerosis. El NATOH ha sido mostrado que es capaz de inhibir NF- κ B y activar Nrf2-Keap1 *in vitro* y previene *in vivo* la formación de placas de ateroma en la aorta, esto último realizado en un modelo murino de aterosclerosis con ratones ApoE^{-/-} alimentados con dieta alta en grasas (244).

En esta segunda generación de nitroalquenos derivados de la vitamina E también se sintetizaron y caracterizaron formas hidrosolubles usando como molécula base el Trolox, basándose su estructura en la del α -tocoferol que carece de la cola isoprenoide. Se destaca entre estas moléculas al nitroalqueno denominado NATx0, derivado del Trolox al cual se le adicionó el grupo funcional, como se muestra en la Figura 1.12. El NATx0 se ha mostrado como un potencial antiinflamatorio no convencional que inhibe NF- κ B y al inflamasoma NLRP3 *in vitro*, disminuye los niveles de IL-1 β en un modelo murino de inflamación aguda con inyección de LPS y disminuye en un modelo murino de obesidad inducida por dieta la inflamación en tejido muscular y la intolerancia a la glucosa mejorando la homeostasis (232).



α-Tocoferol (Vitamina E)

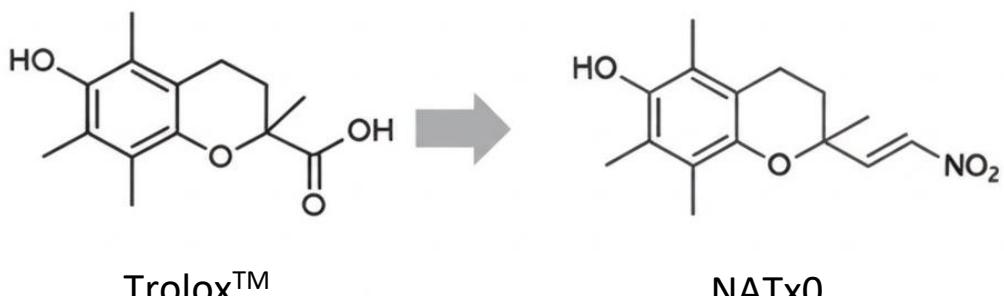


Figura 1.12. Estructura del α -tocoferol (arriba) y su derivado hidrosoluble Trolox (abajo, izquierda), al que se le sustituye la cola isoprenoide por un grupo carboxilo, agregando luego en esta posición el grupo nitroalqueno para dar la estructura del NATx0 (abajo, derecha). Tomado de Dapueto *et al*, 2021, *Redox Biol.*

La caracterización y el estudio de estos nitroalquenos de segunda generación ha sugerido que sin importar la molécula base en la que se adicione al grupo funcional nitroalqueno, se conserva en gran medida las propiedades fisicoquímicas y sus efectos como potentes antiinflamatorios, sumado al aporte que puede dar el siller estructural mejorando la biodisponibilidad y las propiedades farmacológicas y farmacocinéticas.

Aquí surge un nuevo portfolio de *nitroalquenos de tercera generación* derivados de fármacos conocidos en la medicina como son los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). El razonamiento en el diseño y síntesis de estos compuestos es que la adición del grupo nitroalqueno que trae las propiedades antiinflamatorias conocidas de las generaciones anteriores, mejore y potencie a las ya presentes en los fármacos. En este grupo de compuestos se destaca al *Nitroalqueno del ácido salicílico: ácido 5-(2-nitroetenil) salicílico (SANA)* cuya estructura se muestra en la Figura 1.13 (245).

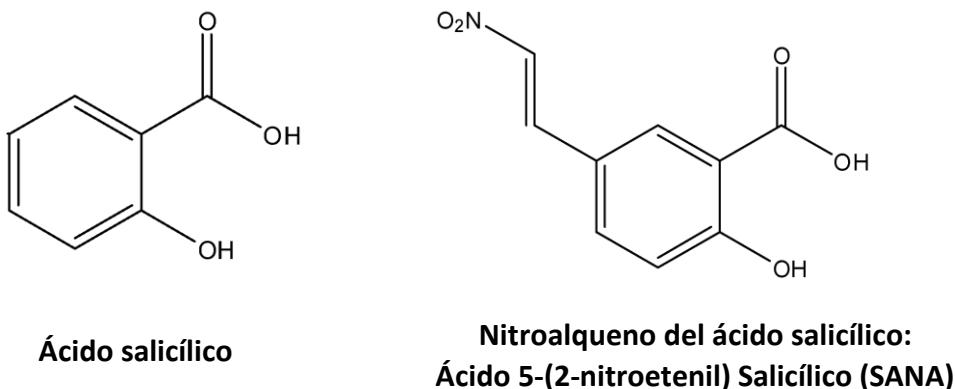


Figura 1.13. Estructura química del ácido salicílico (izquierda) y del Nitroalqueno del ácido salicílico, SANA (derecha).

El ácido salicílico (o su forma desprotonada salicilato) es el precursor del antiinflamatorio no esteroideo más utilizado en la medicina, el ácido acetilsalicílico, comercialmente conocido como Aspirina®. El salicilato ha sido aislado en 1828 por el químico alemán Joseph Buchner de la corteza del sauce, siendo en realidad el extracto activo salicina que años más tarde en 1838 el químico italiano Raffaele Piria logró convertirla por oxidación a ácido salicílico. Sin embargo, desde las antiguas civilizaciones ya se conocía que la corteza del sauce lograba reducir la fiebre y aliviar dolores, siendo utilizada como planta medicinal a lo largo de la historia. El problema del ácido salicílico fue que mostraba efectos secundarios complejos, principalmente irritación gástrica, lo cual fue remediado al acetilar el grupo hidroxilo, surgiendo en 1897 por Felix Hoffman el ácido acetilsalicílico en forma de polvo (246).

El ácido acetilsalicílico es conocido por sus efectos analgésicos y antiinflamatorio y su mecanismo de acción es a través de la inhibición de enzimas ciclooxygenasas (COX) involucradas en las síntesis de prostaglandinas, sustancias sintetizadas a partir del ácido araquidónico que tienen un papel importante a nivel vascular, sanguíneo, sistema nervioso y músculos, favoreciendo el desarrollo de inflamación y dolor (247).

El salicilato no es un AINE estrictamente ya que no inhibe a la COX de manera significativa. Sus efectos antiinflamatorios son más bien dependientes de otros mecanismos de acción que se han reportado más recientemente y que involucran la inhibición de la vía proinflamatoria NF-κB (248,249), la activación de la enzima AMPK que enciende reacciones catabólicas (250) y la inducción de la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M2 a través de HO-1 (251). Además, su dímero (Salsalato) mostró importantes efectos beneficiosos en ensayos clínicos de obesidad, diabetes tipo II y enfermedades cardiovasculares (252–255). Además, se ha estudiado en ratas que el salicilato prolonga la sobrevida de trasplantes de corazón donde comparado al ácido acetil salicílico, incrementa la actividad fibrinolítica de la sangre y esto sería importante para prevenir el rechazo de trasplantes (256,257).

Sin embargo, el salicilato debe utilizarse a concentraciones muy altas para lograr ejercer dichos efectos terapéuticos (en el orden de gr/día), dificultando su utilización a nivel clínico. Esto permite pensar en posibles modificaciones químicas en la molécula del salicilato que puedan mejorar y potenciar sus propiedades, permitiendo un uso en concentraciones más bajas.

Tomando esto en cuenta, en el laboratorio sintetizamos y caracterizamos el nitroalqueno del ácido salicílico (esquema de síntesis en Figura 1.14A) con la finalidad de mejorar los efectos de este fármaco y además incorporarle otras propiedades farmacológicas que confiere el propio grupo nitroalquenilo.

Durante mis estudios de Maestría, estudiamos las principales propiedades fisicoquímicas, en particular su reactividad como electrófilo, así como algunos de los efectos antiinflamatorios previamente reportados para otros nitroalquenos.

A continuación, analizaremos los principales resultados obtenidos en este sentido durante mis estudios de Maestría y que forman parte de los resultados experimentales sobre los que generamos la hipótesis de trabajo de mi tesis Doctoral.

La caracterización fisicoquímica de este compuesto nos dio como resultado que el SANA es un potente compuesto electrófilo que es capaz de reaccionar formando aductos con nucleófilos de bajo peso molecular como el β-mercaptopropano y el glutatión (GSH). Esta reactividad electrofílica ha sido característica de los nitroalquenos de generaciones anteriores. Esto se ha estudiado mediante análisis de espectrofotometría y por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). En el análisis de la reacción del SANA con ambos compuestos por espectrofotometría se observa la desaparición progresiva del pico de máxima absorción del SANA (360 nm) luego de la adición de los tioles, apareciendo un punto isosbético y un nuevo máximo de absorción a 300 nm, lo que sugiere la formación de un nuevo aducto covalente (258) (Figura 1.14B y C). Este nuevo aducto covalente del SANA con dichos compuestos fue confirmado por LC-MS, donde pudimos caracterizarlo (Figura 1.15). Además, dado que la reacción se inhibe en medio

ácido, se plantea que el aducto sea producto de una reacción de adición de Michael (259).

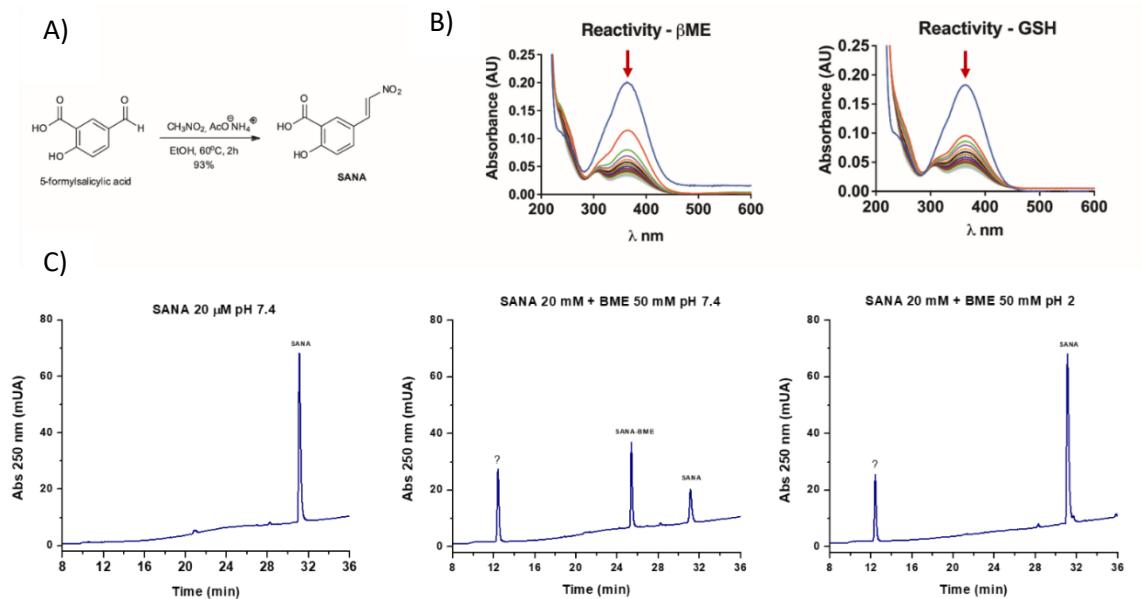
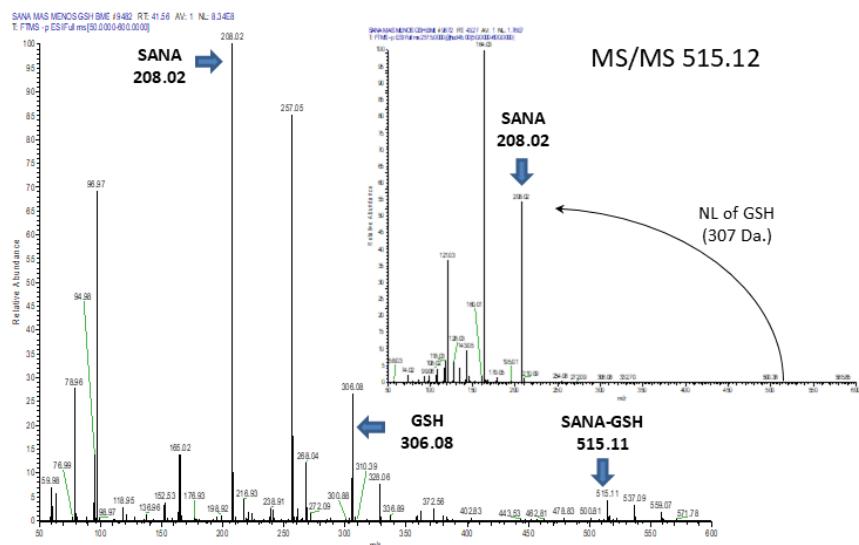


Figura 1.14. Síntesis y caracterización de SANA como electrófilo. A) Esquema resumido de síntesis del SANA a partir del ácido 5-formil salicílico. B) SANA ($10 \mu\text{M}$) se solubilizó en buffer fosfato (20 mM) pH 7.4 y se incubó con β -Mercaptoetanol (BME, $100 \mu\text{M}$) o glutatión reducido (GSH, $100 \mu\text{M}$). El espectro de la reacción se obtuvo entre 200-600 nm, analizando cada 60 s. C) SANA ($20 \mu\text{M}$) se solubilizó en buffer fosfato (100 mM) pH 7.4 o 7.2, incubándose 40 minutos a temperatura ambiente con β -Mercaptoetanol (BME, $50 \mu\text{M}$). Finalizada la reacción se inyectó en una columna de RP-HPLC C30 $250 \times 4.6 \text{ mm}$, en un gradiente 5-55% de fase B (acetonitrilo + 0.1% ácido fórmico) en 30 minutos. Fase A: agua + 0.1% ácido fórmico. Se registraron señales a 360 nm. (A) y (B) tomados de Cal et al, 2025, *Nature Metab.*

Full MS: SANA + GSH, modo negativo



Full MS: SANA+BME, modo negativo

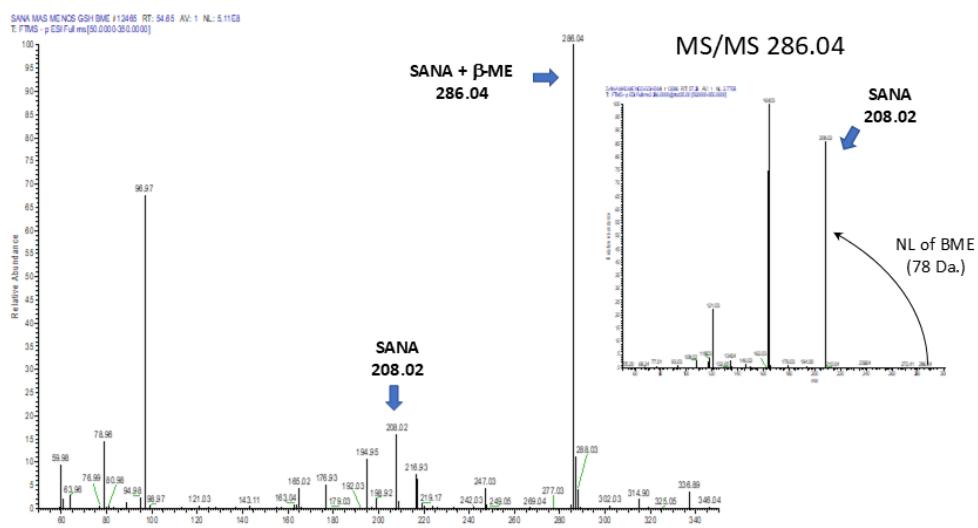


Figura 1.15. Caracterización de la reactividad electrofílica de SANA por LC-MS. Se incubó SANA (10 mM) con GSH (20 mM) o con BME (14 mM) en buffer fosfato 100 mM, pH 7.4. Luego de finalizada la reacción, se inyectó directamente en espectrómetro de masa acoplado a un HPLC (LC-MS) en fase inicial de Acetonitrilo 30%, ácido fórmico 0.1%. Para ambas reacciones se analizó en modo negativo el espectro de masa total (Full MS), detectando el pico de SANA (m/z= 208.02) y los respectivos aductos (SANA + GSH m/z= 515.11; SANA + BME m/z= 286.04). Para confirmar que estos picos se tratan de los aductos, se realizó la fragmentación (MS/MS) de los mismos, obteniéndose un pico mayoritario correspondiente al SANA. La diferencia de m/z entre aducto y SANA, coincide con el de los nucleófilos (GSH = 307, BME = 78).

Como siguiente etapa a la caracterización fisicoquímica, se realizaron estudios de los mecanismos de acción antiinflamatoria del SANA. Tomando en cuenta las propiedades antiinflamatorias del siller estructural (el salicilato) y las de los nitroalquenos derivados de ácidos grasos y del α -tocoferol, se procedió a estudiar el efecto del SANA sobre las principales vías de señalización involucradas en procesos inflamatorios. En lo que respecta a vías proinflamatorias, el SANA inhibe la activación y ensamblado del inflamasoma NLRP3, además de inhibir la vía dependiente de NF- κ B cuando se analiza la expresión de dos citoquinas dependientes de ella (Figura 1.16).

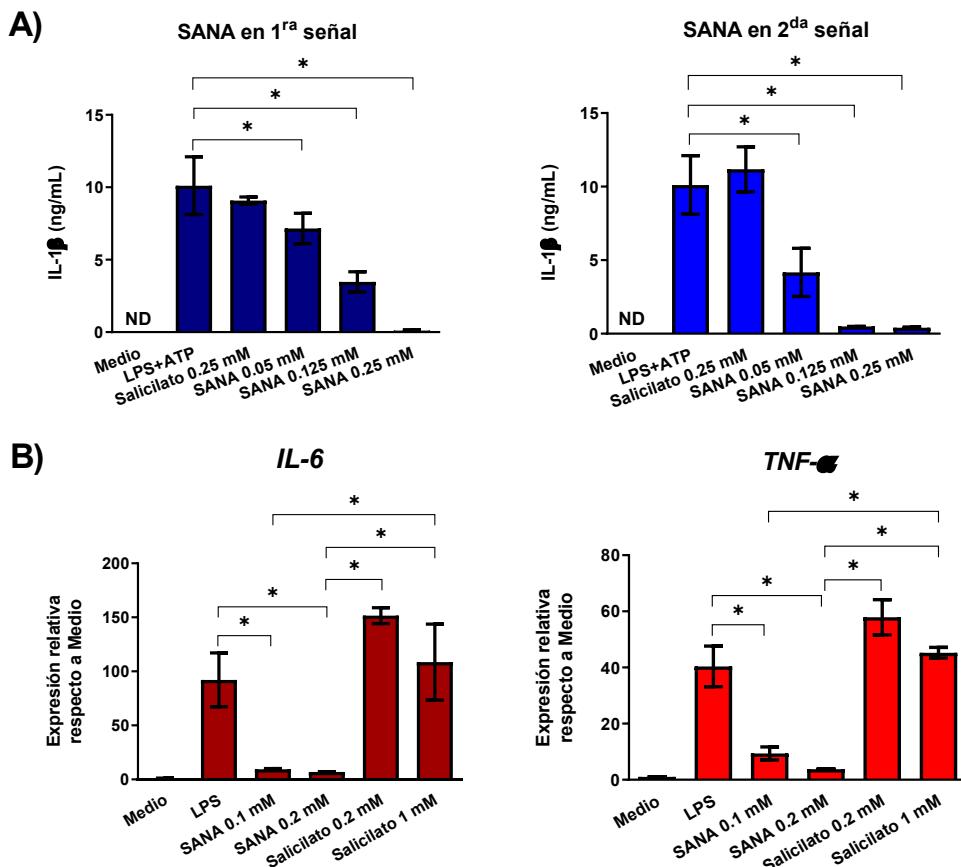


Figura 1.16. SANA inhibe el inflamasoma NLRP3 y NF- κ B. A) SANA inhibe la liberación de IL-1 β dependiente del inflamasoma NLRP3. Macrófagos THP-1 fueron estimulados con una primera señal de LPS (250 ng/mL, 3 hs) seguido de una segunda señal con ATP (5 mM, 45 minutos). Las células fueron tratadas con SANA/Salicilato junto a la primera o segunda señal. Se colectaron los sobrenadantes para medir IL-1 β por ELISA. Datos mostrados como media \pm desvío estándar (SD) de tres experimentos independientes. B) SANA inhibe la expresión génica de IL-6 y TNF- α , reporteros de NF- κ B. Macrófagos THP-1 fueron tratados con SANA/Salicilato por 2 hs. Luego se estimularon las células con LPS (1 μ g/mL, 3 hs). Después de la estimulación se extrajo mRNA con Trizol para analizar expresión génica por qPCR. Datos mostrados como media \pm SD de tres experimentos independientes. Prueba estadística ANOVA-one way, multicomparación Tukey, (*) p \leq 0.05.

En otro punto, el inflamasoma NLRP3 tiene una implicancia en el desarrollo de la alorespuesta que lleva al rechazo (260–264) y SANA es capaz de inhibirlo, lo que también es una razón para que este compuesto pueda modular la alorespuesta.

Recientemente, este compuesto ha mostrado efectos beneficiosos en modelos murinos de obesidad inducidos por dieta rica en grasas, esteatosis hepática y resistencia a la insulina a través de la estimulación de mecanismos metabólicos a nivel de la respiración mitocondrial y termogénesis en tejido adiposo (259). Además, SANA fue sometido a distintas pruebas para evaluar toxicidad y seguridad que fueron requeridas para realizar el ensayo clínico en humanos, desarrollándose la Fase-I a/b en Australia la cual fue culminada con éxito (259).

Como parte de los nitroalquenos de tercera generación, nuestro grupo también ha sintetizado un compuesto que tiene gran similitud estructural con el SANA, que se diferencia únicamente en la ausencia del grupo hidroxilo presente en la estructura química del ácido salicílico. Este compuesto consiste en el *ácido (E)-4-(2-nitrovinil) benzoico (BANA)*, un nitroalqueno derivado del ácido benzoico (265)(Figura 1.17).



Figura 1.17. Estructura química del ácido benzoico (izquierda) y del Nitroalqueno del ácido benzoico, BANA (derecha).

El ácido benzoico es el sillar estructural de este nitroalqueno, el cual ha sido caracterizado por ser una molécula ampliamente usada como conservante de alimentos que es excretada en la orina (266), ha sido utilizada farmacológicamente para tratamiento en desórdenes del ciclo de la urea en niños (267) y se ha mostrado que ejerce efectos neuroprotectores en modelos experimentales de enfermedad de Parkinson y Alzheimer (268,269). Al igual que el ácido salicílico, se necesitan concentraciones muy altas de benzoico para lograr un efecto terapéutico en humanos. En el mismo sentido que se razonó con el SANA, el agregado del grupo funcional nitroalqueno puede mejorar este aspecto. El BANA ha mostrado un efecto beneficioso en un modelo experimental de esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (270), enfermedad neurodegenerativa muy severa que progresivamente provoca parálisis por la destrucción de neuronas motoras. El efecto mostrado en este estudio fue el enlentecimiento de la progresión de la parálisis en los animales tratados con BANA, observando una disminución de la microgliosis a través de un mecanismo dependiente

de la inhibición de NF-κB. Dada su similitud estructural con el SANA y las propiedades que hasta el momento se conocen, el BANA puede ser otra posible herramienta farmacológica para inducir la inmunomodulación de la alorespuesta en trasplantes.

Hemos visto que el inflamasoma NLRP3 es inhibido por los nitroalquenos y modulado por TMEM176B. Este se trata de un complejo multiproteico citosólico que al activarse se ensambla para encender a la Caspasa-1, proteasa que cliva a las interleuquinas IL-1 β e IL-18, importantes citoquinas proinflamatorias (271). Existen diferentes tipos de inflamasomas (272–275), aunque todos tienen en común que necesitan dos señales para su activación, una primera de cebado (“priming”) y una segunda de ensamblado. En particular, el inflamasoma NLRP3 se activa mediante una primera señal de peligro como por ejemplo lipopolisacáridos bacterianos (LPS) y una segunda que promueva el ensamblado mediante cambios en el gradiente iónico de potasio y calcio, como pueden ser el ATP, cristales de colesterol (276), cristales de urato o nigericina. Hay trabajos que muestran un papel importante del inflamasoma NLRP3 y la IL-1 β en promover la respuesta inmune que lleva al rechazo de trasplantes (260–264), lo cual nos llevó a pensar como posibilidad que TMEM176B y SANA modulen la alorespuesta a través de la inhibición del inflamasoma.

Además, y como ya mencionamos, los nitroalquenos inducen a HO-1 (236,237), enzima antioxidante y citoprotectora que ha sido mostrada en bibliografía previa que ejerce importantes efectos favorables en modelos de alotrasplantes de corazón (239,240). Debido a la relevancia que toma en este trabajo, describiremos a continuación a esta enzima.

Hemoxigenasa-1 cumple funciones inmunomoduladoras en trasplantes

Hemoxigenasa-1 (HO-1) es una enzima que tiene funciones citoprotectoras y antioxidantes, cuyo sustrato principal son las moléculas de grupo hemo (Protoporfirina IX de hierro) que se encuentran libres sin estar asociadas a hemoproteínas. Las moléculas de hemo cuando se encuentran en forma libre son prooxidantes debido a que desencadenan la producción de radicales libres como por ejemplo especies reactivas del oxígeno (ROS), generándose condiciones de estrés oxidativo (238).

En humanos y roedores existen dos isoenzimas Hemoxigenasas, llamadas Hemoxigenasa-1 (HO-1) y Hemoxigenasa-2 (HO-2). Ambas son expresadas por los genes *HMOX1* y *HMOX2* respectivamente, siendo que HO-1 se caracteriza por ser de expresión inducible mientras que HO-2 es constitutiva. Esta diferencia en la expresión de ambas hace más probable una rápida inducción de HO-1 en condiciones de estrés oxidativo previniendo la muerte celular en respuesta a agonistas proinflamatorios (238), mientras que HO-2 al ser constitutiva es menos probable que ejerza funciones citoprotectoras frente al hemo libre. Las hemoxigenasas catalizan la degradación de hemo en forma libre, dando como productos hierro Fe $^{2+}$, monóxido de carbono (CO) y biliverdina (BV). El Fe $^{2+}$ pasa a formar parte de complejos con ferritinas como forma de almacenamiento de hierro y la biliverdina es convertida por la biliverdina reductasa (BVR) a bilirrubina indirecta. Esta acción de las hemoxigenasas generando estos productos finales determinan efectos biológicos de citoprotección (Figura 1.18).

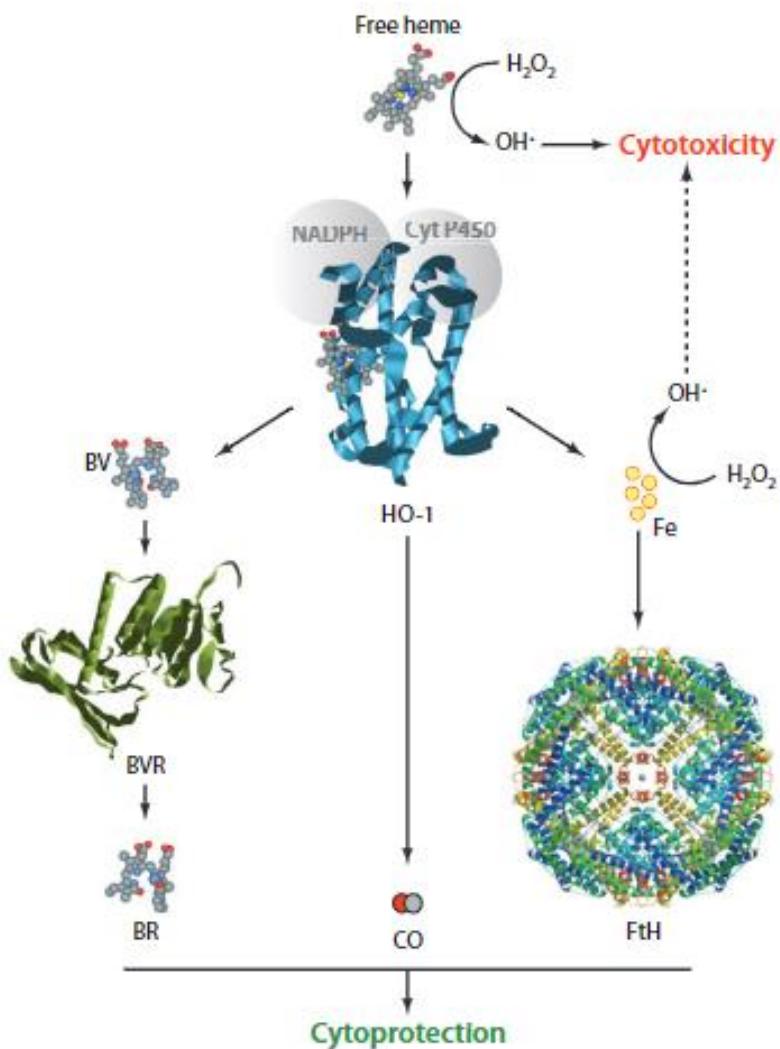


Figura 1.18. Degradación de hemo libre por HO-1. El hemo en forma libre puede catalizar la formación de radicales hidroxilos que generan citotoxicidad. HO-1 degrada el hemo libre a biliverdina (BV) (convertida luego a bilirrubina por la biliverdina reductasa, BVR), monóxido de carbono (CO) y hierro (Fe) que luego es almacenado en ferritinas (FtH). Estos productos finales promueven efectos citoprotectores. Tomado de Gozzelino, R., 2010, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*

La expresión de HO-1 es regulada principalmente a nivel transcripcional por la vía antiinflamatoria/antioxidante Nrf2-Keap1. Nrf2 es un factor de transcripción que en estado basal está localizado en el citosol unido a Keap1, la cual lo mantiene secuestrado e inactivo. En condiciones inflamatorias o de estrés oxidativo, moléculas electrófilas y ROS reaccionan con las cisteínas de Keap1 ocasionando un cambio conformacional que permite la liberación de Nrf2 y su posterior translocación al núcleo. En el núcleo, el factor Nrf2 se une a promotores de genes de elementos de respuesta antioxidante (ARE, sigla en inglés) que codifican la expresión de enzimas de fase 2 con funciones detoxificantes, antioxidantes, citoprotectoras y antiinflamatorias (277,278). Entre este grupo de enzimas se encuentra HO-1, codificada por el gen *HMOX1* englobado en los ARE (238) (Figura 1.19).

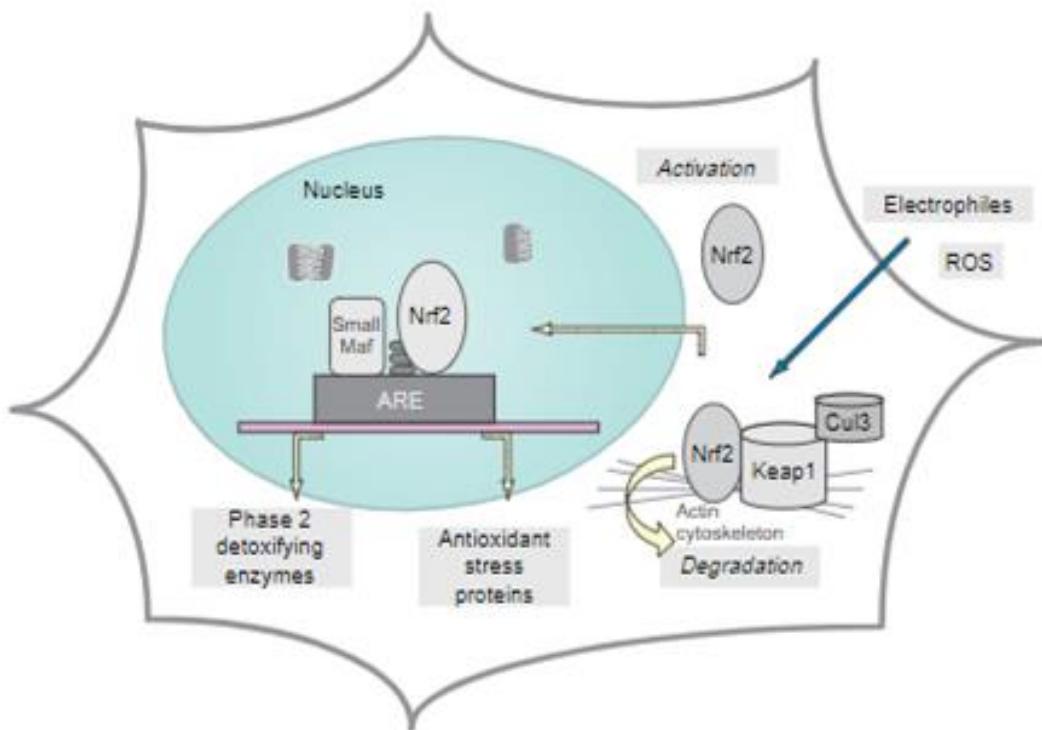


Figura 1.19. Mecanismos moleculares de la vía Nrf2-Keap1. En condiciones basales, Nrf2 se encuentra inactivo en el citosol unido a Keap1, siguiendo las rutas de degradación de proteínas en caso de ausencia de activación. En condiciones de estrés oxidativo, electrófilos y ROS reaccionan con cisteínas de Keap1 liberando a Nrf2 para su translocación al núcleo, uniéndose a promotores de genes ARE que codifican la expresión de enzimas detoxificantes de fase 2 y proteínas antioxidantes. Tomado de Motohashi, H. et al; 2004, *Trends in Mol. Medicine*.

Como se ha mencionado, los nitroalquenos son activadores de la vía Nrf2-Keap1 debido a sus propiedades electrofílicas que les permite reaccionar con cisteínas reactivas de Keap1 permitiendo liberar el factor para que se transloque al núcleo e induzca la expresión de las enzimas de fase 2 (233,235). Además, se ha mostrado que el ácido acetil salicílico induce la expresión de HO-1 a través de la activación de Nrf2 (279) y el salicilato induce conversión de tejido adiposo blanco a un similar marrón (“beiging”) por la polarización de macrófagos M2 debido a la inducción de HO-1 (251), sugiriendo estos datos que el SANA pueda ser también un inductor de HO-1.

HO-1 es por tanto una enzima inducible y su expresión depende principalmente de la activación de Nrf2-Keap1. Se conoce que esta vía es activada es por electrófilos que actúan sobre Keap1, aunque también se ha reportado que existen otras vías que activan Nrf2-Keap1 e inducen HO-1. Además, también se ha reportado que los nitroalquenos derivados de ácidos grasos pueden inducir la expresión de HO-1 a través de la regulación de ERK (280), una proteína señalizadora perteneciente a las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) que describiremos a continuación.

Determinadas vías de las MAPKs pueden llevar a la inducción de HO-1 (281-284). Estas proteínas señalizadoras responden a diversos estímulos de estrés celular y funcionalmente están relacionadas al crecimiento y a desencadenar mecanismos

reguladores contra el estrés. En los vertebrados, las tres principales vías MAPKs son la quinasa extracelular regulada por señalización (ERK), c-Jun quinasa N-terminal (JNK) y p38. Las vías de las MAPKs consisten en una cascada de señalización mediante sucesivas fosforilaciones de quinasas que son desencadenadas por estímulos externos reconocidos por receptores tirosina-quinasa de la membrana celular. En el caso de ERK, los estímulos que la activan son factores de crecimiento, hormonas y citoquinas, mientras que JNK y p38 es por estímulos de estrés celular y proinflamatorios (285). La secuencia de fosforilaciones consiste en tres módulos de quinasas: MAPKKK, MAPKK y MAPK. Las MAPK al ser fosforiladas son activadas y se translocan al núcleo para fosforilar a los correspondientes factores de transcripción, siendo dicha modificación crucial para la expresión génica de importantes proteínas relacionadas a respuestas al estrés, proliferación y diferenciación (Figura 1.20).

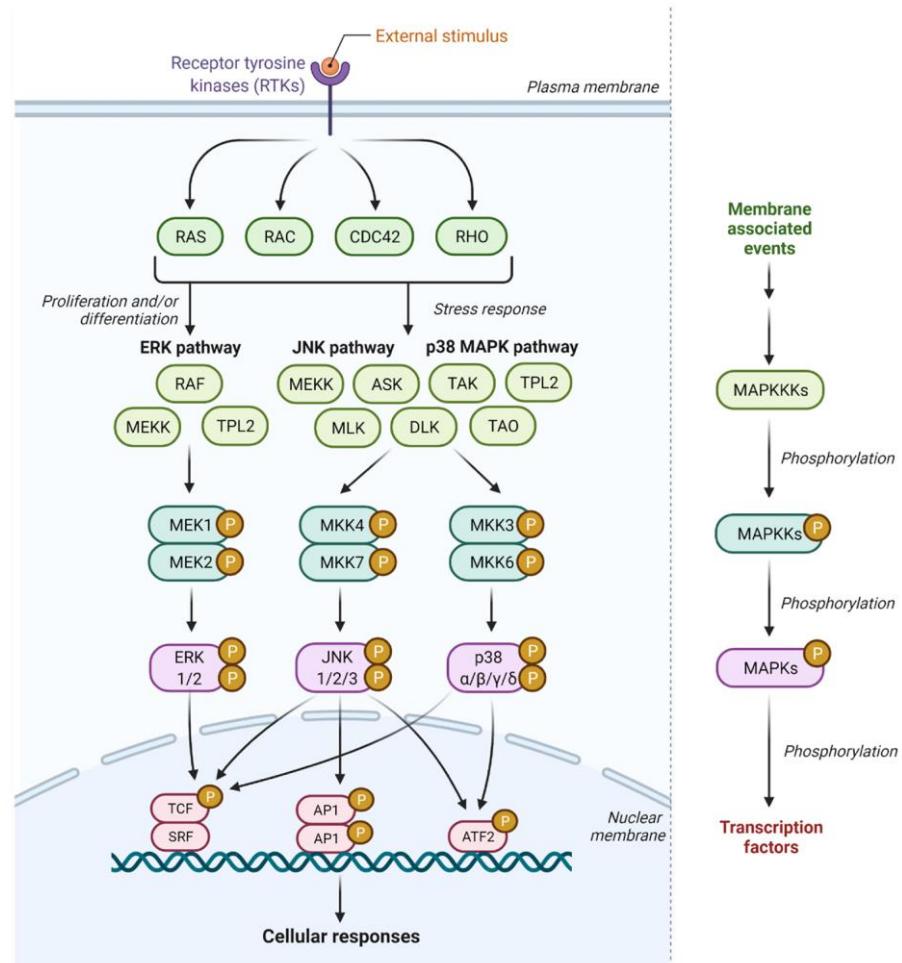


Figura 1.20. Vía de las MAPKs ERK, JNK y p38. La vía de las MAPKs consiste en una cascada de señalización por fosforilación que se desencadena a partir de un estímulo externo a través de receptores tirosina-quinasa (RTKs), componiéndose por tres módulos de quinasas que son las MAPKKK que fosforilan a las MAPKK y estas después a las MAPK. Estas últimas se translocan al núcleo y fosforilan a los factores de transcripción para ejecutar su acción correspondiente. Estas vías están relacionadas a funciones de proliferación, diferenciación y a respuestas de estrés. Tomado de Pua, L.J.W et al.; 2022; *Int. J. Mol. Sci.*

La activación de estas tres vías están relacionadas a la expresión de HO-1 a través de diversos mecanismos. En el caso de ERK, su activación en fibroblastos tratados con Eckol (compuesto florotanino presente en algas) contribuye a la expresión de HO-1 a través de la fosforilación de Nrf2 (281) y en células LMH (hepatoma de ave) el arsenito induce HO-1 vía ERK (282). Por otro lado, se ha reportado que JNK induce en hepatocitos de rata la expresión de HO-1 (283), así como p38 también la promueve por el tratamiento de fitofenoles y curcumina en células epiteliales renales porcinas (284) y por arsenito en células LMH (282).

Otro mecanismo regulador de HO-1 y de Nrf2-Keap1 es la vía de señalización fosfatidil inositol 3-quinasa/Akt (PI3K/Akt). En este sentido, la activación mediante fosforilación de Akt permite que Nrf2 sea fosforilado y en consecuencia se active translocándose al núcleo para inducir la expresión de HO-1 (286) (Figura 1.21). Además, se ha reportado que HO-1 puede ser fosforilada por Akt de manera postranscripcional (287).

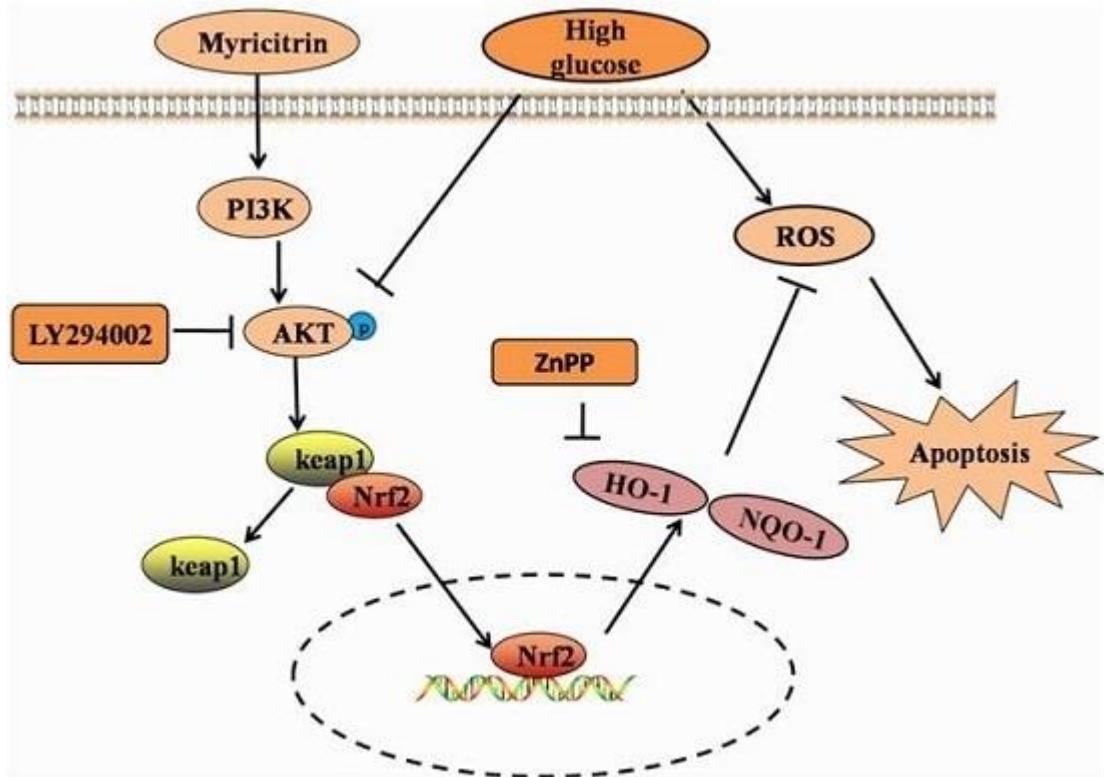


Figura 1.21. Expresión de HO-1 dependiente de PI3K/Akt. La activación de Akt por fosforilación de Ser473 y Thr308 permite que esta quinasa fosforelle blancos importantes para distintas funciones celulares. Dentro de esos blancos se encuentra la vía Nrf2-Keap1, permitiendo la activación de Akt la disociación de Nrf2 y su translocación al núcleo para inducir la expresión de HO-1. Tomado de *Zhang, B. et al; 2016; Molecules*.

La vía PI3K/Akt es importante en la regulación del metabolismo de la glucosa, la respuesta inflamatoria y la protección de la célula contra factores de estrés (288). Las PI3K de clase I son quinasas que fosforilan al lípido fosfatidil inositol y sus derivados en la posición 3 del anillo inositol (289,290), el cual al ser fosforilado recluta proteínas que actuarán como efectores de la vía PI3K. Uno de los principales efectores es la proteína quinasa Akt, siendo reclutada a la membrana plasmática por el fosfatidil inositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3) junto a PDK1 y mTORC2, donde será fosforilada y activada. La activación total requiere de la fosforilación en dos sitios: en la treonina 308 (Thr308) y en la serina 473 (Ser473), catalizados por PDK1 y mTORC2 respectivamente (291). Una vez activada, Akt regula funciones relacionadas a la síntesis de proteínas, expresión génica y supervivencia celular, siendo los blancos directos más estudiados la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) y los complejos TSC1/2 que regulan la vía mTORC1 (154,289) (Figura 1.22). Además, la activación de la vía PI3K/Akt regula la maduración y las funciones de las células dendríticas (292), lo que sugiere que pueda modular la respuesta inmune.

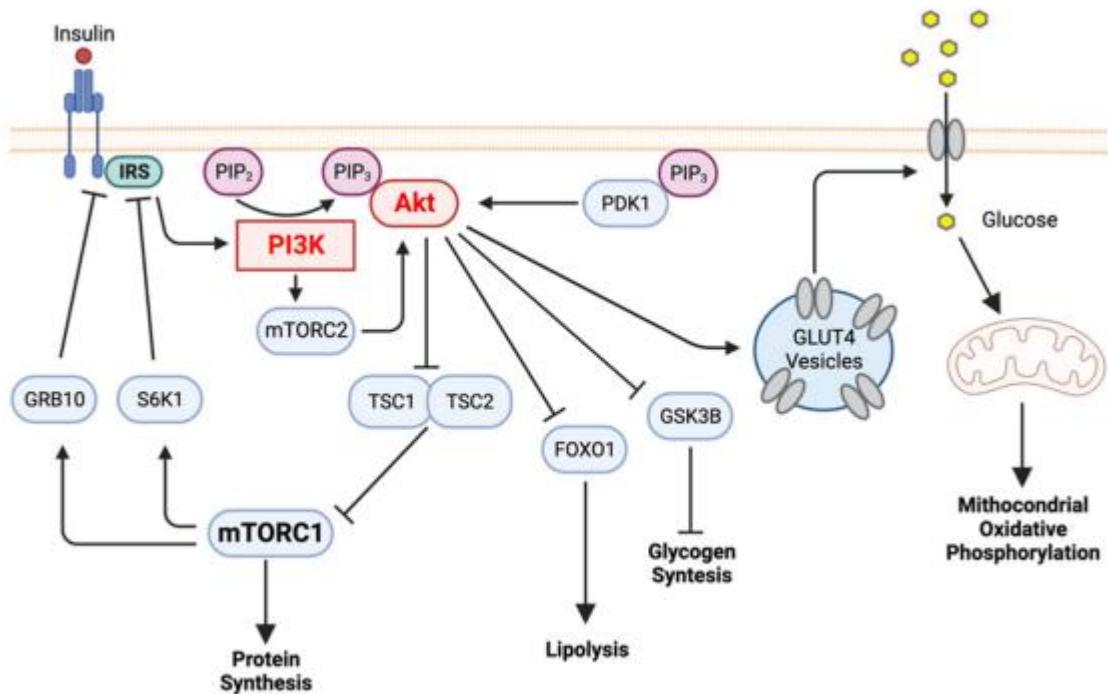


Figura 1.22. Mecanismos de señalización de la vía PI3K/Akt. Ante el reconocimiento de un estímulo como la insulina, se activa mediante señalizaciones de receptores a la quinasa PI3K que fosforila al fosfatidil inositol (PIP₂) de la membrana celular, convirtiéndolo a fosfatidil inositol trifosfato (PIP₃). El PIP₃ recluta a la membrana a PDK1, mTORC2 y Akt, lugar en que ocurre la activación de Akt mediante fosforilación de Ser473 catalizada por mTORC2 y de Thr308 catalizada por PDK1. La activación de Akt desencadena la regulación de diversas funciones actuando sobre blancos vinculados a la síntesis de proteínas, expresión génica y funciones de supervivencia celular, destacándose los complejos TSC1/2 de la vía mTORC1, FOXO1 y GSK-3. Tomado de Acosta-Martinez, M. et al; 2022, *Int. J. Mol. Sci.*

La importancia de que HO-1 sea inducible y expresada a través de diferentes mecanismos de regulación, se debe a su relevancia funcional ya que se trata de una enzima citoprotectora, antioxidante y antiinflamatoria. También se ha estudiado y pasaremos a analizar el papel de HO-1 a nivel del sistema inmune, con propiedades moduladoras tanto a nivel innato como adaptativo.

Se conoce que la expresión de HO-1 disminuye los marcadores de maduración de células dendríticas (293) como CD86 y MHC de clase II, impidiendo que se activen linfocitos T y se desencadenen respuestas efectoras. También se conoce que HO-1 produce CO y este inhibe la proliferación de linfocitos T (294,295). Esta enzima se encuentra mayormente expresada en células de la inmunidad innata, principalmente en macrófagos y células dendríticas, aunque también se ha estudiado que se expresa en linfocitos T CD4⁺ (296) y su expresión en células presentadoras de antígenos promueve la diferenciación y acción de Tregs (297,298).

Centrándonos en las células dendríticas (DCs) que serán objeto de estudio en este trabajo, sabemos que HO-1 se expresa de forma inducible luego de una estimulación como, por ejemplo, LPS (299). Se ha descrito que, cuando HO-1 se encuentra expresada en una célula dendrítica, ocurren mecanismos que contribuyen a la modulación de la

respuesta inmune y a la tolerancia. Una característica que tienen las DCs que expresan HO-1 es que muestran un fenotipo más tolerogénico y con menor maduración (293,300), disminuyendo la expresión de marcadores de superficie como CD40, CD80, CD86, mayor secreción de IL-10 y menores niveles de IL-12 e IL-23 (298). *Esto provoca que la diferenciación de linfocitos T que reconocerán el antígeno presentado por la DC, serán menos efectores y se promoverá una mayor diferenciación de Tregs.* De hecho, en contextos inflamatorios de las vías respiratorias, se ha visto que las DCs que expresan HO-1 promueven la diferenciación de Tregs por los mecanismos que se describieron (298). Esto también se ha observado en contextos de infecciones virales por herpes simple (301), donde las DCs que expresan HO-1 conducen a la expresión de moléculas antiinflamatorias como PD-L1 e IL-10, se generan linfocitos Tregs y además HO-1 preserva la viabilidad de las DCs.

La expresión de HO-1 en células presentadoras de antígenos (APCs) además de favorecer la generación de Tregs, explica las capacidades supresoras de estos linfocitos (297). En el trabajo de *George J. et al, 2008, AJP* (297), se muestra *in vivo* en esplenocitos provenientes de bazo de ratones deficientes en HO-1 (HO-1^{-/-}) que hay más células T que expresan FoxP3 entre las CD4⁺CD25⁺ comparado a los WT. Sin embargo, los linfocitos T CD4⁺CD25⁺ de animales HO-1^{-/-} tienen menor expresión de LAG-3, marcador asociado a la función supresora de los Tregs (302,303). Contrariamente, los experimentos *in vitro* de supresión de células T efectoras muestran que los linfocitos Tregs CD4⁺ FoxP3⁺ CD25⁺ provenientes de ratones HO-1^{-/-} no ven afectada su capacidad supresora comparado a los provenientes de WT. En cambio, cuando se analizó la capacidad supresora de los Tregs sobre las Teff incubado con APCs provenientes de animales HO-1^{-/-}, el efecto supresor es menor respecto a la condición incubada con APCs de WT. *Esto indica que la expresión de HO-1 en células presentadoras como las dendríticas, favorece que las Tregs desempeñen correctamente su función supresora, aspecto que les permite modular la respuesta de las células involucradas en las respuestas efectoras.*

HO-1 también ha sido asociada con el aumento de Tregs en otros contextos como inflamación intestinal y embarazo (304,305), en los que de igual manera que mencionamos anteriormente, el aumento se debe a la presencia de HO-1 en las APCs, particularmente en las DCs. Esto es clave en la funcionalidad supresora de las Tregs, además que su expresión en células dendríticas las conduce hacia un fenotipo tolerogénico que promueve la inducción de Tregs FoxP3⁺ (298). Esto se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* en modelos murinos de inflamación respiratoria y pulmonar, donde la inducción de HO-1 inhibió la maduración de BMDCs estimuladas con LPS. Estas mostraron un fenotipo más tolerogénico, mayor producción de IL-10 y diferenciación de Tregs aumentando las frecuencias. Estos resultados van acompañados de un efecto *in vivo* que disminuye la inflamación respiratoria junto a un incremento de Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ en ratones inyectados con CoPP (inductor de HO-1) (298). *En su conjunto, los datos acumulados posicionan a HO-1 como una proteína inmunomoduladora y tolerogénica, convirtiéndola en un blanco potencial para regular distintas respuestas inmunes. De hecho, HO-1 tiene un papel importante en la modulación de la alorespuesta de trasplantes* (306,307). En modelos de trasplante de

corazón heterotópico en roedores, la sobrevida del corazón trasplantado mejora y se previene el rechazo crónico cuando se sobreexpresa HO-1 (239,240) modulando la alorespuesta mediante la inducción de muerte celular de linfocitos T inducida por activación (AICD, sigla en inglés) (308). Este último punto, junto a los efectos inmunomoduladores ya descritos, sugieren a HO-1 como importante mecanismo modulador de la respuesta al rechazo de trasplantes y potencial blanco farmacológico que pueda ser inducido. Como se ha descrito, los nitroalquenos activan la vía Nrf2-Keap1 que regula la expresión de HO-1, donde específicamente los ácidos grasos nitrados activan la expresión de HO-1 en células endoteliales y se ha visto también que dicho efecto es mediado por mecanismos independientes de Nrf2, como el elemento de respuesta a cAMP (CRE), la vía AP-1 y las interacciones con el elemento de respuesta a E-box (236,237). *Por este motivo, el SANA como un compuesto que tiene el grupo funcional nitroalquenilo podría actuar como inductor farmacológico de HO-1. Esto sumado a que su siller estructural, el salicilato, también ha mostrado efectos inductores de HO-1 en macrófagos de tejido adiposo (251) y su derivado acetilado (ácido acetilsalicílico) activa Nrf2 e induce HO-1 en melanocitos humanos protegiéndolos del estrés oxidativo (279).*

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Tomando en cuenta los efectos moduladores de la inflamación observados para el SANA, sumado a que los nitroalquenos inducen la expresión de la enzima antioxidante y citoprotectora HO-1 y que pueden activar canales iónicos, hipotetizamos que el SANA podría inducir mecanismos activos de regulación de la alorespuesta que favorezcan la sobrevida del aloinjerto.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar los efectos y mecanismos inmunomoduladores involucrados en un posible efecto benéfico del SANA en la alorespuesta que favorezcan la sobrevida del aloinjerto.

Objetivos específicos

1. Estudiar el efecto de SANA en modelos animales de trasplantes.
2. Elucidar los mecanismos reguladores inducidos por SANA y analizar si TMEM176B es activado farmacológicamente por este compuesto.
3. Estudiar el papel de la activación farmacológica de TMEM176B en modelos de trasplantes analizando la sobrevida del aloinjerto.
4. Estudiar los efectos inmunomoduladores de un tratamiento que combine SANA con un inmunosupresor específico por corto tiempo como potencial encare terapéutico.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Los ratones utilizados en este trabajo fueron obtenidos y mantenidos en el bioriego SPF de la Unidad de Biotecnología de Animales de Laboratorio (UBAL) del Institut Pasteur de Montevideo. En el modelo de alotrasplante de piel en contexto de antígenos menores fueron usados ratones de la cepa C57BL/6 y genéticamente modificados para *Tmem176b* (WT y *Tmem176b*^{-/-}) con edad de entre 6 y 12 semanas. En los alotrasplantes de piel en contexto de antígenos mayores se utilizaron donantes de la cepa BALB/c y receptores C57BL/6. Los ratones *Tmem176b*^{-/-} fueron generados de la cadena 129/SvJ y los heterocigotos fueron cruzados por 10 generaciones sobre un fondo C57BL/6 (*Janvier, Saint Berthevin, France*) como se reportó en *Segovia et al., 2014, AJT* (185). En experimentos *in vitro* se colectó de ratones C57BL/6 médula ósea de tibia y fémur para generar células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC). La edad de los animales utilizados fue entre 6 y 20 semanas. Además, se utilizaron ratones BALB/c con similar edad para colectar ganglios y bazo en los experimentos de Reacción Linfocitaria Mixta (MLR) y estimulación de linfocitos T libre de células presentadoras de antígenos (APC-free). Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética en Uso de Animales del Institut Pasteur de Montevideo (CEUA). Para el modelo de alotrasplante de piel corresponden los protocolos N° 002-17 y 005-21, mientras que para los cultivos celulares corresponden los protocolos N° 014-18 y 008-23. Todos los procedimientos con animales fueron ajustados en forma acorde a la metodología aprobada en estos protocolos. El modelo de alotrasplante de corazón en contexto de antígenos mayores fue realizado por nuestros colaboradores en el bioriego del “Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie” (INSERM UMR 1064) de la ciudad de Nantes, Francia. En estos experimentos se usaron ratas Lewis1W y Lewis1A con procedimientos acordes a las reglas éticas de INSERM.

Cultivo de células dendríticas derivadas de médula ósea

Se colectó médula ósea de tibia y fémur de ratones C57BL/6 y se colocaron en placas de Petri de 100mm con medio RPMI GlutaMAX (Gibco-Thermo Fisher) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF, Gibco), buffer HEPES (10 mM, Gibco), Piruvato de sodio (Gibco, aminoácidos no esenciales MEM (Gibco), 2-mercaptopetanol (0.05 mM, Sigma Aldrich), Glutamina (Gibco) y Penicilina-estreptomicina (PenStrep, Gibco). Para la diferenciación se agregó GM-CSF (dilución 1:2000 del sobrenadante stock) al medio celular en los días 0, 3 y 6. Las células se incubaron a 37°C, 5% CO₂ durante 8 días. En el día 3 se agregó 10 mL de medio fresco con GM-CSF y en el día 6 se reemplazaron 10 mL con medio + GM-CSF. Finalmente, las células adherentes se colectan descartando el sobrenadante y agregando PBS-FBS 2%-EDTA 0.7 mM para despegarlas mediante el uso de pipeta.

Modelos animales de trasplante y tratamientos

El modelo de alotrasplante de piel en contexto de antígenos menores fue realizado tomando un trozo de piel de la cola de un ratón macho C57BL/6 para implantarla mediante cirugía menor en la región subescapular izquierda de un receptor hembra de la misma cepa. En el alotrasplante de piel en contexto de antígenos mayores, la diferencia está en el uso de un ratón hembra de la cepa BALB/c del cual se colecta un trozo de piel de la cola. El injerto de piel obtenido del donante consiste en un cuadrado de 1cm² aproximadamente, suturándose en el ratón receptor en los vértices y puntos medios, protegiéndolo durante 7-10 días con gasa y venda. Quince días después de la cirugía se monitorea visualmente el injerto trasplantado cada 48/72 horas, diagnosticando rechazo cuando el tamaño del injerto se retrae más de un 50% y/o se presenta necrosis en más del 10% de la superficie. Las hembras receptoras fueron tratadas con SANA (sintetizado en el Laboratorio de Síntesis Orgánica y Desarrollo de Fármacos, Institut Pasteur de Montevideo)(245,259), Salicilato (Sigma) o BANA (también sintetizado en el Laboratorio de Síntesis Orgánica y Desarrollo de Fármacos)(265,270) a una dosis de 100 mg/kg/día por vía oral, desde el día previo a la cirugía hasta 15 días postrasplante. Ambos compuestos fueron preparados y administrados en suspensión con una solución que contiene Carboximetil celulosa 0.5% m/v (Sigma) y Tween80 0.5% v/v (Sigma).

Para los estudios de HO-1 en la sobrevida se administró el inhibidor Protoporfirina IX de estaño (SnPP, Enzo Life Sciences) a una dosis de 40 mg/kg por vía intraperitoneal en los días -1; 3; 7; 11 y 15 postrasplante. El SnPP fue preparado en una solución de PBS-NaOH 0.1 N que luego fue ajustado a pH 7.4. Como vehículo control se administró PBS. El modelo de trasplante de corazón en contexto de antígenos mayores en ratas fue realizado por nuestros colaboradores del Centre de Recherché en Transplantation et Immunologie, INSERM UMR 1064, Nantes, Francia. El corazón para trasplantar fue extraído de la rata donante de la cepa Lewis 1W y se implantó mediante cirugía en la cavidad abdominal de la rata receptora Lewis 1A, conectando la aorta y vena cava inferior para no alterar la circulación sanguínea normal. El corazón propio de la rata receptora no se interviene y continúa desempeñando su función en forma normal. El tratamiento con SANA y ácido salicílico fue de una dosis de 100 mg/kg vía oral en el mismo vehículo y en igual ventana temporal que en el modelo de trasplante de piel en ratones. Luego se monitorean los latidos del corazón implantado en el abdomen mediante palpación y se diagnostica rechazo cuando estos se detienen.

Western blot

Las BMDC fueron generadas de ratones WT y *Tmem176b*^{-/-}, luego de diferenciadas a día 8 se trataron con SANA (0-0.2 mM) y se incubaron por 24 horas a 37°C, 5 % CO₂. Luego del tratamiento, se colectaron las células mediante raspado con espátula y se lisaron con buffer RIPA (25 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS) suplementado con NaF (5 mM), cocktail inhibidor de proteasas (Roche), β-

glicerofosfato (50 mM), Nicotinamida (5 mM) y ortovanadato de sodio (1 μ M), este último en muestras donde se analizaron fosfoproteínas. El protocolo de lisis consistió en resuspender el pellet de células en el buffer de lisis y se dejó incubando a 4-8°C, 60 minutos en agitación con posterior centrifugación de 10 minutos a 10000 rcf, 4°C. El sobrenadante fue guardado para cuantificar proteínas totales y preparar las muestras para el gel. La cuantificación de proteínas se hizo mediante el ensayo con reactivo de Bradford (Sigma B6916) o kit de BCA (Sigma BCA1-1KT), usando una curva estándar de Seroalbúmina bovina (BSA). Se prepararon las muestras en buffer de carga (Tris-HCl pH 6.8 1M, SDS 10%, Glicerol 25%, 2-mercaptoetanol 25%, azul de bromofenol 0.005%) para sembrar 40 μ g de proteína en gel SDS-PAGE con un marcador de peso molecular Protein Lader PageRuler (Thermo Fisher 26616). Luego se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa mediante transferencia semiseca. La membrana se bloqueó con TBS-T 5% leche descremada o TBS-T 4% BSA por 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4-8°C, en ambos casos con agitación. Los anticuerpos primarios fueron incubados toda la noche a 4°C con agitación lenta y los secundarios 1 hora a temperatura ambiente con agitación lenta. La señal se generó mediante reacción de quimioluminiscencia con sustratos ECL (Thermo 32106), WestPico (Thermo 34080) o WestFemto (Thermo 34094) y se adquirieron las imágenes con el equipo ImageQuant-800 (GE). Finalmente, las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ para cuantificar las bandas de proteínas.

Expresión génica de HO-1 por qPCR

Células THP-1 fueron diferenciadas a macrófagos con Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma P8139) 200 nM, 48 hs. Luego de diferenciados los macrófagos fueron tratados con SANA/Salicilato (0.1 mM) o DMSO 0.1% (vehículo) por 5 horas a 37°C, 5% CO₂. Despues del tratamiento, se descartaron los sobrenadantes, se lavaron las células con PBS y se agregó Trizol Reagent (Thermo-Invitrogen 15596026, 0.25 mL) para comenzar la extracción de ARN. Se resuspendieron las células y se disruptieron con jeringa 27G, se agregó 50 μ L cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos y finalmente se incubó por 2 minutos a 4°C. Los tubos se centrifugaron y se guardó la fase superior de color transparente para realizar la precipitación con isopropanol incubando toda la noche a -20°C. Se centrifugaron los tubos y se lavaron dos veces los pellets con etanol 75%, removiendo luego el etanol dejando secar los pellets por 5-10 minutos. Finalmente, se resuspendieron en agua de calidad para biología molecular (Thermo-Invitrogen 10977-015) para la posterior cuantificación de ARN usando Thermo NanoDrop. La retrotranscripción de 1 μ g de ARN fue realizada usando la enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen 18064-014) siguiendo el protocolo del fabricante. El ADN copia (ADNc, 20 μ g) fue analizado por Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en tiempo real (Real-time qPCR) usando Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche 4913914001) y los cebadores usados fueron sintetizados por Integrated DNA Technology (IDT):

HO-1 humana: Forward 5'-AAGACTGCGTTCCTGCTAAC-3' Reverse 5'-AAAGCCCTACAGCAACTGTCG-3'.

β -actina humana fue utilizado como gen de referencia: Forward 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3' Reverse 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'.

Los niveles de expresión relativa de ARN mensajero (ARNm) fueron calculados usando el método comparativo de CT (309), analizando los datos de expresión relativa de genes usando el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ y normalizando con β -actina.

Análisis proteómico por espectrometría de masa.

Macrófagos THP-1 fueron tratados con SANA 0.1 mM o DMSO 0.1% por 24 hs. Luego del tratamiento, las células fueron lisadas con buffer de lisis NETN suplementado con inhibidor de proteasas. Se cuantificaron proteínas mediante análisis de densitometría en gel de poliacrilamida. Cantidades equivalentes de proteínas de cada muestra fueron corridas en gel SDS-PAGE 12% hasta 1-2 cm, fijándose y revelando con azul de Coomassie R-250 para luego cortar las bandas y proceder a la extracción de péptidos. Las mismas fueron fijadas con una solución de etanol 50% y ácido acético 12%, agitando 10 minutos 5 veces. Se balancearon con buffer de bicarbonato de amonio 0.2 M + Acetonitrilo 50% v/v incubándolas 10 minutos a 30°C con agitación 3 veces. Se agregó acetonitrilo puro para secar las bandas y se procedió a reducir y alquilar las muestras. Primero se hizo la reducción con DTT 10 mM por 1 hora a 56°C con agitación y luego la alquilación de residuos de cisteína con iodoacetamida 55 mM por 45 minutos en agitación a temperatura ambiente. Las muestras fueron secadas nuevamente con acetonitrilo puro y se realizó posteriormente la digestión en gel con tripsina, realizada en buffer de bicarbonato de amonio 50 mM con una concentración final de enzima por muestra de 0.017 mg/mL, incubando toda la noche a 37°C. Los péptidos trípticos se extrajeron cubriendo cada muestra con una solución Acetonitrilo 60%-TFA 0.1% y agitando 1 hora. Se colectaron los sobrenadantes y se concentraron en speed vac 20-25 minutos, resuspendiendo luego en TFA 0.1%-agua. Se removieron las sales mediante ZipTip (Merck Millipore) y las eluciones volvieron a concentrarse en speed vac resuspendiéndose nuevamente en TFA 0.1%-agua listo para inyectar en el espectrómetro de masa Orbitrap Thermo Q Exactive plus. El procesamiento de datos y los espectros fueron analizados usando el software PatternLab for Proteomics V (310). La base de datos fue generada usando un proteoma de *Homo sapiens* descargado de Uniprot (05/12/2016) y los contaminantes más comunes en experimentos de proteómica fueron incluidos. Para la búsqueda se utilizaron los siguientes parámetros: Tolerancia de masa precursora: 40 ppm; Enzima: Tripsina; Especificidad enzimática: total; Clivajes perdidos: 2; Modificaciones: oxidación de metioninas como variable y carboamidometilación como fija. Las coincidencias de espectros fueron filtradas para obtener menos del 1% de la tasa de falso descubrimiento (False Discovery Rate, FDR) en el nivel de proteína. Para comparar los proteomas de macrófagos tratados contra los no tratados, fueron usados diagramas de Venn y módulos T-fold, herramientas proporcionadas por el software de análisis. Los diagramas de Venn permitieron señalar

con precisión proteínas detectadas exclusivamente en una condición biológica utilizando un modo de probabilidad basado en un modelo Bayesiano integrado en el software ($p < 0.05$). Para la cuantificación de proteínas nos basamos en el conteo de espectros, considerando proteínas identificadas en al menos cuatro de seis réplicas biológicas.

Marcación y análisis por citometría de flujo

Los ganglios drenantes y los injertos de piel trasplantados fueron colectados de los ratones trasplantados con sus respectivos tratamientos. El ganglio drenante corresponde al axilar izquierdo y fueron disgregados en una solución de PBS + SBF 2% + EDTA 0.7 mM, se lavaron y se resuspendieron en la misma solución previo a su colocación en placa de FACS. Los injertos de piel fueron colectados y tratados con Colagenasa D (Roche) 2 mg/mL, 20 minutos a 37°C. Luego fueron disgregados de igual forma que los ganglios en PBS-SBF-EDTA y colocados en placa de FACS. En los ensayos *in vitro*, las células fueron colectadas mediante raspado o pipeteo con PBS, lavadas y suspendidas para colocar en placa. Después del procesamiento de los tejidos o células se procedió con los correspondientes marcados, comenzando con dos lavados con PBS o PBS-SBF-Azida de sodio (PSA). La marcación de células muertas se realizó con DAPI en los casos donde no se hizo fijación y con Fixable Viability Dye eFluor506 (eBioscience) cuando se fijaron, el cual se agregó una solución de trabajo diluida 1:1000 en PBS e incubada por 30 minutos en hielo y protegida de la luz. Luego fueron lavadas dos veces con PBS-SBF-Azida y se preparó la mezcla de los anticuerpos de marcadores de membrana en sus correspondientes diluciones y agregados a las células por 20 minutos en hielo y oscuridad. La fijación fue realizada con Paraformaldehído (PFA) 2% durante 10 minutos en hielo y oscuridad. Los marcados intracelulares fueron realizados después de la fijación, permeabilizando con PSA-Saponina 0.5% por 20 minutos en hielo y oscuridad. Se centrifugó la placa y en el caso del marcado para detectar HO-1 se hizo un paso de bloqueo con suero normal de rata 10% por 20 minutos en hielo y oscuridad, seguido de la incubación con los anticuerpos. El marcado para FOXP3 no se necesitó del paso de bloqueo y fue hecho con anti-FOXP3-PE (eBioscience) o su control isotípico anti-Rat-IgG2k (eBioscience) por 90 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Para HO-1 luego del bloqueo se incubó con anti-HO-1 (abcam) o su control isotípico anti-mouse IgG (abcam) incubando el mismo tiempo y condiciones que FOXP3. Luego se hicieron 2 lavados con PSA-Saponina 0.1% y se incubó con un anticuerpo secundario conjugado a Alexa488 (anti-mouse IgG Alexa488, abcam) por 45 minutos en hielo y oscuridad. Finalmente, las células volvieron a fijarse con PFA 2% y se guardaron a 4°C. En el caso de células no fijadas la muerte celular se marcó con DAPI (Roche) 1 µg/mL previo a la adquisición. Las suspensiones celulares fueron adquiridas en los citómetros de flujo Attune NxT (Thermo), Aurora (Cytek), Accuri C6 (BD), FACS Aria Fusion (BD) y Cyan ADP (Beckman Coulter), servicio proporcionado por la Unidad de Biología Celular del Institut Pasteur de Montevideo. El procesamiento de datos fue realizado con el software FlowJo V10.

Reacción linfocitaria mixta (MLR)

Células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) fueron generadas de ratones C57BL/6 y colocadas en placa de 96 pocillos de fondo redondo en el número correspondiente a la proporción que se hizo respecto a las respondedoras. Las células respondedoras se obtuvieron de ratones BALB/c colectando ganglios inguinales, axilares y mesentéricos. Estos se disgregaron y se suspendieron en PBS para su posterior marcación con DDAO/Cell Trace Far Red (CTFR). El marcado con las sondas de proliferación DDAO/CTFR (Thermo) consistió en una incubación de las células con 0.66 μ M de la sonda en PBS libre de suero por 15 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Luego, se detiene la marcación agregando un volumen en exceso de SBF, se centrifuga a 1500 rpm, 5 minutos, 4°C y se lava 2 veces con medio para BMDC. Finalmente se agregan las células de ganglios (50000-100000 células por pocillo) a la placa que contiene las BMDC adheridas. Los tratamientos fueron a las BMDCs previo al MLR con SANA (0.2 mM, 24 hs.), o en el MLR agregando SANA o Salicilato (dosis indicadas en las respectivas figuras) o con SnPP (50 μ M). El MLR se incubó 3-5 días a 37°C, 5% CO₂. Finalmente, las células se colectaron para marcar con anti-TCR y analizar proliferación de linfocitos T por citometría de flujo.

Ensayo de proliferación de linfocitos T APC-free

Linfocitos T fueron purificados a partir de bazo de ratones BALB/c y estimulados con anti-CD3 ϵ (eBioscience) y anti-CD28 (eBioscience). La primera señal consistió en sensibilizar una placa de 96 pozos con anti-CD3 ϵ (1 μ g/mL en PBS) toda la noche a 4°C. Se colectaron los bazos de los ratones, se disgregaron y lisaron los eritrocitos para obtener esplenocitos totales. Linfocitos T totales fueron purificados usando columna magnética con kit de purificación por selección negativa Miltenyi Biotec Pan-T (Miltenyi Biotec 130-095-130), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Las células T purificadas fueron marcadas con Cell Trace Far Red siguiendo el mismo protocolo del MLR para medir proliferación. Posteriormente, se colocaron en la placa sensibilizada previamente con anti-CD3 ϵ las células T marcadas con CTFR (200.000 células/pozo) y el tratamiento con SANA o salicilato (0.2 mM) fue aplicado en este punto junto a la segunda señal anti-CD28 (1 μ g/mL). Se incubaron las células por 72 hs a 37°C, 5% CO₂ y finalmente las células T fueron colectadas para marcar y analizar proliferación por citometría de flujo. Estos experimentos fueron adquiridos en el citómetro BD FACS Aria Fusion y los datos fueron analizados con el software FlowJo V10.

Ensayo de maduración de BMDC

Luego de la diferenciación a día 8 de BMDC a partir de ratones C57BL/6, WT o *Tmem176b*^{-/-}, se colocaron las células en placas de Petri de 3cm y se trataron con inhibidor de HO-1 tin-protoporfirina IX (SnPP) (50 μ M). Luego de 30 minutos se trataron con SANA o salicilato (0.2 mM), se dejaron 30 minutos para agregar finalmente el

estímulo con LPS (250 ng/mL) y dejar incubando por 24 hs a 37°C, 5% CO₂. Las células fueron colectadas y marcadas para análisis de fenotipo de maduración por citometría de flujo usando los siguientes anticuerpos conjugados a fluorocromos: anti-CD11c (BD PECy7), anti-CD86 (BD PE), anti-CD11b (Biolegend PERCP Cy5.5), LyC6-LyCG/Gr-1 (Biolegend FITC) y anti-MHC-II (Biolegend APC). Para marcar muerte celular se utilizó DAPI en muestras no fijadas y Fixable Viability Dye eFluor506 en las fijadas. Una vez marcadas se adquirieron las muestras en los citómetros FACS Aria Fusion (BD) o en Attune NxT (Thermo).

Ensayos de activación e inhibición de Akt y MAPKs

Se diferenciaron BMDC de ratones C57BL/6 o de WT y *Tmem176b*^{-/-}. A día 8, las células fueron tratadas con SANA (0-0.2 mM) por 10, 30, 60 y 180 minutos en los ensayos de activación de Akt, Erk y p38. En los ensayos de inducción de HO-1 inhibiendo Akt, las células fueron tratadas con Triciribina, Akt inhibidor V (Sigma-Calbiochem) 10 µM por 30 minutos, luego se lavaron con PBS para agregar SANA 0.2 mM por 3 horas para analizar activación de Akt o 24 horas para analizar inducción de HO-1. Finalizados los tratamientos, se removió el medio y se levantaron las células para lisarlas y analizar por western blot activación de Akt, Erk 1/2, p38 (proporción de formas fosforiladas/ formas totales) o la expresión de HO-1.

Actividad TMEM176B *in vitro*

Células CHO fueron transfectadas con los plásmidos pmCherry-N1 (plásmido control) o con huTMEM176b-pmCherry-N1 (plásmido que expresa TMEM176B), usando Lipofactamina 2000 por 4 hs y luego incubando las células transfectadas por 24 hs. Despues se cargaron las células con la sonda sensible al sodio ANG-2 (1 mM) incubando por 30 minutos a 37°C, se lavaron e incubaron con 140 mM buffer fosfato contenido sodio o 140 mM del mismo buffer contenido NMDG en sustitución del sodio, esto en presencia o ausencia de las diferentes dosis de SANA, BANA, salicilato o DMSO (vehículo control). Los tratamientos se incubaron por 30 minutos a 37°C y luego se adquirieron las muestras por citometría de flujo en los citómetros Accuri C6 (BD) o Attune NxT (Thermo). ANG-2 fue detectada en ambos citómetros excitando con láser azul de 488 nm y adquiriendo con filtro 530/30, mientras que mCherry en el Accuri C6 se excitó con láser 488 adquiriendo con filtro 670 LP y en el Attune NxT excitando con láser amarillo 561nm y adquiriendo con filtro 620/15. Los datos fueron analizados con el software FlowJo VX 0.7. Los valores mostrados en las figuras representan la resta de los MFI de las muestras con buffer contenido sodio menos los MFI de las muestras control con buffer contenido NMDG.

Análisis estadísticos

Los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM). La significancia estadística fue evaluada por prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías con posterior prueba de múltiple comparación Tukey. Se eligió aplicar ANOVA de una vía (one-way) para comparar una variable cuantitativa a más de dos grupos en un único factor (por ejemplo comparación de tratamientos con vehículo, SANA y Salicilato). En cambio, se elige aplicar ANOVA de dos vías (two-way) para comparar el efecto combinado de dos factores, por ejemplo al comparar por un lado los distintos tratamientos y por otro la delección génica de *Tmem176b* (WT vs *Tmem176b*^{-/-}). La prueba de múltiple comparación posterior al ANOVA (*post hoc*) elegida fue la de Tukey, debido a que es adecuado para comparar más de tres grupos, controlando el error tipo-I (probabilidad de falsos positivos) y manteniendo una buena potencia estadística. Se considera significancia estadística con un resultado de valor $p \leq 0.05$. Previo a los análisis de ANOVA, se verificó si los datos siguen una distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk, debido a que es adecuado para evaluar normalidad en tamaños de muestras pequeños ($n < 50$). La significancia en los análisis de sobrevida fue evaluada mediante la prueba de Log-rank Mantel-Cox, considerando diferencia significativa con un $p \leq 0.05$. La elección de esta prueba estadística es debido a ser la más adecuada para comparar la distribución de sobrevida entre varios grupos, además que considera con mayor peso los tiempos de sobrevida más largos. Los análisis estadísticos fueron realizados con el software GraphPad Prism 8.

RESULTADOS

RESULTADOS

SANA prolonga la sobrevida de alotrasplantes.

Para comenzar, nos planteamos *estudiar los posibles efectos que el SANA tiene en modelos animales de trasplantes*, respondiendo al primer objetivo específico de este trabajo.

Para esto se realizaron experimentos de evaluación de sobrevida de alotrasplantes de piel con incompatibilidad de antígenos menores (“minor-mismatched”) en ratones hembra que recibieron piel de la cola de ratones macho donantes, ambos de la cepa C57BL/6. Los receptores fueron tratados con SANA, salicilato o vehículo (dosis de 100 mg/kg/día por vía oral diariamente desde el día -1 al día 15 postrasplante), evaluándose posteriormente la sobrevida del aloinjerto. El grupo de animales tratados con SANA mostró una significativa prolongación de la sobrevida del aloinjerto de piel respecto al grupo control y también con respecto al grupo salicilato, en los cuales no vimos ningún efecto (Figura 2.1 A, B). Por otra parte, gracias al aporte de nuestros colaboradores del CRTI en Nantes, se evaluó el efecto del SANA en un modelo de alotrasplantes de corazón heterotópico en ratas con incompatibilidad mayor (“fully-mismatched”), observándose los mismos efectos favorables en la sobrevida de los trasplantes en el grupo tratado con SANA, siendo significativamente mejor comparado con el salicilato en este modelo (Figura 2.1 C).

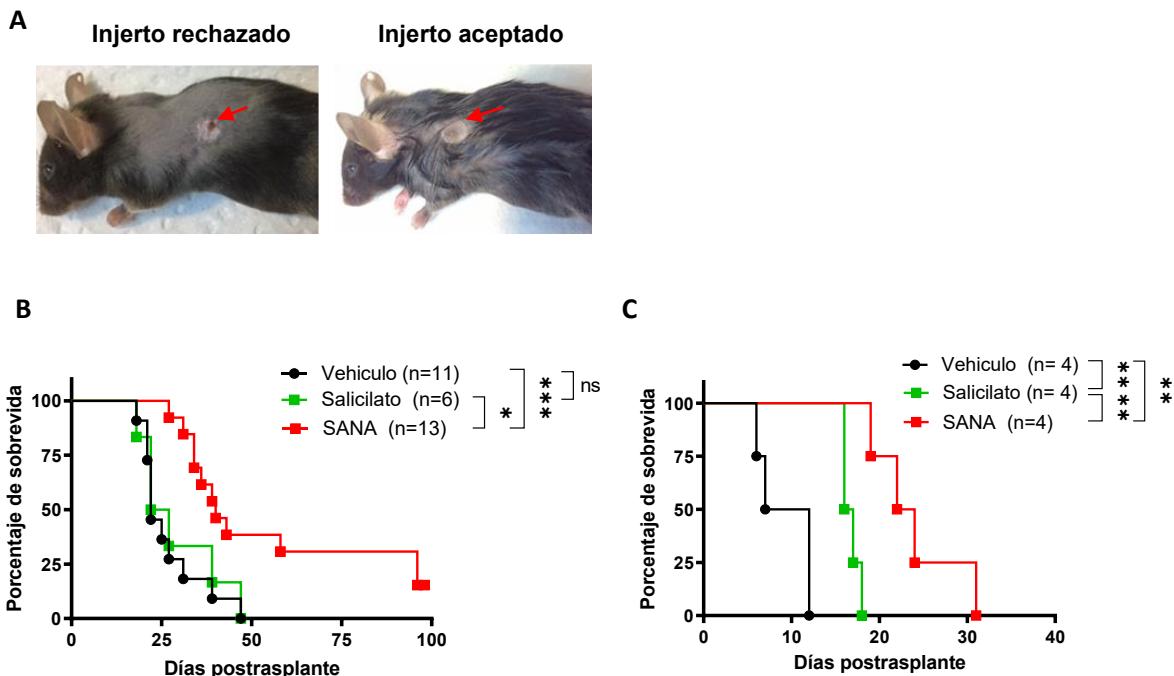


Figura 2.1. Efectos de SANA en la sobrevida de alotrasplantes. A) Imágenes de ratones con trasplante de piel en contexto de antígenos menores, comparando un injerto de piel rechazado (izquierda) y uno totalmente aceptado (derecha). B) Gráfico de sobrevida de trasplantes de piel en ratones en contexto de incompatibilidad menor. Ratones hembra C57BL/6 fueron trasplantados con una porción de piel proveniente de la cola de donantes macho C57BL/6, con un tamaño de 1 cm^2 aproximadamente. El injerto se colocó mediante cirugía en la región subescapular izquierda de las hembras receptoras. Los ratones fueron tratados desde el día -1 al 15 postrasplante con SANA o Salicilato (100 mg/kg, vía oral) o con vehículo (grupo control, Carboximetilcelulosa 0.5% m/v + Tween80 0.5% v/v). Después de la administración, los injertos fueron controlados cada 48/72 hs. Se diagnostica rechazo cuando el trasplante pierde más de un 50% de su tamaño y/o aparece necrosis en más de un 10%. Los datos de sobrevida corresponden al número de animales (n) de cada grupo indicado en la figura, provenientes de tres experimentos independientes. C) Gráfico de sobrevida en trasplante de corazón heterotópico en ratas con contexto de incompatibilidad mayor. Se tomó el corazón de una rata donante de la cepa LEW1W para implantarlo mediante cirugía en la cavidad abdominal de la rata receptora de la cepa LEW1A. Las ratas receptoras fueron tratadas con SANA o Salicilato desde el día -1 al 15 postrasplante. Después del trasplante se controló mediante palpación el corazón trasplantado, siendo diagnosticado el rechazo cuando los latidos se detienen. Los datos de sobrevida corresponden a 4 animales por grupo de un experimento (* p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001. Test estadístico Log-Rank Mantel Cox en análisis de sobrevida.

Como se ha mencionado en la introducción, en el laboratorio se ha diseñado y sintetizado además del SANA otro nitroalqueno con gran similitud estructural: el BANA, derivado nitroalqueno del ácido benzoico. Este compuesto también lo hemos tenido en cuenta para evaluar los efectos en trasplantes para ir contestando la pregunta si los efectos observados para el SANA son genéricos a los nitroalquenos o si también dependen de su siller estructural (el salicilato). Analizamos el efecto del BANA en el modelo de trasplante de piel en contexto de antígenos menores. En este caso, los ratones tratados con BANA (100 mg/kg/día) siguiendo el mismo protocolo aplicado para

el SANA, no mostraron diferencia en la sobrevida en comparación a los tratados con vehículo (Figura 2.2).

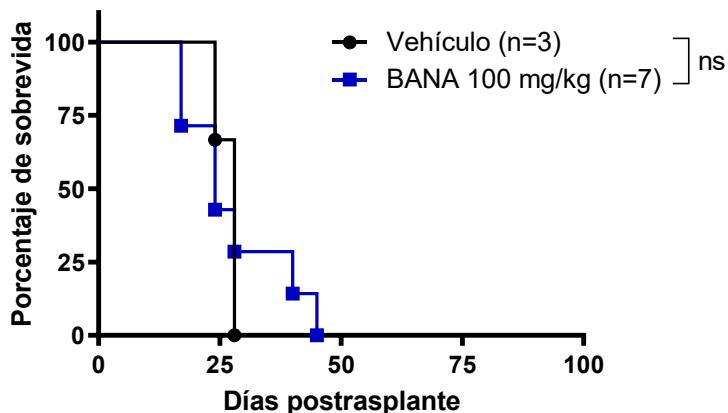


Figura 2.2. Efectos de BANA en la sobrevida de alotrasplantes. Gráfico de sobrevida de trasplantes de piel en ratones en contexto de incompatibilidad menor. Ratones hembra C57BL/6 fueron trasplantados con una porción de piel proveniente de la cola de donantes macho C57BL/6, siguiendo el procedimiento descrito en la Figura 2.1 B. Los ratones fueron tratados desde el día -1 al 15 postrasplante con BANA (100 mg/kg, vía oral) o con vehículo (grupo control). Después de la administración, los injertos fueron controlados cada 48/72 hs. Se diagnostica rechazo cuando el trasplante pierde más de un 50% de su tamaño y/o aparece necrosis en más de un 10%. Datos de sobrevida correspondientes al n de animales por grupo indicado en la figura, provenientes de un experimento representativo de dos independientes. Ns: no significativo. Test estadístico Log-Rank Mantel Cox en análisis de sobrevida.

Los resultados benéficos del SANA en los modelos de trasplantes nos permiten abordar a continuación el estudio de los mecanismos moleculares moduladores por el cual el SANA prolonga la sobrevida de aloinjertos.

La actividad iónica de TMEM176B es activada por SANA

Para abordar el estudio de los mecanismos por el cual el SANA prolonga la sobrevida de trasplantes, inicialmente nos centramos en los siguientes potenciales blancos: TMEM176B como proteína inmunoreguladora (184–186), el inflamasoma NLRP3 que ejerce un papel clave en la alorespuesta y es inhibido por SANA (260–264) (Figura 1.16) y HO-1, enzima citoprotectora que es inducida por los nitroalquenos derivados de los ácidos grasos insaturados y que presenta importantes efectos benéficos en trasplantes (236,237,239,240).

En primera instancia, estudiaremos si **el SANA es capaz de activar farmacológicamente al canal catiónico TMEM176B**, respondiendo al segundo objetivo específico. Se conoce que TMEM176B tiene un papel importante en trasplantes (185,219) y que los nitroalquenos de ácidos grasos insaturados son capaces de activar canales iónicos (219). Por estas razones, estudiamos a TMEM176B como una proteína cuya función pudiese ser regulada por el SANA. Como primer paso, se analizó *in vitro* si el SANA aumenta la actividad iónica de TMEM176B. Para ello, transfecimos células CHO con un plásmido

TMEM176B-mCherry para sobreexpresar esta proteína y poder detectar por citometría de flujo las células transfectadas. Luego, se incubó a las células con la sonda ANG-2 para detectar el sodio intracelular por citometría de flujo, como un indicador de la actividad de TMEM176B como canal catiónico. Las células fueron tratadas posteriormente a la incubación de la sonda con SANA, Salicilato o vehículo para analizar los efectos de estas moléculas sobre su actividad. Al medir la actividad de TMEM176B se observa que el sodio intracelular aumenta en las células transfectadas y tratadas con SANA pero no en las tratadas con salicilato (Figura 2.3).

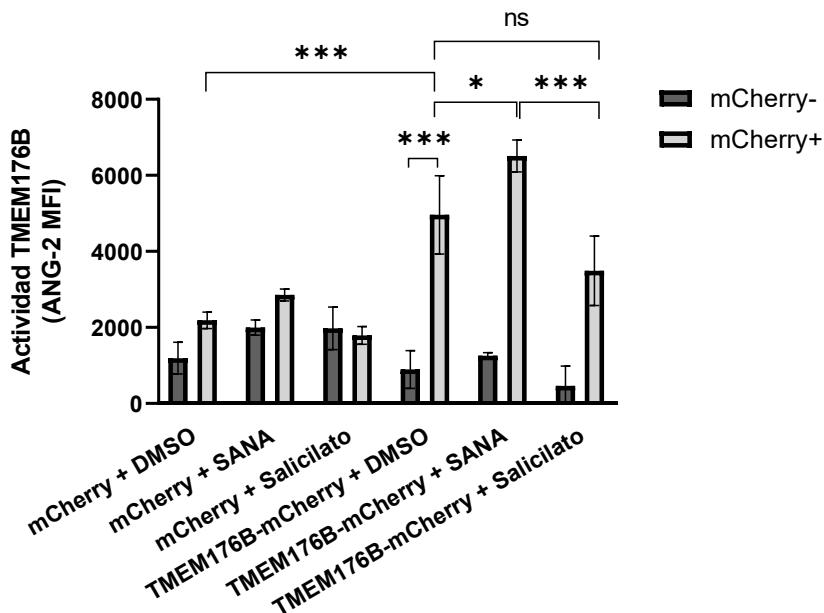


Figura 2.3. Análisis de actividad iónica de TMEM176B. Células CHO fueron transfectadas con plásmido TMEM176B-mCherry o con un control-mCherry. Una vez transfectadas fueron marcadas con la sonda ANG-2 sensible a sodio intracelular. Luego de incubar con la sonda, fueron tratadas con SANA 0.1mM, Salicilato 0.1 mM o DMSO 0.1% por 30 minutos. Valores de tres réplicas por condición expresados como media \pm SEM de un experimento representativo de tres independientes. (*) p \leq 0.05, (*** p \leq 0.001, ns: no significativo, test estadístico ANOVA two-way con test de múltiple comparación Tukey.

También evaluamos que sucede con la actividad de TMEM176B al tratar las células con BANA. Anteriormente observamos que este compuesto no ejerce ningún efecto a nivel de la sobrevida del aloinjerto de piel (Figura 2.2), siendo acompañado de que la actividad iónica de TMEM176B no se vio afectada por el tratamiento con BANA (Figura 2.4). Estos resultados nos sugieren que BANA no ejerce efectos en este modelo de trasplante de piel y no activa a TMEM176B, caso contrario al SANA que prolonga la sobrevida y activa a TMEM176B. Por esta razón, continuaremos utilizando en este trabajo al SANA como herramienta farmacológica en el estudio de los mecanismos inmunomoduladores involucrados en la respuesta de los trasplantes.

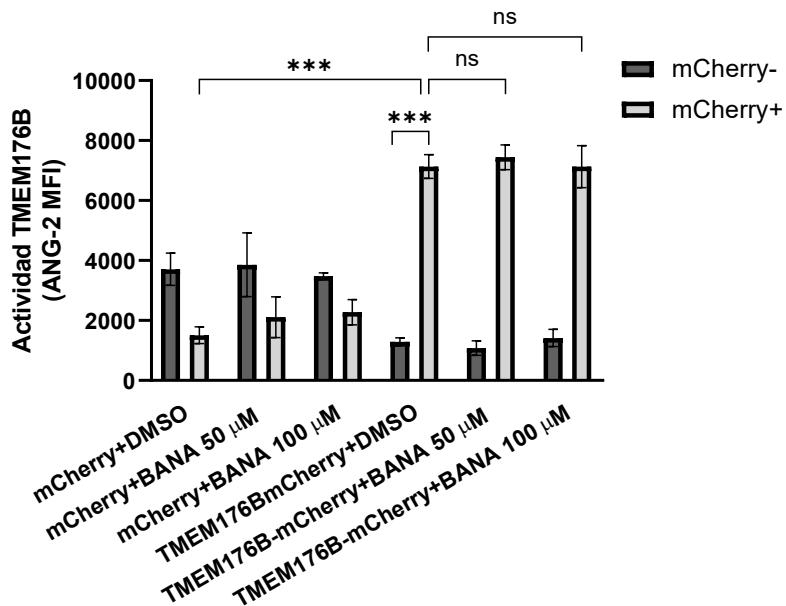


Figura 2.4. Actividad de TMEM176B en células tratadas con BANA. Células CHO fueron transfectadas con plásmido TMEM176B-mCherry o con un control-mCherry. Una vez transfectadas fueron marcadas con la sonda ANG-2 sensible a sodio intracelular (30 minutos). Las células fueron tratadas por 30 minutos con BANA (dosis indicadas) o DMSO 0.1%. La actividad TMEM176B fue medida por citometría de flujo detectando fluorescencia de la sonda ANG-2 en las células mCherry⁺ y mCherry⁻. Valores de tres réplicas por condición expresados como media \pm SEM de un experimento representativo de dos independientes. (*** p \leq 0.001, ns: no significativo, test estadístico ANOVA two-way con test de múltiple comparación Tukey).

El efecto de SANA observado en trasplantes es dependiente de Tmem176b

Conociendo ahora que SANA activa a TMEM176B y tomando en cuenta el papel inmunoregulador estudiado para este canal en los alotrasplantes, se decidió determinar si TMEM176B es clave en el efecto de SANA a nivel de la sobrevida de trasplantes. Para ello se realizó un estudio de sobrevida de los injertos en el modelo de trasplante de piel en contexto de antígenos menores utilizando ratones transgénicos “knock out” (KO) para Tmem176b (*Tmem176b*^{-/-}) y sus correspondientes “wild type” (WT). Cuando los animales solo reciben vehículo, no hay ningún efecto entre los animales *Tmem176b*^{-/-} frente a los WT, pero cuando reciben tratamiento con SANA, los animales WT prolongan la sobrevida del aloinjerto mientras que los *Tmem176b*^{-/-} tratados con SANA no lo hacen, donde la ausencia de Tmem176b impide el efecto de SANA (Figura 2.5).

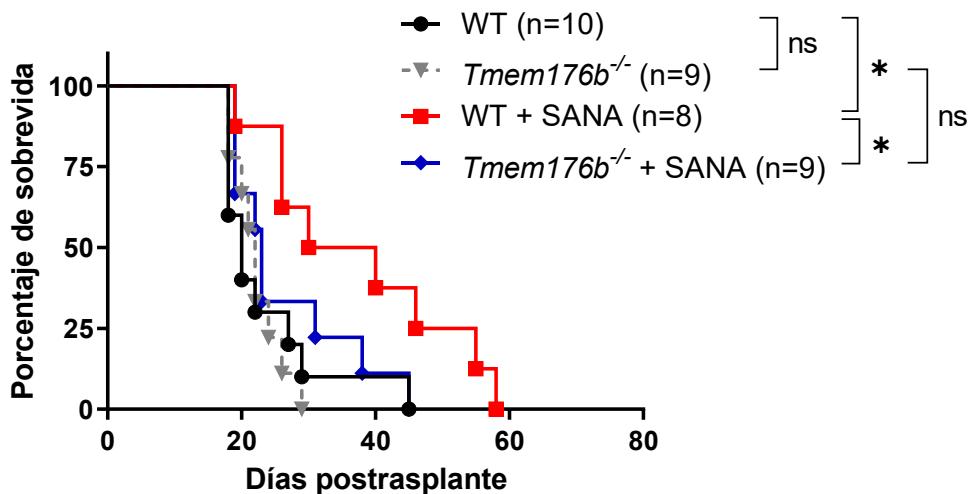


Figura 2.5. Estudio del papel de Tmem176b en la sobrevida en trasplantes de piel en ratones tratados con SANA. Ratones hembra WT o *Tmem176b^{-/-}* fueron trasplantadas con piel de la cola de ratones machos donantes WT y *Tmem176b^{-/-}* respectivamente. La piel fue implantada mediante cirugía en la región subescapular izquierda. Los receptores fueron tratados con SANA (100 mg/kg, v.o.) o vehículo desde el día -1 al 15 postrasplante. Los datos de sobrevida corresponden al n de animales indicado en cada grupo, provenientes de tres experimentos independientes. (*) p ≤ 0.05. Test estadístico Log-rank Mantel Cox.

Por tanto, concluimos que TMEM176B es blanco molecular clave en el efecto benéfico del SANA a nivel de la sobrevida de trasplantes.

La sobrevida del aloinjerto de piel en contexto de antígenos menores no es prolongada por inhibir la actividad del inflamasoma NLRP3

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente, nos preguntamos cuales son los mecanismos inmunomoduladores por los cuales la activación de TMEM176B por SANA ejerce este efecto en alstrasplantes. Una de las hipótesis que manejamos como posible mecanismo que explique el efecto de SANA en la sobrevida de trasplantes es la inhibición del inflamasoma NLRP3. Nosotros observamos que en macrófagos THP-1, el SANA inhibe el inflamasoma (Figura 1.16 A), mientras que ya estaba reportado que TMEM176B también inhibe la actividad de este complejo supramolecular (184). A esto se suma que, en contexto de los trasplantes, la activación del inflamasoma es clave en la alorespuesta promoviendo el rechazo (260,311). Por tanto, el inflamasoma representa un posible blanco clave de la alorespuesta. Para comprobarlo, realizamos un estudio de sobrevida en el modelo de trasplante de piel en contexto de antígenos menores utilizando ratones deficientes en Caspasa-1/11 (*Caspasa-1/11^{-/-}*) y sus WT. Como ya se conoce, esta proteasa es un componente muy importante del inflamasoma, por lo que su deleción implica un bloqueo de la acción del mismo (271). Sorprendentemente, la ausencia de Caspasa-1 no evidenció cambios en la sobrevida de los injertos de piel, rechazando de igual manera que los WT (Figura 2.6).

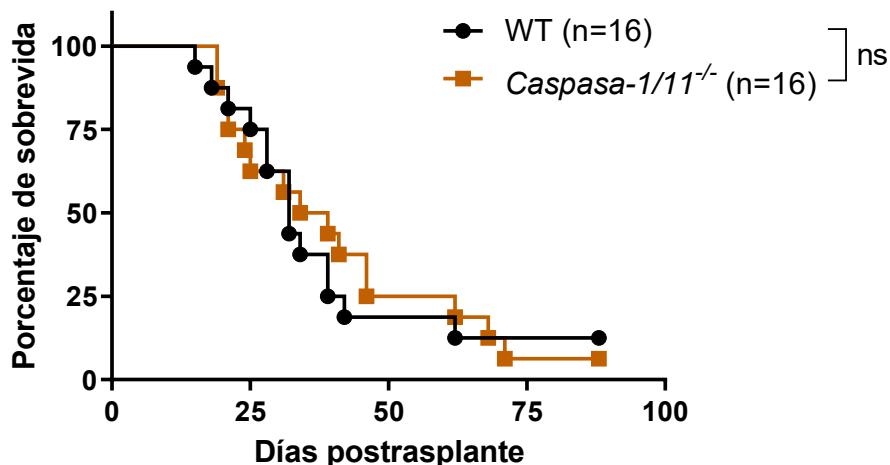


Figura 2.6. Estudio *in vivo* del inflamasoma en la sobrevida de trasplantes. Trasplante de piel en contexto de antígenos menores en ratones receptores hembra WT o *Caspase-1/11^{-/-}* trasplantadas con sus respectivos donantes macho, realizado de igual forma que en experimentos anteriores. Los datos de sobrevida corresponden al n de animales indicado en cada grupo, provenientes de tres experimentos independientes. Test estadístico Log-Rank Mantel Cox, ns: no significativo.

Este resultado no muestra un efecto dependiente del inflamasoma NLRP3 en la sobrevida del injerto en este modelo, por lo que decidimos continuar el estudio mecanístico analizando otro blanco farmacológico del SANA.

SANA induce *in vitro* la expresión de HO-1 en macrófagos y células dendríticas

Los nitroalquenos son inhibidores de importantes vías proinflamatorias y activadores de vías antiinflamatorias, antioxidantes y citoprotectoras, siendo relevante en estas últimas la inducción de la expresión de HO-1 de manera dependiente e independiente de la vía Nrf2-Keap1 (236,237). Para esto se necesitaba confirmar si el SANA efectivamente inducía a HO-1, donde obtuvimos un primer resultado luego de realizar un análisis proteómico en macrófagos THP-1 tratados con SANA durante 24 horas. De dicho análisis, obtuvimos 46 proteínas presentes exclusivamente en las células tratadas con SANA, destacándose dentro de ese conjunto de proteínas la presencia de HO-1 como una de las proteínas con mayor expresión diferencial en esa condición (Figura 2.7 A)(lista de proteínas en Anexo 2). Esto confirma que, al menos en esas condiciones experimentales, el SANA conserva la propiedad de otros nitroalquenos sobre HO-1 y nos dirige a investigar a HO-1 en el contexto de trasplantes como posible actor mecanístico en el efecto inmunomodulador del SANA.

Para confirmar el resultado obtenido por proteómica, analizamos la expresión de HO-1 tanto a nivel transcripcional (mediante qPCR) como de la expresión proteica (por western blot), observando que en células THP-1 tratadas con SANA (0.1 mM por 5 horas)

se induce la expresión génica de HO-1 (Figura 2.7 B), mientras en células dendríticas (BMDC) tratadas con SANA (0.2 mM por 24 horas) se induce HO-1 a nivel de proteína (Figura 2.8).

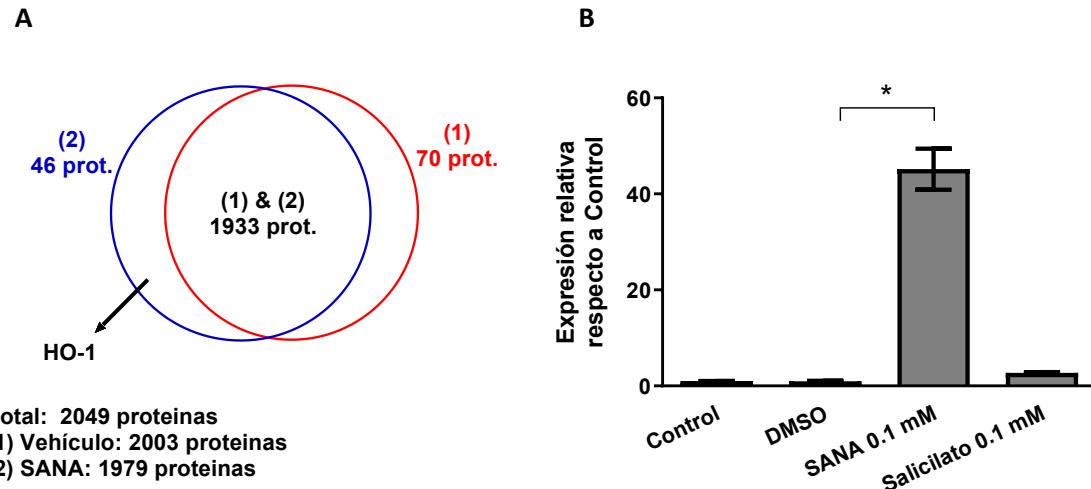


Figura 2.7. Estudio de la expresión de HO-1 en macrófagos THP-1. A) Análisis proteómico de macrófagos THP-1 tratados con SANA o vehículo (DMSO). Células THP-1 fueron diferenciadas a macrófagos. Luego fueron tratadas con SANA 0.1 mM o DMSO 0.1% por 24 hs. Luego fueron lisadas y procesadas para realizar la digestión en gel con tripsina y extraer los péptidos. Finalmente, las muestras fueron inyectadas en el espectrómetro de masa con sistema LC/MS y los datos fueron procesados utilizando el software Pattern Lab for Proteomics V. Para la cuantificación de proteínas, nos basamos en los recuentos espectrales, considerando proteínas identificadas en al menos 4 de las 6 réplicas biológicas. Los diagramas de Venn muestran el número de proteínas identificadas significativamente en cada condición ($P \leq 0.05$). B) Expresión génica de HO-1 por qPCR. Macrófagos THP-1 fueron tratados con SANA o Salicilato (0.1 mM) o con DMSO 0.1% (Vehículo), incubándose durante 5 horas. Luego se extrajo ARN total con Trizol reagent y la expresión génica de HO-1 fue cuantificada por RT-qPCR. El gráfico representa los resultados de dos experimentos independientes. Valores de dos réplicas expresados como media \pm SEM de dos experimentos independientes. (*) $p \leq 0.05$. Test estadístico ANOVA one-way con test de múltiple comparación Tukey.

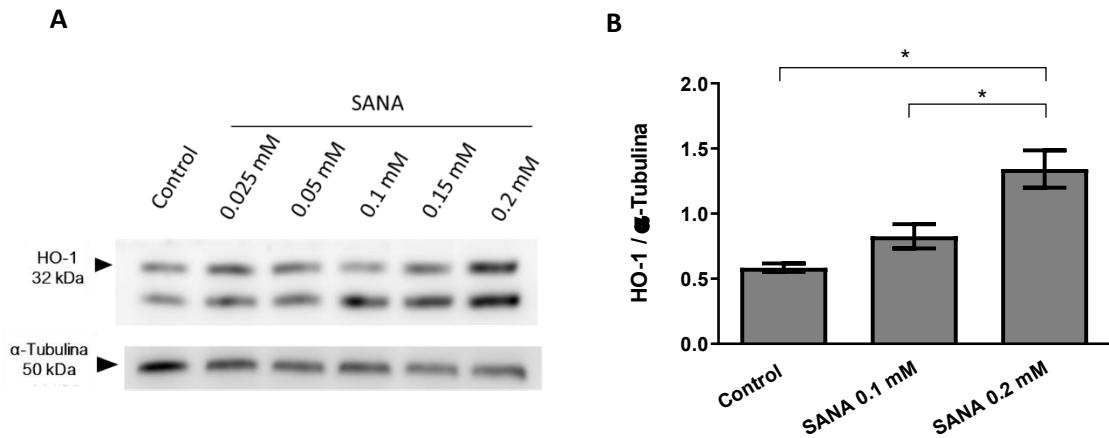


Figura 2.8. Expresión proteica de HO-1 en BMDC. A) BMDC fueron tratadas después de la diferenciación con SANA (0.1-0.2 mM) por 24 hs. a 37°C, 5% CO₂. SANA fue vehiculado en el medio celular y el control fue tratado solo con medio. Después de la incubación se colectaron y lisaron las células para analizar expresión de proteína HO-1 por western blot. B) Gráfico de cuantificación de las bandas representando la proporción de HO-1/Tubulina usando el software ImageJ. Valores de tres réplicas expresados como media ± SEM de tres experimentos independientes. (*) p ≤ 0.05. Test estadístico ANOVA one-way con test de múltiple comparación Tukey.

SANA induce la expresión de HO-1 *in vitro* e *in vivo* en células dendríticas de manera parcialmente dependiente de Tmem176b.

Hasta el momento, tenemos que SANA activa a TMEM176B y además induce la expresión de HO-1. Con estos resultados a la vista, nos planteamos la pregunta sobre un posible vínculo entre la actividad de TMEM176B y la expresión de HO-1, modulación sobre la que no existen datos aún.

Para comenzar dilucidando esta hipótesis, analizamos la expresión de HO-1 por western blot en BMDCs *Tmem176b*^{-/-} y WT, tratadas con diferentes dosis de SANA durante 24 horas. El resultado es que SANA induce la expresión de HO-1 en todas las condiciones, pero en las células *Tmem176b*^{-/-}, la expresión fue significativamente menor respecto a las WT (Figura 2.9 A, B). Por lo tanto, la expresión de HO-1 inducida por SANA es parcialmente dependiente de *Tmem176b*.

Obtenido este resultado, decidimos analizar *in vivo* el efecto de SANA en células mieloides y si ello dependía de *Tmem176b*. Para ello se realizaron los trasplantes de piel como en la Figura 2.1 B, donde al día 15 postrasplante se colectaron los injertos de piel y el ganglio drenante (dLN) de ratones *Tmem176b*^{-/-} y WT tratados con SANA o vehículo. Los tejidos fueron procesados para analizar HO-1 en células mieloides mediante citometría de flujo. Como se observa en la siguiente figura, en el grupo tratado con SANA, las células dendríticas CD11c^{hi} MHC-II⁺ CD11b⁺ en el injerto de piel tienen menor porcentaje de células HO-1⁺ en *Tmem176b*^{-/-} que en las WT, mientras que en las células CD11c^{hi} MHC-II⁺ CD11b⁻ no se observaron diferencias (Figura 2.9 C, D).

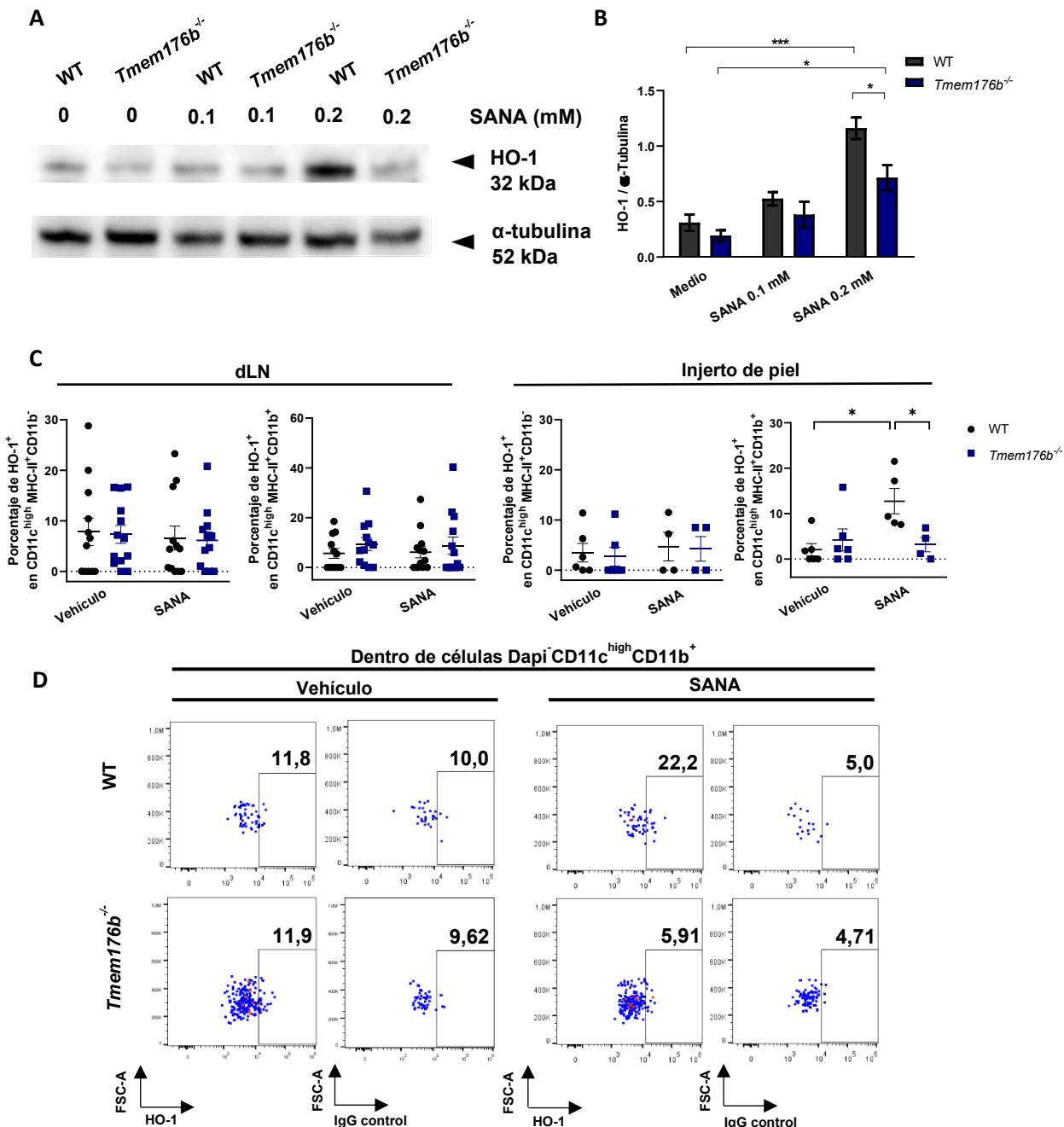


Figura 2.9. Función de *Tmem176b* en la expresión de HO-1. A) Inducción de HO-1 en BMDC dependiente de *Tmem176b*. BMDCs provenientes de ratones *Tmem176b*^{-/-} o WT fueron tratadas después de diferenciadas con SANA (0.1-0.2 mM, vehiculado en medio celular) por 24 hs. at 37°C, 5% CO₂. Después del tratamiento se colectaron y lisaron las células para analizar expresión proteica de HO-1 por western blot. B) El gráfico representa la cuantificación de la banda correspondiente a HO-1 normalizado al control de carga α -tubulina usando el software ImageJ. Valores de tres réplicas expresados como media \pm SEM de tres experimentos independientes. (*) p ≤ 0.05, (*** p ≤ 0.001. Test estadístico ANOVA two-way con test de múltiple comparación Tukey. C, D) Análisis *in vivo* de poblaciones de células dendríticas que expresan HO-1. Ratones hembra WT o *Tmem176b*^{-/-} fueron trasplantados con piel de la cola de ratones machos donantes WT y *Tmem176b*^{-/-}, respectivamente. Los receptores fueron tratados con o sin SANA (100 mg/kg, v.o.) desde el día -1 al 15 posttrasplante. A día 15, el injerto de piel y el dLN fueron colectados y procesadas para detectar células mieloides que expresan HO-1 (MHC-II⁺ CD11c^{hi} y CD11b⁺ para cDC2 o CD11b⁺ para cDC1) por citometría de flujo. Datos expresados como media \pm SEM de dos experimentos independientes. (*) p ≤ 0.05. Test estadístico ANOVA two-way con test de múltiple comparación Tukey.

La regulación de la expresión de HO-1 a través de TMEM176B activado por SANA tiene como intermediario un mecanismo dependiente de Akt.

Nuestros resultados mostraron que la expresión de HO-1 inducida por el tratamiento con SANA es parcialmente dependiente de TMEM176B. Esto nos lleva a investigar el mecanismo que está involucrado en la regulación TMEM176B/HO-1, siendo los principales candidatos las vías de señalización de las MAP quinasas (MAPK) y la vía PI3K/Akt. Nos planteamos que estas vías pudieran estar involucradas como intermediarios debido a que está descrito que TMEM176B activa a Akt cuando es sobreexpresado en células de cáncer de mama (312), además que Akt y la MAPK p38 tienen un papel en la expresión de HO-1 (286). Además, los nitroalquenos activan a ERK (280), otra MAPK que también ha sido descrita que promueve la inducción de HO-1 (281,282). En base a esto, analizamos las fosforilaciones de Akt, ERK y p38 en BMDCs *Tmem176b^{-/-}* y WT tratadas con SANA (Figura 2.10 A-B y 2.11). Las células WT tratadas con SANA muestran un incremento de la fosforilación de Akt en la Serina 473 en comparación con las *Tmem176b^{-/-}* que no muestran cambios (Figura 2.10 A y B). Además, se observa que las BMDCs *Tmem176b^{-/-}* no tratadas tienen mayor Akt fosforilada respecto a las WT (Figura 2.10 A y B).

Seguidamente analizamos por western blot si al inhibir la activación de Akt con triciribina se ve afectada la inducción de HO-1. Para ello, las BMDC fueron tratadas primero con triciribina (10 μ M por 30 minutos) y luego con SANA (0.2 mM por 24 horas). Observamos un aumento de la expresión de HO-1 en BMDCs tratadas con SANA y una disminución significativa cuando se inhibe Akt con triciribina (Figura 2.10 C y D).

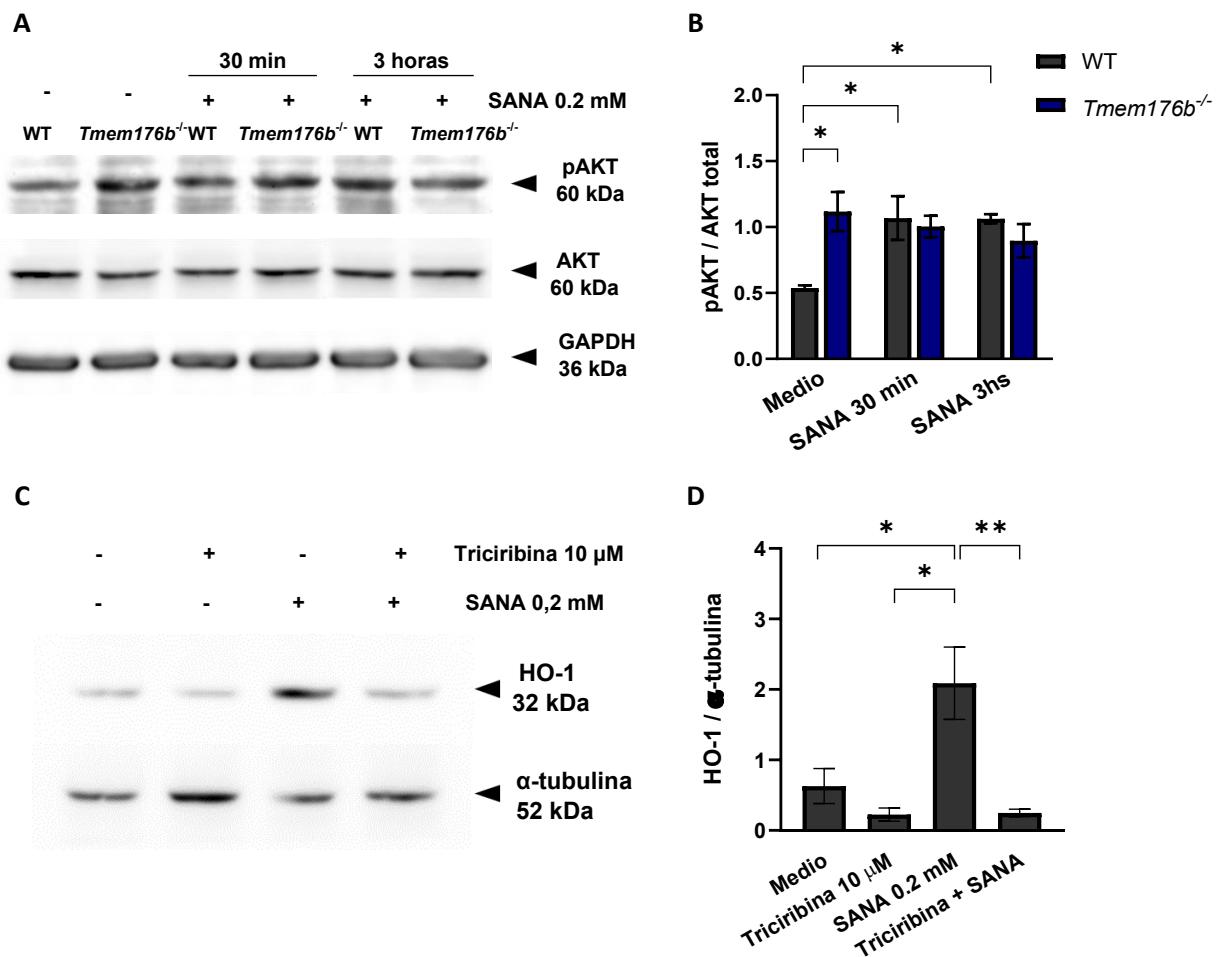


Figura 2.10. Estudio de la activación de Akt como mecanismo de inducción de HO-1. A) Activación de Akt en BMDC *Tmem176b*^{-/-} y WT. BMDCs provenientes de ratones *Tmem176b*^{-/-} o WT fueron diferenciadas y tratadas con SANA (0.2 mM, 30 minutos y 3 horas). Luego de la incubación, las células se colectaron y lisaron para analizar pAkt (Ser473) y Akt total por western blot. B) El gráfico muestra la proporción de pAkt/Akt total. Datos de tres réplicas expresados como media \pm SEM de tres experimentos independientes. (*) p \leq 0.05. Test estadístico ANOVA two-way con test de múltiple comparación de Tukey. C) Inducción de HO-1 inhibiendo Akt. BMDCs provenientes de ratones C57BL/6 fueron tratadas con Triciribina (inhibidor de Akt) 10 μ M por 30 minutos y luego se lavaron con PBS para tratar con SANA 0.2 mM por 24 hs. Las células fueron colectadas y lisadas al finalizar el tratamiento para analizar expresión proteica de HO-1 por western blot. D) La gráfica muestra la cuantificación de la banda correspondiente a HO-1 normalizada al control de carga α -tubulina, con datos de tres réplicas expresados como media \pm SEM, provenientes de tres experimentos independientes. (*) p \leq 0.05, (**) p \leq 0.01. Test estadístico ANOVA one-way con test de multiple comparación Tukey.

También se analizó en BMDCs *Tmem176b*^{-/-} y WT, si desde un punto de vista mecanístico p38 y ERK estaban involucradas en la regulación del eje SANA-Tmem176b-HO-1. Al estudiar la activación por fosforilación de estas vías por western blot, no se observaron efectos (Figura 2.11).

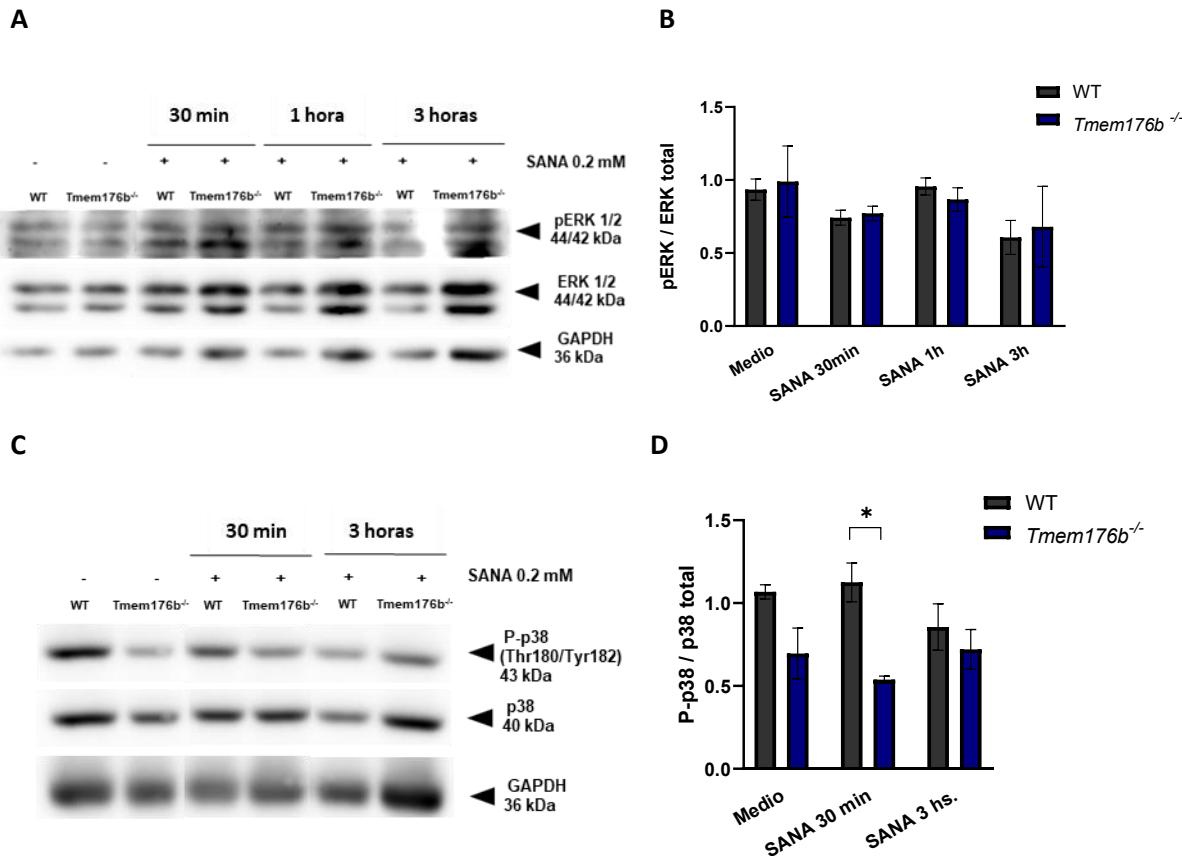


Figura 2.11. Estudio de la activación de MAPKs como mecanismo de inducción de HO-1. BMDCs provenientes de ratones *Tmem176b*^{-/-} y WT fueron tratadas con SANA 0.2 mM por 30 minutos, 1 hora y 3 horas. Finalizados los tratamientos se colectaron y lisaron las células para analizar por western blot A) pERK 1/2 y ERK 1/2 total, C) P-p38 y p38 total. Los gráficos muestran la cuantificación correspondiente a las bandas y la proporción entre: B) pERK/ERK total y D) P-p38/p38 total, datos de tres réplicas expresadas como media ± SEM, provenientes de tres experimentos independientes. (*) p ≤ 0.05. Test estadístico ANOVA two-way con test de múltiple comparación de Tukey.

SANA modula la maduración de células dendríticas.

Nuestros resultados sugieren un mecanismo en que la activación farmacológica de TMEM176B por SANA promueve la inducción de HO-1 a través de Akt (Figura 2.10). Nos propusimos entonces demostrar funcionalmente que este mecanismo está involucrado en la modulación de la respuesta inmune, comenzando por el estudio de la maduración de las células dendríticas ya que tanto TMEM176B como HO-1 modulan la maduración de estas células (190,192,293). Además, existen reportes indicando que el ácido acetil

salicílico (Aspirina®) inhibe dicha maduración (313). Debido a la similitud que el SANA tiene con este fármaco, nos pareció importante explorar si tiene un efecto sobre la maduración de las células dendríticas.

Se analizaron los cambios en el fenotipo de maduración en BMDCs, midiendo la expresión (en porcentaje) de las moléculas MHC de clase II y CD86. Como vemos a continuación, la maduración de las BMDCs inducida por LPS es inhibida de manera significativa por el SANA, mientras que el salicilato (sillar estructural del nitroalqueno) no la inhibe (Figura 2.12).

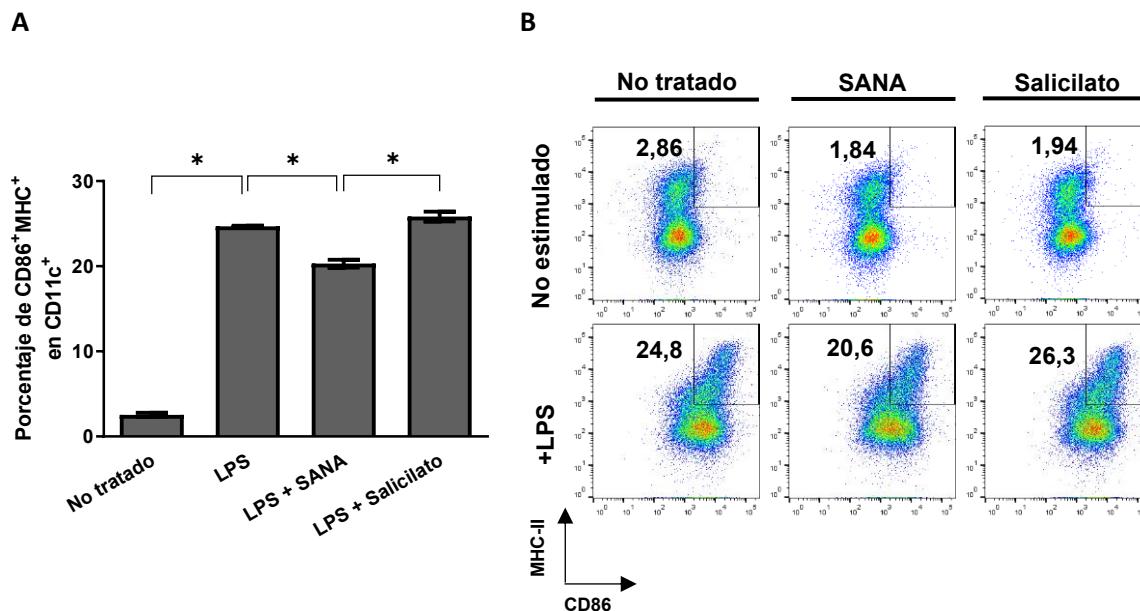


Figura 2.12. Análisis de la maduración de células dendríticas tratadas con SANA. BMDCs fueron tratadas con SANA o Salicilato (0.2 mM) y con LPS (250 ng/mL) por 24 hs. La maduración de células dendríticas fue analizada por citometría de flujo considerando la población celular MHC-II⁺ CD86⁺ en CD11c⁺. El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el software FlowJo V10. Los datos de tres réplicas se muestran como media ± SEM de un experimento representativo de tres independientes. (*) p ≤ 0.05. Test estadístico ANOVA one-way con test de múltiple comparación Tukey.

Se ha reportado que la expresión de HO-1 inhibe la maduración de células dendríticas (293). En ese sentido, estudiamos su rol en la maduración de BMDCs tratándolas con un inhibidor conocido de la actividad de HO-1, la protoporfirina IX de estaño (SnPP). Observamos que, en presencia de este inhibidor, las células tienen porcentajes similares de expresión de MHC-II⁺ y CD86⁺ que la condición no tratada, mientras que la condición tratada con SANA muestra porcentajes menores (Figura 2.13).

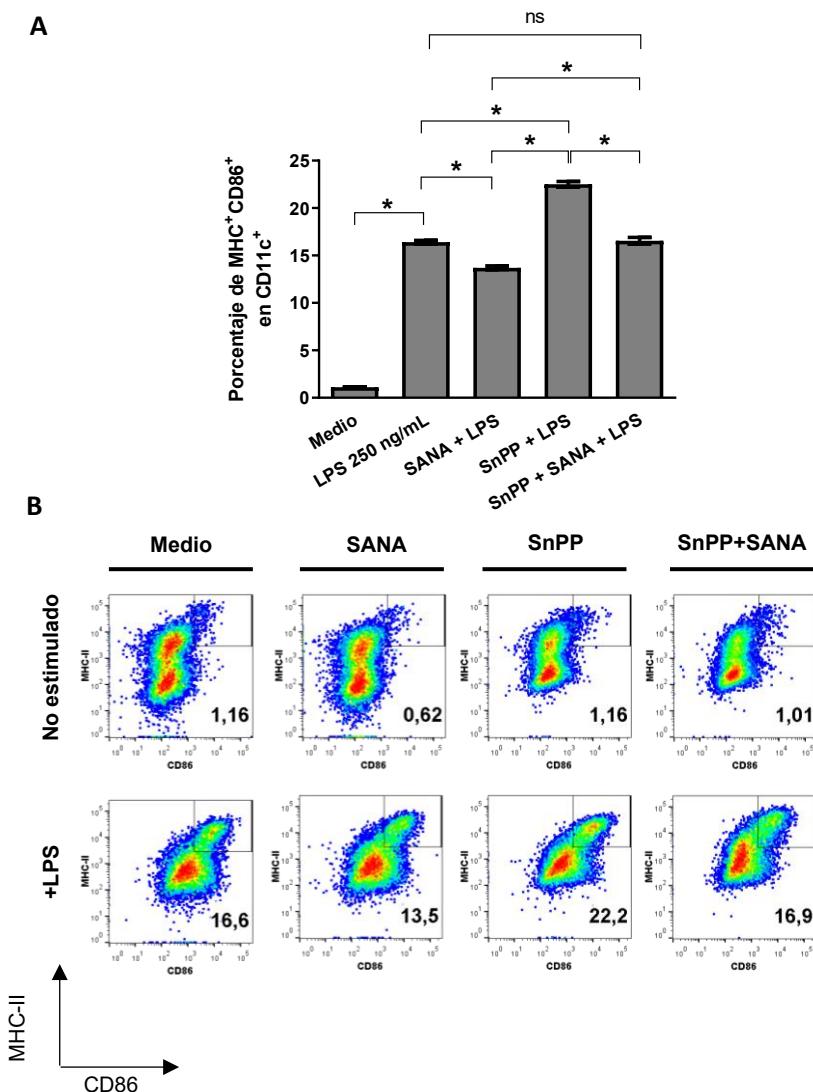


Figura 2.13. Función de HO-1 en la maduración de células dendríticas. BMDCs fueron tratadas con SnPP (50 μ M), SANA (0.2 mM) y LPS (250 ng/mL) por 24 hs. La maduración de células dendríticas fue analizada por citometría de flujo considerando la población celular MHC-II⁺ CD86⁺ en CD11c⁺. El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el software FlowJo V10. Los datos de dos réplicas se muestran como media \pm SEM de un experimento representativo de tres independientes. (*) $p \leq 0.05$ ANOVA one-way con test de múltiple comparación Tukey.

Sin embargo, al inhibir HO-1 con SnPP en ausencia de tratamiento con SANA, el porcentaje de marcadores de maduración aumenta respecto a la maduración basal con LPS. De todas formas, en la condición SANA + SnPP la maduración disminuye significativamente respecto a SnPP solo, restableciéndose a porcentajes similares a la condición sin tratamiento.

Para determinar si el efecto inhibitorio del SANA es dependiente de Tmem176b, se estudió el fenotipo de maduración en BMDCs de ratones *Tmem176b*^{-/-} y WT. Cuando las células son tratadas con SANA, la expresión de los marcadores de maduración disminuye de manera significativa tanto en WT como en *Tmem176b*^{-/-}. Sin embargo, en las BMDCs *Tmem176b*^{-/-}, el porcentaje de marcadores de maduración es

significativamente mayor respecto a las WT, independientemente de haber sido tratadas con SANA o no (Figura 2.14).

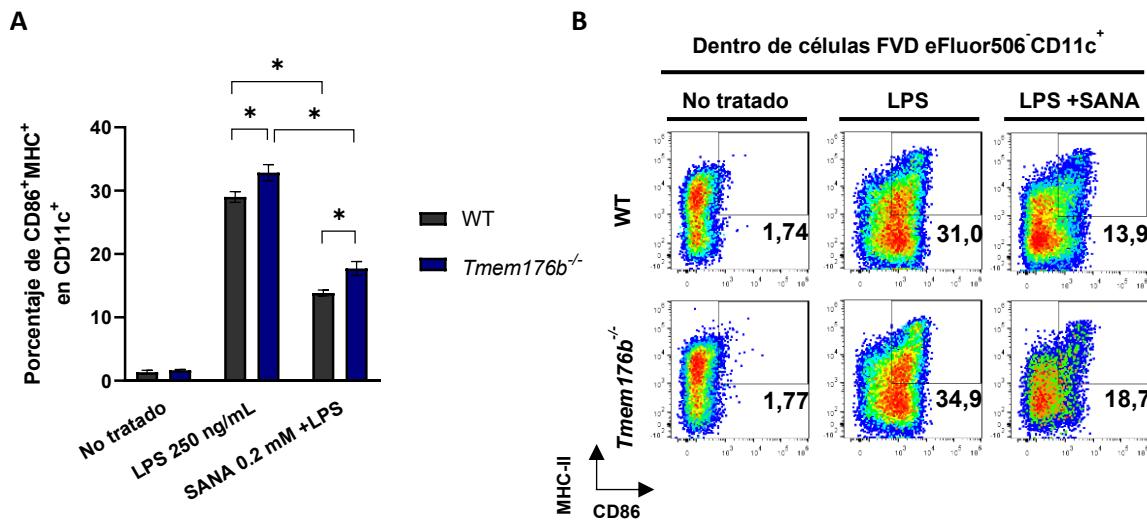


Figura 2.14. Maduración de células dendríticas dependiente de *Tmem176b*. BMDCs provenientes de ratones WT y *Tmem176b*^{-/-} fueron diferenciadas y tratadas con SANA 0.2 mM y estimuladas con LPS (250 ng/mL) por 24 hs. A las células de la condición no tratado solo se las incubó con medio. La maduración de células dendríticas fue analizada por citometría de flujo considerando la población celular MHC-II⁺ CD86⁺ en CD11c⁺. El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el software FlowJo V10. Los datos con 6 réplicas por condición se expresan como media ± SEM, provenientes de tres experimentos independientes. (*) p ≤ 0.05. Test estadístico ANOVA two-way con test de múltiple comparación Tukey.

El rechazo de trasplantes se basa en una respuesta del sistema inmune donde la presentación de aloantígenos por células presentadoras y la acción de las células respondedoras de la inmunidad adaptativa juegan un rol crucial. En la alorespuesta, son importantes las células dendríticas como presentadoras y los linfocitos T como respondedores. Por esta razón, analizamos el efecto de SANA sobre los linfocitos T en un contexto de alorespuesta.

SANA inhibe la proliferación de linfocitos T *in vitro*.

Analizamos en el contexto de experimentos de MLR (reacción leucocitaria mixta) el efecto de SANA sobre la proliferación de linfocitos T. Para esto cocultivamos BMDCs provenientes de ratones B6 con células de ganglios provenientes de ratones BALB/c. Observamos que en el MLR tratado con SANA 0.2 mM hay una menor proliferación de linfocitos T, a diferencia de lo que se observa con el salicilato (Figura 2.15).

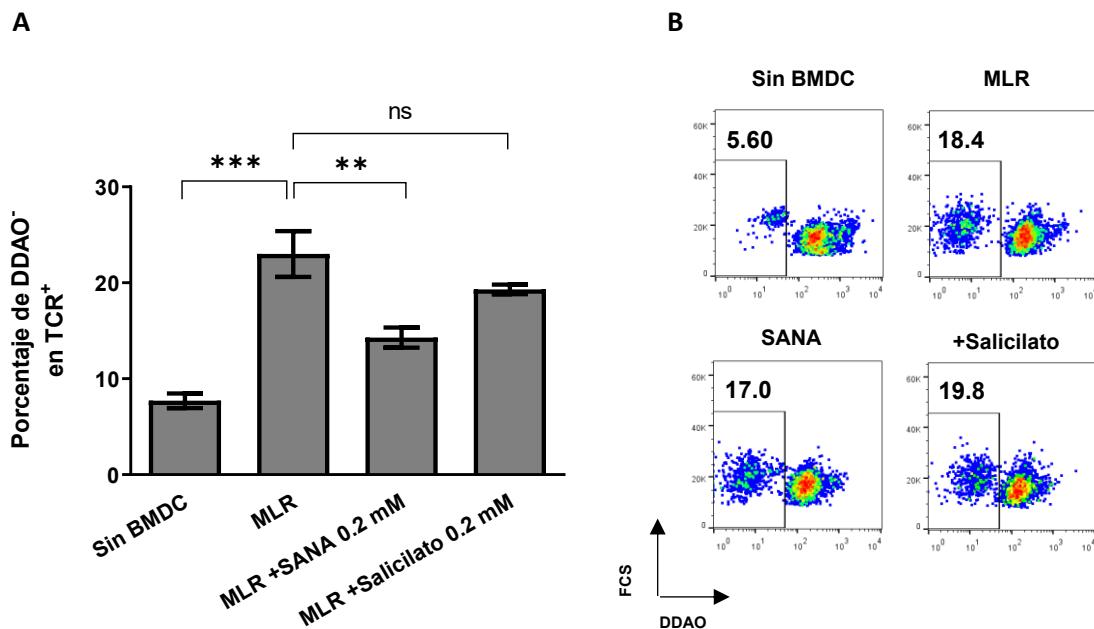


Figura 2.15. Proliferación de linfocitos T en MLR tratando con SANA. BMDCs fueron generadas de ratones B6 y colocadas en placa de 96 pocillos para su adhesión. Por otro lado, se colectaron ganglios linfáticos de ratones BALB/C que se disgregaron y marcaron con DDAO (sonda de proliferación), agregándolas a la placa junto a las BMDCs previamente adheridas para su cocultivo en el MLR. A) MLR (Proporción 1:10 BMDC: células de ganglio) fueron incubadas con SANA o Salicilato (0.2 mM) por 72 horas. Las condiciones sin BMDC y MLR fueron incubadas solo con medio. Luego de incubadas se colectaron las células y se marcaron con anti-TCR para medir proliferación de linfocitos T mediante citometría de flujo (población DDAO+ en TCR+). Gráfica de porcentaje de proliferación de linfocitos T. Datos expresados como media ± SEM, provenientes de tres experimentos independientes. (*) p ≤ 0.05, (**) p ≤ 0.01, (***) p ≤ 0.001. Test estadístico One-way ANOVA con test de múltiple comparación Tukey. B) Dot plots representativos.

Otra pregunta que surge es a qué nivel celular actúa el SANA, donde sabemos que en BMDCs inhibe la maduración, mientras resta saber si actúa directamente en los linfocitos T. Para responder esto se realizó la estrategia experimental de un sistema de activación de linfocitos T libre de APCs (APC-free), estimulando a las células previamente purificadas de un bazo de ratón BALB/c con anti-CD3 y anti-CD28. En este ensayo se observa que SANA también inhibe la proliferación de los linfocitos T (Figura 2.16).

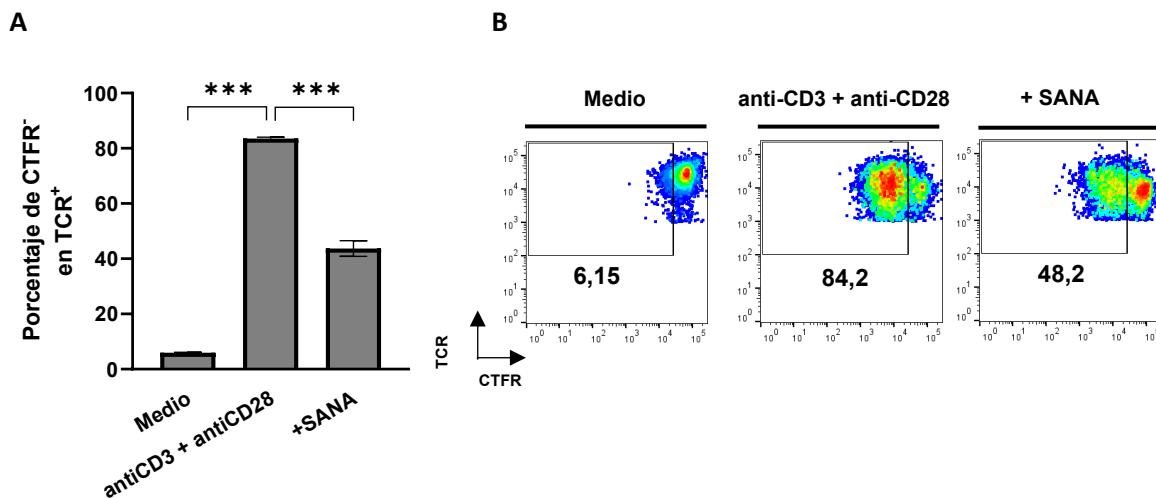


Figura 2.16. Proliferación de células T en sistema APC-free. Se colectaron y purificaron células T totales mediante columna magnética de esplenocitos de bazo de ratón BALB/c, los cuales se marcaron con la sonda de proliferación Cell Trace Far Red (CTFR) y se colocaron en placa previamente sensibilizada con anti-CD3ε (1 µg/mL). Luego se agregó anti-CD28 (1 µg/mL) y se trataron con SANA (0.2 mM). Se incubaron por 72 hs y luego se colectaron para medir proliferación por citometría de flujo (población CTFR+ en TCR+). A) Gráfica de porcentaje de proliferación de linfocitos T. Datos de cuatro réplicas por condición expresados como media ± SEM, provenientes de un experimento representativo de tres independientes. (***) $p \leq 0.001$. Test estadístico One-way ANOVA con test de múltiple comparación Tukey. B) Dot plots representativos.

El efecto inhibitorio de proliferación de linfocitos T es dependiente de HO-1 en el MLR

Los resultados obtenidos hasta ahora, muestran que SANA prolonga la sobrevida de los trasplantes (Fig. 2.1), inhibe la maduración de células dendríticas (Fig. 2.12) y la proliferación de linfocitos T tanto en un MLR como en un sistema APC-free (Fig. 2.15 y 2.16). Desde el punto de vista mecanístico, estos efectos son total o parcialmente dependientes de Tmem176b y de la inducción de HO-1 (Fig. 2.5; 2.13 y 2.14).

Teniendo en cuenta que SANA induce HO-1 en células dendríticas tanto *in vitro* como *in vivo* (Fig. 2.7 y 2.8) y que el efecto inhibitorio de la maduración de BMDCs es parcialmente dependiente de HO-1 (Fig. 2.13), es importante estudiar si esto repercute en la proliferación de linfocitos T. Por esta razón, nos planteamos un diseño experimental en donde se agrega la condición SnPP en el MLR. De esta manera, se pretrataron las BMDCs con SANA (0.2 mM por 24 horas) y luego se cocultivaron con las células respondedoras provenientes de ganglios, con o sin el tratamiento con SnPP. El pretratamiento de las BMDCs con SANA en las condiciones mencionadas es para tener expresada HO-1 como anteriormente (Fig. 2.8), mientras que el tratamiento con SnPP en el momento del MLR, inhibe la actividad de esta enzima. En esas condiciones, vimos que el pretratamiento con SANA determina una significativa disminución de la proliferación de células T en el MLR, efecto que es parcialmente revertido al adicionar SnPP (Figura 2.17).

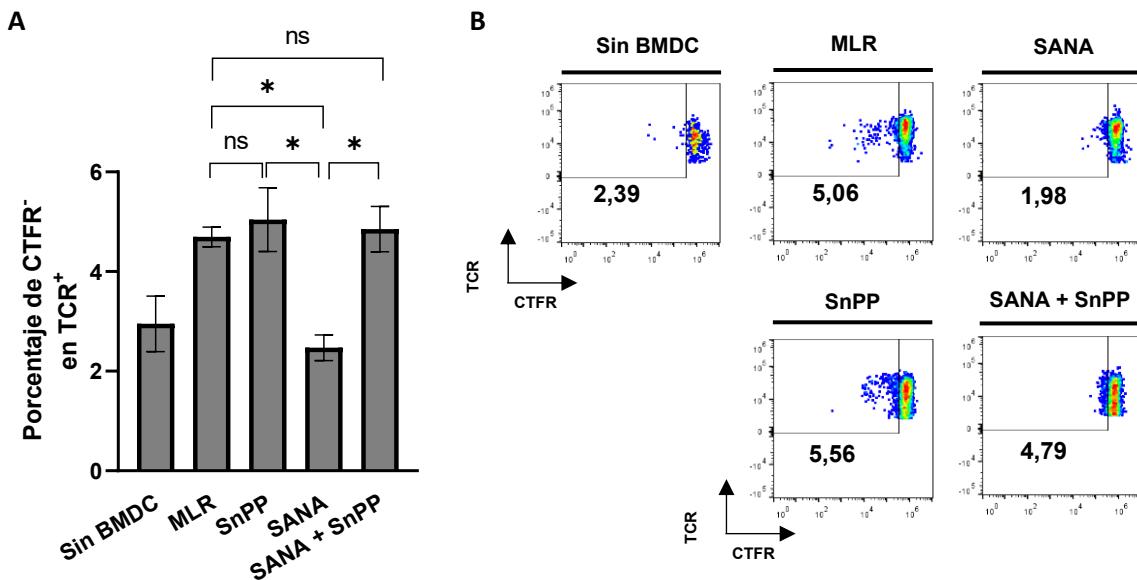


Figura 2.17. Función de HO-1 en la inhibición de la proliferación de linfocitos T en MLR. BMDCs fueron generadas de ratones B6 y luego de su diferenciación se pretrataron con SANA 0.2 mM, 24 horas. Los ganglios linfáticos se colectaron de ratones BALB/C y se marcaron con Cell Trace Far Red (CTFR, sonda de proliferación), agregando las células a la placa junto a las BMDCs para el MLR luego del pretratamiento. La proporción en el MLR fue 1:1 (BMDC/células de ganglio), incubándose con/sin SnPP (50 μ M) por 5 días. Luego de incubadas se colectaron las células y se marcaron con anti-TCR para medir proliferación de linfocitos T por citometría de flujo (población CTFR⁺ en TCR⁺). A) Gráfica de porcentaje de proliferación de linfocitos T, datos de tres réplicas por condición expresados como media \pm SEM, provenientes de un experimento representativo de tres independientes. (*) $p \leq 0.05$, ns: no significativo. Test estadístico One-way ANOVA con test de múltiple comparación Tukey. B) Dot plots representativos.

Este resultado muestra que el efecto inhibitorio dependiente de SANA sobre la capacidad aloestimuladora de las BMDCs, es parcialmente modulado por HO-1. Esto es concordante con los resultados *in vitro* mostrados anteriormente y apoya que el efecto farmacológico del SANA como modulador de la respuesta inmune se debe al eje TMEM176B/HO-1.

SANA prolonga la sobrevida y promueve a los linfocitos Tregs en el injerto de manera dependiente de HO-1.

Sabiendo que SANA activa el eje TMEM176B/HO-1 y que esto tiene un papel protector en el modelo murino de trasplante de piel que utilizamos, quisimos dilucidar desde un punto de vista mecanístico cuales eran los procesos de inmunoregulación generados *in vivo*. En ese sentido, ha sido reportado que esta enzima es beneficiosa en modelos murinos de trasplante de corazón (239,240), cobrando importancia el estudio del papel de HO-1 en nuestro modelo de trasplante de piel. Para esto realizamos un ensayo de sobrevida con ratones C57BL/6 tratando a los animales con 100 mg/kg de SANA por vía orogástrica desde el día -1 al 15 postrasplante y en paralelo se administró el inhibidor de la actividad de HO-1, SnPP. El SnPP fue administrado por vía intraperitoneal a una dosis de 40 mg/kg en los días -1; 3; 7; 11 y 15. Como esperábamos, los animales tratados

con SANA prolongan la sobrevida del injerto de manera significativa respecto a los del grupo tratado con vehículo, efecto que es perdido en los tratados con SANA + SnPP comparado a los tratados con vehículo (Figura 2.18). Sin embargo, en este estudio no pudimos observar diferencias en la sobrevida de los trasplantes entre los grupos tratados con SANA o SANA + SnPP.

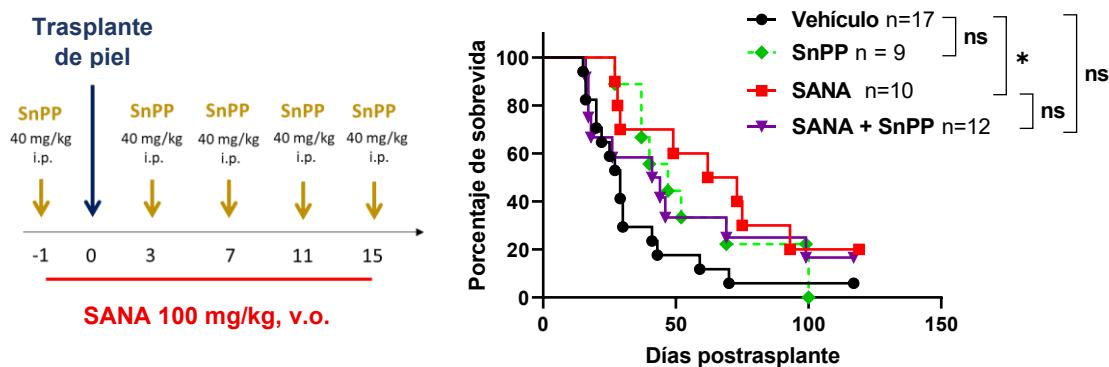


Figura 2.18. Estudio *in vivo* de HO-1 en la prolongación por SANA de la sobrevida de trasplantes de piel. Ratones C57BL/6 hembras fueron transplantadas con piel de la cola de ratones C57BL/6 machos donantes. Los receptores fueron tratados con SANA (100 mg/kg/día, vía oral, desde el día -1 a 15 postrasplante, vehículo = carboxi-metil-celulosa 0.5% + Tween-80 0.5%). SnPP fue administrado por vía intraperitoneal (40 mg/kg, cada 4 días desde el día -1 al 15 postrasplante, vehículo = PBS pH 7.4). Finalizado el tratamiento, los aloinjertos fueron controlados cada 48/72 hs. Se diagnostica clínicamente rechazo cuando el tamaño del aloinjerto disminuye más de un 50% o aparece necrosis en 10% o más del injerto. Los datos de sobrevida corresponden al n de animales indicado en cada grupo, provenientes de dos experimentos independientes. (*) p ≤ 0.05, ns: no significativo. Test estadístico Log-Rank Mantel Cox.

Estos resultados sugieren que SANA prolonga la sobrevida del trasplante de piel a través de mecanismos que involucran a HO-1. Para profundizar en el estudio de los efectos que la activación del eje TMEM176B/HO-1 tiene en la alorespuesta, y sabiendo que los linfocitos T reguladores (Tregs) son actores fundamentales en la modulación de respuestas efectoras e inducción de tolerancia, analizamos las poblaciones de linfocitos Tregs en el injerto de piel y en ganglio drenante a los 15 días postrasplante. En esas condiciones, vimos que los animales tratados con SANA tienen mayor porcentaje de Tregs CD4⁺FoxP3⁺ en el injerto respecto al grupo vehículo. En contraparte, los animales tratados con salicilato no muestran diferencias significativas (Figura 2.19).

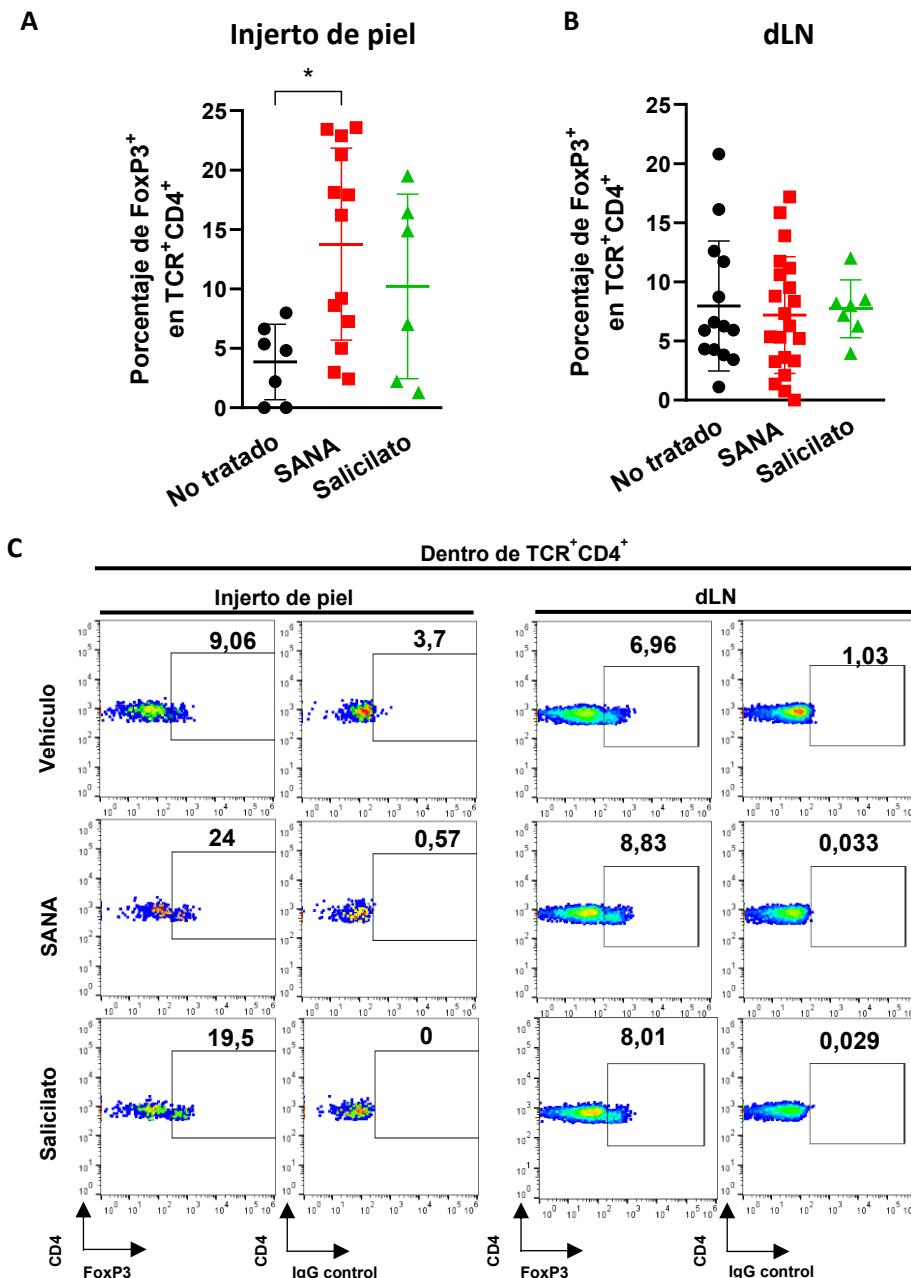


Figura 2.19. Análisis de poblaciones Tregs CD4⁺ FOXP3⁺ en aloinjertos de piel y dLN. Se realizaron trasplantes de piel en contexto de incompatibilidad menor en ratones donde se trataron a las hembras receptoras con SANA o Salicilato (100 mg/kg/día, vía oral) desde el día -1 a 15 postrasplante. Los animales fueron sacrificados a día 15 para colectar el injerto de piel y el ganglio drenante axilar izquierdo (dLN). Los tejidos fueron procesados para analizar mediante citometría de flujo la población de células T reguladoras (Tregs) CD4⁺ FOXP3⁺ en A) injerto de piel y B) dLN. C) Dot plots representativos. Los valores en los gráficos se muestran como promedio ± SEM de la diferencia entre el porcentaje del marcado FOXP3⁺ menos el porcentaje del isotipo control. Los datos son expresados como media ± SEM de tres experimentos independientes. (*) p ≤ 0.05. Test estadístico One-way ANOVA con test de múltiple comparación Tukey.

Sabemos que la expresión de HO-1 en células dendríticas promueve la diferenciación de Tregs CD4⁺ FOXP3⁺ (297,298). Por este motivo y con los resultados anteriores, analizamos las poblaciones de Tregs CD4⁺ FOXP3⁺ en injertos de piel y dLN colectados de animales transplantados a los 15 días postrasplante, tratados con SANA y SnPP de igual

forma que en la Figura 2.18. Cuando los animales son tratados solo con SANA, el porcentaje de Tregs es mayor respecto al vehículo en los injertos de piel como es esperable, pero cuando los animales son tratados con SANA y SnPP el efecto se revierte y el porcentaje es menor (Figura 2.20 A). En el ganglio drenante no se observaron cambios en los Tregs con los tratamientos a los 15 días postrasplante (Figura 2.20 B).

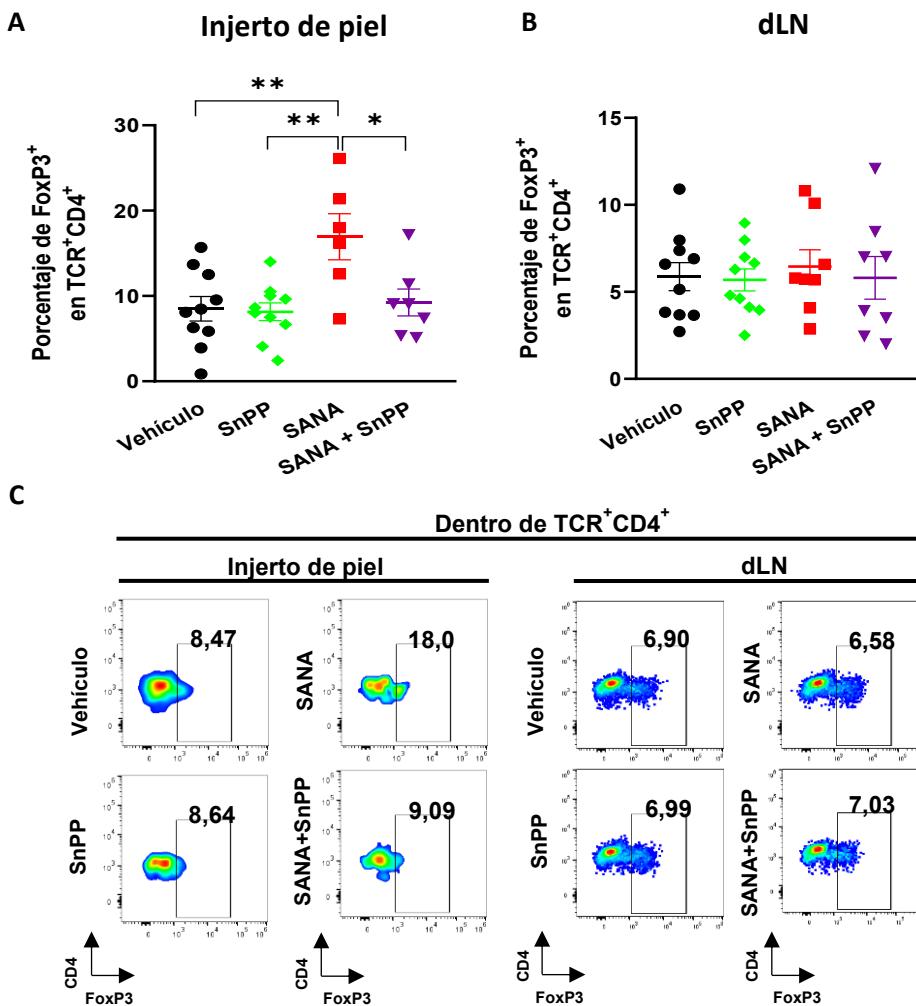


Figura 2.20. Estudio de Tregs en función de HO-1 a 15 días postrasplante en injerto de piel. Ratones C57BL/6 hembras fueron trasplantadas con piel de la cola de ratones C57BL/6 machos donantes. Los receptores fueron tratados con SANA (100 mg/kg/día, vía oral, desde el día -1 a 15 postrasplante) y SnPP (i.p. 40 mg/kg cada 4 días desde el día -1 al 15 postrasplante). A día 15 se colectó el injerto de piel y el ganglio drenante axilar izquierdo (dLN) que fueron procesados para analizar poblaciones celulares Tregs CD4⁺ midiendo porcentaje de FOXP3⁺ en CD4⁺. A) Porcentaje de células FOXP3⁺ en CD4⁺ de injertos de piel. B) Porcentaje de células FOXP3⁺ en CD4⁺ de dLN. C) Dot plots representativos. Valores son mostrados como media ± SEM de los porcentajes de FOXP3⁺ de tres experimentos independientes. (*) p ≤ 0.05 (**) p ≤ 0.01. Test estadístico one-way ANOVA con test de múltiple comparación Tukey.

La combinación de SANA con un inmunosupresor específico mejora los efectos en la aceptación de trasplantes.

Habiendo demostrado el efecto inmunomodulador de SANA en trasplantes junto al mecanismo de inducción de HO-1 a través de la activación farmacológica de TMEM176B, nos propusimos estudiar una potencial aplicación clínica de este compuesto, donde sabemos que, en el diseño experimental, no puede administrarse de manera aislada, sino que debe coadministrarse con alguna droga inmunosupresora. Para esto decidimos estudiar la coadministración con el fragmento Fab del anticuerpo anti-CD3, el cual tiene un efecto depletante de linfocitos T a corto plazo (favoreciendo que no suceda un rechazo agudo), para luego inducir una generación de células Tregs a largo plazo que favorece la tolerancia del trasplante y previene el rechazo crónico del mismo. Las ventajas del uso de este inmunosupresor frente a los tradicionales (ciclosporina, tacrolimus, rapamicina, etc.) es que en primer lugar la supresión inmune no es sistémica, sino específica de linfocitos T (158,159). En segundo lugar, al tratarse de un fragmento y no de la estructura completa del anticuerpo, se espera que los efectos secundarios sean menores (160). La coadministración del SANA junto al anti-CD3 Fab (5 µg/ratón, intraperitoneal en los días -1; 1; 3; 5 y 7) permitió observar que los tratamientos prolongaron la sobrevida del trasplante de piel respecto al vehículo, mientras la coadministración de ambas drogas mostró un mejor efecto: el 60% de los animales sobrepasaron el día 100 postrasplante sin rechazar, mientras que en el grupo tratado solo con SANA fue un 28,6% y en el grupo solo con anti-CD3 fue un 37,5% (Fig. 2.21). Si comparamos los efectos de la coadministración de ambos tratamientos con los tratamientos por separado, SANA + anti-CD3 prolonga significativamente más la sobrevida respecto a SANA, pero al compararlo con anti-CD3, se observa una tendencia a una mayor prolongación, aunque no se logra una diferencia estadísticamente significativa (Figura 2.21).

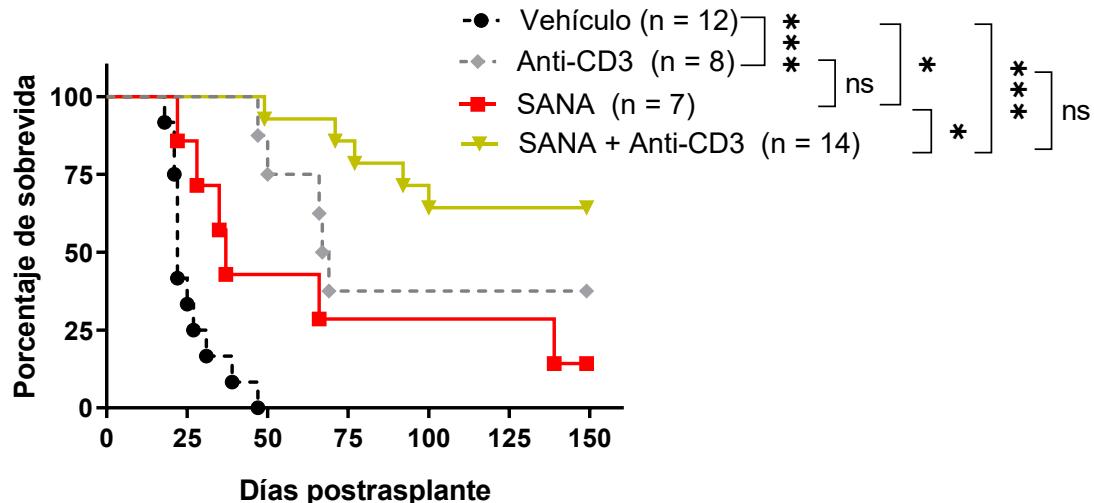


Figura 2.21. Efectos en la sobrevida de trasplantes de piel de la combinación de SANA con α -CD3. Ratones C57BL/6 hembras fueron trasplantadas con piel de la cola de ratones C57BL/6 machos donantes. Los receptores fueron tratados con SANA (100 mg/kg/día, vía oral) o vehículo entre el día -1 y 15 postrasplante. El tratamiento con anticuerpo α -CD3 (Fragmento Fab) (5 μ g por animal, ip) fue administrado en los días -1; 1; 3; 5 y 7. Vehículo del α -CD3 = PBS. Finalizado el tratamiento, los trasplantes fueron controlados cada 48/72 hs. Se diagnostica clínicamente rechazo cuando el tamaño del aloinjerto disminuye más de un 50% o aparece necrosis en 10% o más del injerto. Los datos de sobrevida corresponden al n de animales indicado en cada grupo, provenientes de dos experimentos independientes. (*) p \leq 0.05, (****) p \leq 0.001, ns: no significativo. Test estadístico Log-Rank Mantel Cox.

Anteriormente en las Figuras 2.19 y 2.20, observamos que el SANA aumenta el porcentaje de Tregs en el trasplante de piel a los 15 días postrasplante en forma dependiente de HO-1. A esto hay que añadirle el conocimiento presente en la literatura de efectos a largo plazo de generación de Tregs por el tratamiento con anti-CD3 (159). Debido a esto, fuimos a analizar las poblaciones de linfocitos Tregs en los tejidos de ratones transplantados y tratados con SANA y anti-CD3. El análisis de las poblaciones de Tregs en el injerto de piel y el dLN se hizo en el modelo de alotrasplante de piel en contexto de antígenos menores, siguiendo el mismo esquema de administración de la Figura 2.21. Los tejidos se colectaron a día 15 postrasplante, donde se muestra que en el injerto de piel el porcentaje de la población de linfocitos Tregs CD4 $^{+}$ FOXP3 $^{+}$ es significativamente mayor en el grupo SANA + anti-CD3 si lo comparamos con el tratado con anti-CD3, o con SANA solo o con el control sin tratamiento. En el dLN no encontramos incrementos en los porcentajes de Tregs con los tratamientos (Figura 2.22).

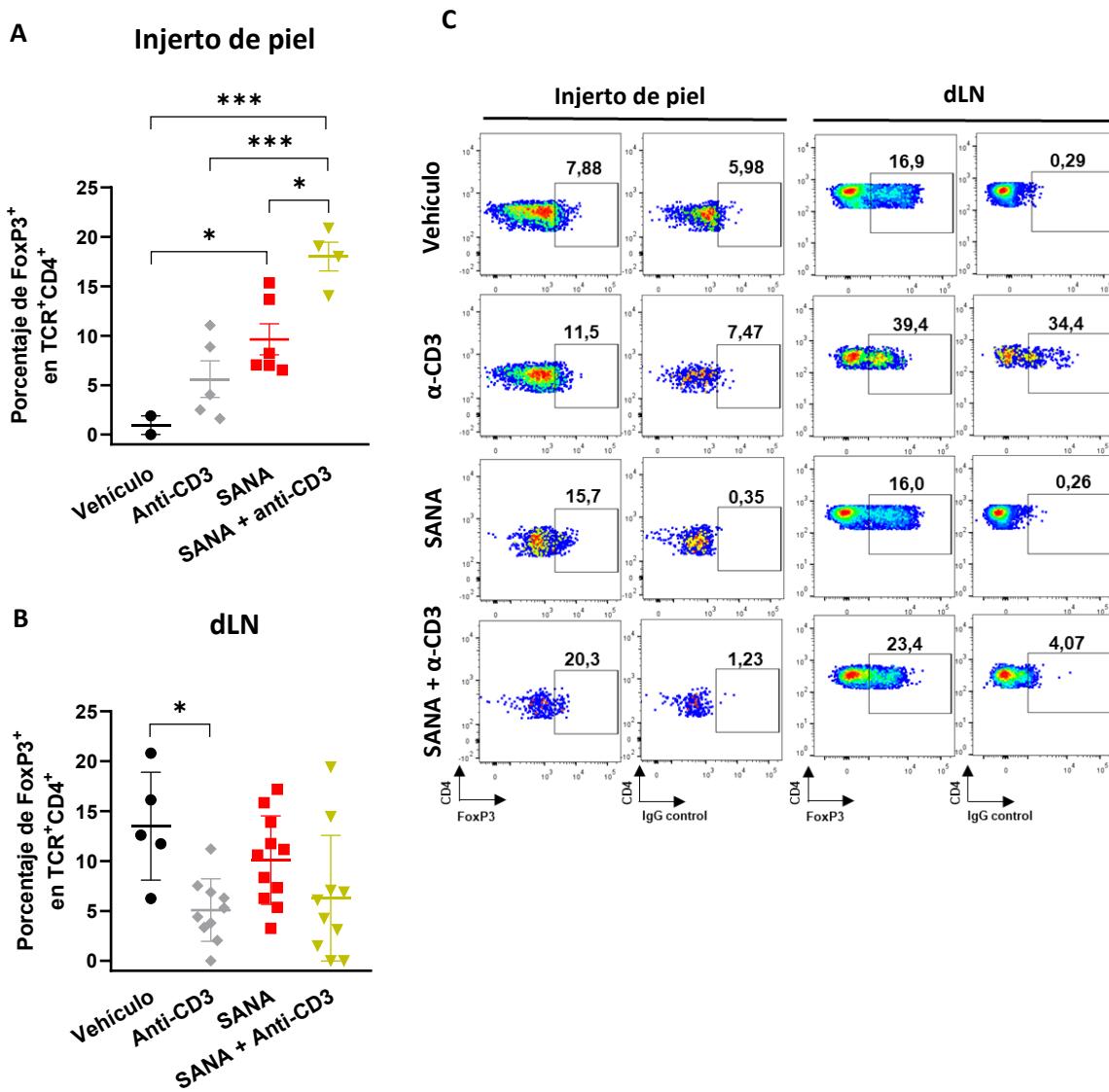


Figura 2.22. Análisis de poblaciones Tregs a 15 días postrasplante en injerto de piel y dLN. A) Ratones C57BL/6 hembras fueron trasplantadas con piel de la cola de ratones C57BL/6 machos donantes. Los receptores fueron tratados con SANA y fragmento Fab de α -CD3. A día 15 se colectó el injerto de piel y el ganglio drenante axilar izquierdo (dLN) para procesar los tejidos y analizar poblaciones celulares Tregs CD4⁺. Las mismas fueron analizadas midiendo el porcentaje de FOXP3⁺ en CD4⁺. Valores son mostrados como media \pm SEM de la diferencia de porcentajes entre los marcados FOXP3⁺ menos el control isotipo IgG, provenientes de tres experimentos independientes, mostrando porcentajes en A) injerto de piel y en B) dLN. C) Dot plots representativos. (*) $p \leq 0.05$, (****) $p \leq 0.001$. Test estadístico one-way ANOVA con test de múltiple comparación Tukey.

Estos resultados muestran que, en la sobrevida del injerto de piel, el tratamiento con anti-CD3 mejora el efecto del SANA, mientras que en los Tregs la combinación de ambos mejora significativamente respecto a los tratamientos por separado. Pero nos llama la atención que con estos resultados no se observe una diferencia significativa en la sobrevida entre SANA y SANA + antiCD3, razón por la cual optamos por estudiar la

combinación de SANA y anti-CD3 Fab en un modelo alternativo con una respuesta alogénica más fuerte. La combinación de tratamientos se aplicó en un modelo murino de trasplante de piel en contexto de antígenos mayores, trasplantando piel de la cola de un ratón donante hembra de la cepa BALB/c a una receptora hembra C57BL/6, siguiendo el mismo procedimiento que en los trasplantes de piel en contexto de antígenos menores. Al estudiar la sobrevida del injerto, se observa que se trata de un modelo cuya respuesta es más fuerte y rápida, donde los animales del grupo control tratados con vehículo rechazaron en una media de 8 días, esperable en este tipo de modelos (314,315). En este caso, los animales tratados solamente con SANA no lograron prolongar significativamente la sobrevida, al contrario del anti-CD3 Fab que prolonga significativamente respecto al vehículo. Sin embargo, se reproduce el mismo resultado que en los trasplantes en contexto de antígenos menores, donde el tratamiento combinado de SANA y anti-CD3 Fab mejora la sobrevida de manera significativa respecto a los grupos tratados con vehículo y con SANA. Entre el grupo tratado solo con anti-CD3 y SANA + antiCD3, se observa una tendencia (no se logra una diferencia estadísticamente significativa) a aumentar la sobrevida del injerto (Figura 2.23).

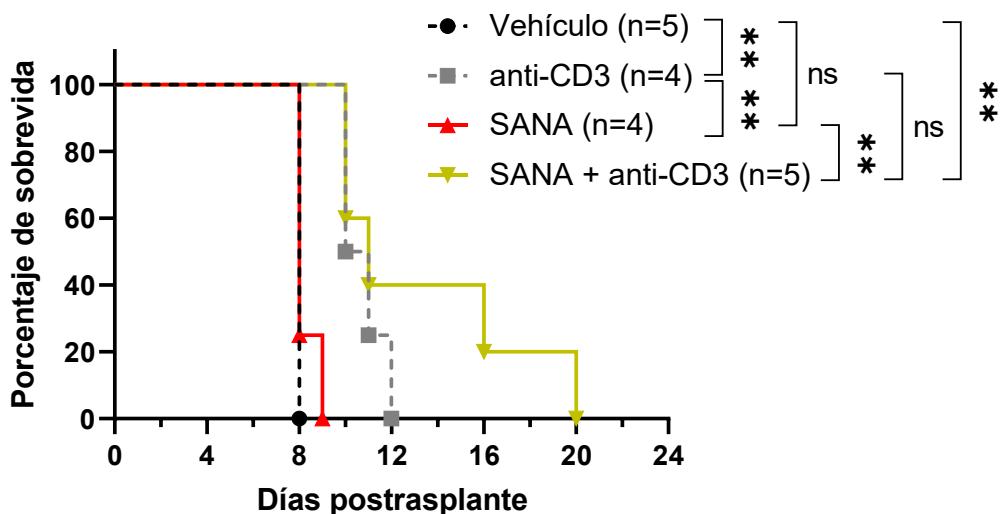


Figura 2.23. Efectos del tratamiento de SANA y α -CD3 en la sobrevida de trasplantes de piel en contexto de antígenos mayores. Ratones C57BL/6 hembras fueron trasplantadas con piel de la cola de ratones BALB/c hembras donantes. Los receptores fueron tratados con SANA (100 mg/kg/día, vía oral) y con el fragmento Fab de α -CD3 (5 μ g por animal, IP) de igual forma que en la Figura 2.21. Finalizado el tratamiento, los trasplantes fueron controlados cada 48/72 hs. Se diagnostica clínicamente rechazo cuando el tamaño del aloinjerto disminuye más de un 50% o aparece necrosis en 10% o más del injerto. Los datos de sobrevida corresponden al n de animales indicado en cada grupo, provenientes de un experimento. (**) p \leq 0.01, ns: no significativo. Test estadístico Log-Rank Mantel Cox.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El rechazo de trasplantes continúa siendo un problema en la medicina a nivel mundial, generando problemas y complicaciones a los pacientes y también a los sistemas de salud (1). En particular, el rechazo crónico es el mayor desafío que enfrenta la clínica debido a que las terapias inmunosupresoras convencionales no son eficaces para poder evitarlo, sumado a que los efectos secundarios de estos medicamentos administrados en forma crónica comprometen significativamente la salud de los pacientes trasplantados (143).

Por esta razón, es importante continuar investigando en el área para poder desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que permitan disminuir la inmunosupresión sistémica y activen mecanismos de inmunoregulación y/o tolerancia perdurable en el tiempo, modulando así la respuesta inmune que lleva al rechazo del órgano o tejido. *En este sentido, es importante entender y conocer los mecanismos y procesos que participan en la respuesta inmune relacionada al rechazo de órganos/tejidos trasplantados. Por esta razón, el principal objetivo en este trabajo es demostrar que la regulación farmacológica de actores moleculares con funciones importantes en la alorespuesta, activan vías inmunoreguladoras que favorecen a la sobrevida del trasplante.*

Una estrategia es contar con fármacos que tengan como diana farmacológica algunos de los principales actores moleculares que cumplen funciones inmunoreguladoras. En un segundo escalón, estos fármacos podrían ser combinados con inmunosupresores conocidos pero administrados a dosis más bajas y con el objetivo de reducir la inmunosupresión crónica a la que se enfrentan los pacientes.

La información y estudios que se conocen acerca de los nitroalquenos derivados de ácidos grasos, así como los de segunda o tercera generación, muestra que son compuestos con potentes propiedades antiinflamatorias (220,230,232,233,235,244,316,317).

En este trabajo, nos centramos en estudiar el ácido 5-(2-nitroetenil) salicílico (SANA) (245), un nitroalqueno derivado del ácido salicílico. Este último es un compuesto ancestral conocido por sus importantes propiedades antiinflamatorias (247–249,318) y utilizándolo como siller estructural, en nuestro grupo, le adicionamos el grupo funcional nitroalquenilo con la intención de aumentar sus propiedades antiinflamatorias. El SANA al igual que otro nitroalquenos, son inhibidores del inflamasoma (Figura 1.16 A) (232,244) y de la vía proinflamatoria NF- κ B (Figura 1.16 B)(230,232). Otro nitroalqueno que tiene similitud estructural con el SANA y solo difiere en la ausencia de un grupo hidroxilo, es el (E)-4-(2-nitrovinil) benzoico, nitroalqueno derivado del ácido benzoico (BANA) (265). Dada su similitud estructural y sus propiedades como nitroalqueno, lo hemos tenido en cuenta junto al SANA como posible herramienta farmacológica para evaluarlo en este trabajo y comprender más cabalmente los mecanismos involucrados en el rechazo de los trasplantes

.

Los nitroalquenos presentan dos características que cobran relevancia en esta tesis: son inductores de la expresión de Hemoxigenasa-1 (HO-1) (236,237) y son activadores de canales iónicos TRP relacionados al transporte de calcio (219). Se conoce por un lado que HO-1 tiene efectos beneficiosos en trasplantes de corazón (239,240), mientras que por otro lado tenemos al canal catiónico TMEM176B, al que se le atribuyen importantes propiedades inmunoreguladoras en trasplantes y otras patologías relacionadas al sistema inmune (184–186). El hecho de que los nitroalquenos sean activadores de canales iónicos, nos hizo especular que SANA y/o BANA podrían funcionar como activadores farmacológicos de TMEM176B.

Como primer objetivo nos planteamos estudiar si el SANA ejerce efectos beneficiosos en modelos animales de trasplantes. Esto lo abordamos en dos modelos diferentes de trasplantes en roedores, obteniendo por un lado que el SANA aplicado por vía oral durante 15 días prolonga la sobrevida de trasplantes de piel en contexto de antígenos menores (Fig. 2.1 A y B), mientras por otro, prolonga también la sobrevida de trasplantes de corazón heterotópico en contexto de antígenos mayores en ratas (Fig. 2.1 C). Este efecto no se observó en los animales tratados con salicilato en los trasplantes de piel, mientras que en los de corazón, las ratas tratadas con SANA mostraron una prolongación de la sobrevida significativamente mayor a las tratadas con salicilato. Esto ya nos sugiere que la presencia del grupo funcional nitroalqueno en la molécula potencia su efecto, aunque probablemente haya también una dependencia del sillon estructural debido a que un tratamiento similar con el BANA, no tuvo efectos en la sobrevida de los trasplantes de piel en ratones tratados (Figura 2.2). Estos resultados son importantes en primer lugar porque el SANA tiene un efecto *in vivo* sobre dos tipos de trasplantes de órganos, donde el proceso de rechazo en piel y corazón se comportan de manera diferente. En segundo lugar, el compuesto prolonga la sobrevida en dos contextos diferentes de incompatibilidad, menor y mayor. En el modelo de trasplante de piel con incompatibilidad menor, se desencadena la alorespuesta por el reconocimiento de antígenos menores independientes al MHC, en este caso por péptidos relacionados al cromosoma Y del macho donante (46). Por el contrario, el trasplante de corazón fue realizado en contexto de antígenos mayores, que al tratarse de cepas diferentes generan incompatibilidad a nivel de MHC. Únicamente en el caso de hermanos gemelos idénticos, la compatibilidad es probablemente total y se estaría en una situación de trasplante singénico, mientras en el resto de los trasplantes que se utilizan a diario en la clínica, estaríamos frente a trasplantes alogénicos donde se necesitan estudios de compatibilidad para encontrar el donante adecuado (33,44). *El hecho de que SANA haya tenido un efecto en este modelo, amerita a que sea estudiado como potencial droga inmunoreguladora de la alorespuesta.*

Si pensamos en un posible encare terapéutico, este compuesto aplicado como monoterapia no es suficiente para lograr un efecto que perdure en el tiempo y establezca tolerancia del trasplante. Para lograr esto, hay que combinarlo con otro tratamiento inmunosupresor que transitoriamente apague las funciones efectoras del sistema inmune y dé lugar a la generación de mecanismos reguladores perdurables en el tiempo. En la Figura 2.1, SANA solamente prolonga la sobrevida, pero finalmente

ocurre el rechazo de los órganos, razón por la cual es necesario plantear una terapia combinada con un inmunosupresor a baja dosis. Esta aproximación terapéutica la hicimos coadministrándolo junto al anti-CD3ε-Fab (Figura 2.21), lo cual desarrollaremos más adelante. *En este trabajo de tesis, nos propusimos estudiar los mecanismos regulados farmacológicamente que desencadenen efectos inmunomoduladores de la alorespuesta, donde SANA puede ser utilizado como herramienta farmacológica.*

Para abordar el estudio de dichos mecanismos, tomamos en cuenta tres actores moleculares que pueden ser regulados por SANA: el canal catiónico TMEM176B, el inflamasoma NLRP3 y la enzima HO-1. Cada uno de ellos tienen en común que cumplen un papel importante en la alorespuesta, donde iremos desarrollando a continuación como los estudiamos para lograr elucidar los mecanismos.

Por tanto, nos planteamos evaluar si el SANA regula farmacológicamente a TMEM176B. Para ello, se analizó el efecto del tratamiento de esta droga en la actividad iónica de TMEM176B, mediante un ensayo *in vitro* con células CHO transfectadas que sobreexpresan a este canal. El resultado demuestra que SANA aumenta el ingreso de sodio a través de TMEM176B respecto a la condición basal tratada con vehículo, no sucediendo lo mismo con el salicilato (Figura 2.3). El incremento de sodio intracelular está relacionado a la actividad de TMEM176B como canal catiónico y por lo tanto es *activado por SANA*. Al igual que en el experimento *in vivo* de trasplante de piel, este ensayo se realizó también con el BANA, donde tampoco vimos cambios en el ingreso de sodio en las células transfectadas con TMEM176B (Figura 2.4). Esto confirma que el efecto sobre la actividad iónica y en la sobrevida de trasplantes de piel, no solo depende del grupo funcional nitroalquenilo, sino también del siller estructural. Es decir que estas propiedades no son genéricas a cualquier nitroalqueno, sino que son particulares del SANA. Estas variaciones puntuales en la estructura (ausencia de hidroxilo y cambio de posición del grupo nitroalquenilo) hacen que se pierdan estos efectos. Con estos resultados, *continuamos estudiando los mecanismos inmunomoduladores que la activación de TMEM176B desencadena en la alorespuesta, así como otros que pudiesen ser directamente dependientes del SANA*.

Las propiedades de TMEM176B como molécula inmunoreguladora lo posicionan con una función dual de acuerdo al contexto en que esté actuando. En el caso de la respuesta inmune tumoral, la activación de TMEM176B lleva a la modulación de respuestas efectoras dando un efecto protumoral. En este caso, la delección genética o la inhibición son beneficiosas para respuestas antitumorales (184). La inhibición farmacológica de TMEM176B se ha logrado y está bien estudiada con el compuesto BayK8644, un conocido bloqueador de canales de calcio (218). Esto refuerza que TMEM176B es una proteína que puede ser regulada farmacológicamente, ya sea activándose o inhibiéndose, y que por tanto puede cumplir un rol dual en la regulación de la respuesta inmune (187). De hecho, en contextos de infecciones, enfermedades autoinmunes y alotrasplantes, la presencia y activación de TMEM176B es beneficiosa para modular la respuesta inmune involucrada en los daños, progresión de las enfermedades y en el rechazo, respectivamente (185,186,192,212).

Como se ha mencionado, TMEM176B tiene importantes implicancias en la regulación del sistema inmune y el hecho que sea activado por SANA, nos permite estudiar su papel en los trasplantes y su implicancia en el efecto ejercido por SANA en la sobrevida. Al tratar con SANA a ratones *Tmem176b*^{-/-} en el modelo de trasplante de piel, se observa que se pierde el efecto de prolongación de la sobrevida que ocurre en los WT tratados (Figura 2.5), lo que concluye que *el efecto de SANA en la sobrevida del trasplante de piel es dependiente de Tmem176b*. Además, en los controles administrados con vehículo, no hay diferencias entre WT y *Tmem176b*^{-/-}, sugiriendo que *el efecto es a través de la activación de Tmem176b por SANA*.

Con estos datos, nos propusimos como tercer objetivo elucidar los mecanismos que se desencadenan con la activación farmacológica de TMEM176B y que expliquen el efecto *in vivo* observado en la sobrevida. En primer lugar, investigamos sobre blancos moleculares y vías que puedan ser reguladas por nitroalquenos y el SANA, las cuales puedan estar involucradas en la alorespuesta.

SANA y los nitroalquenos derivados del α -tocoferol inhiben el inflamasoma NLRP3 (Figura 1.16 A) (232,244), el cual está descrito que tiene un papel importante en la progresión del rechazo de trasplantes (260,261,311). Además, sabemos que TMEM176B también inhibe al inflamasoma NLRP3, pero cuando estudiamos la sobrevida de trasplantes de piel en ratones WT y *Caspasa1-11*^{-/-}, ambos rechazaron de igual manera sin mostrar diferencias en la sobrevida (Figura 2.6). La Caspasa-1 es un componente importante en la activación del inflamasoma porque es la proteasa que cliva a la IL-1 β y a la IL-18 a sus formas activas, las cuales ejercen los efectos proinflamatorios (271). Esta proteasa se activa al ensamblarse el inflamasoma, por lo tanto, su deleción impide la producción de las citoquinas mencionadas y los efectos relacionados a la activación del inflamasoma. Cabe aclarar que en estos animales también está la deleción de Caspasa-11, la cual puede ser activada de forma no canónica, no involucrando a Caspasa-1 (319). Por este motivo, el hecho de que no haya habido efectos en la sobrevida de trasplantes de piel de los animales que carecen de Caspasa-1/11, *nos sugiere que en este modelo la inhibición del inflamasoma NLRP3 no es suficiente para modular la alorespuesta*.

Los nitroalquenos son potentes compuestos antiinflamatorios debido a su capacidad de inhibir vías proinflamatorias tales como NF- κ B (230,317) y el mismo inflamasoma, así como por su capacidad de activar vías antiinflamatorias, antioxidantes y citoprotectoras como PPAR- γ , HSR-1, Nrf2-Keap1 y HO-1 (233,235–237,316). El análisis proteómico en macrófagos THP-1 tratados con SANA nos permitió identificar a HO-1 dentro de las proteínas más abundantes, exclusivamente sobreexpresadas en la condición con tratamiento y esto va acompañado de que SANA induce la expresión génica de HO-1 en estas células (Figura 2.7). También confirmamos el aumento de la expresión de esta proteína en células dendríticas (BMDC) (Figura 2.8), concluyendo que *SANA induce HO-1 en dos tipos diferentes de células mieloides*. Esta enzima tiene importantes propiedades antioxidantes, citoprotectoras e inmunomoduladoras (238,293,320,321) y específicamente se han visto efectos en la sobrevida de trasplantes de órganos sólidos (239,240). El resultado, además, va en el sentido de que la expresión de HO-1 es inducida a partir de la activación del factor de transcripción Nrf2, el cual se disocia de Keap1, se

transloca al núcleo y se une a la región ARE del ADN promoviendo la transcripción de genes de las enzimas de fase 2, proceso que es activado por nitroalquenos (233). Además, hay estudios específicos que muestran que los ácidos grasos nitrados inducen HO-1 de manera dependiente e independiente de Nrf2 (236,237).

El cuestionamiento que surge es si la activación farmacológica de TMEM176B desencadena mecanismos que regulen a HO-1, de lo cual no hay datos descritos aún o si dicho aumento en la expresión de HO-1 inducido por el SANA es independiente de este canal. Por esta razón, evaluamos la expresión de HO-1 en BMDCs de ratones WT y *Tmem176b*^{-/-}, donde vimos que las células WT tratadas con SANA inducen más expresión de HO-1 que las que en las *Tmem176b*^{-/-} (Figura 2.9 A y B). Además, *in vivo* se confirmó que hay mayor porcentaje de células dendríticas MHC-II⁺ CD11c^{hi} CD11b⁺ expresando HO-1 (HO-1⁺) en los injertos de piel de animales WT tratados con SANA que en los *Tmem176b*^{-/-} (Figura 2.9 C y D). Se conoce que TMEM176B es expresado en células dendríticas convencionales tanto de tipo 1 (cDC1) y de tipo 2 (cDC2), pero con mayores niveles en estas últimas (185,190,193). Esto es coherente con el resultado obtenido *in vivo*, debido a que el incremento de HO-1 dependiente de *Tmem176b* fue en dendríticas CD11b⁺, marcador correspondiente a cDC2, aunque también puede incluir otros subgrupos de dendríticas presentes en tejido cutáneo, como por ejemplo células de Langerhans. Esto muestra que *Tmem176b* en células dendríticas regula parcialmente la inducción de HO-1.

Estos resultados nos derivaron al estudio de HO-1 como potencial mecanismo, el cual tiene el agregado de que es regulado por TMEM176B, un nexo que hasta el momento no es claro y es interesante profundizar en ello. De acuerdo a los datos presentes en la literatura, sabemos que la expresión de HO-1 depende principalmente de la vía Nrf2-Keap1, la cual puede ser activada farmacológicamente por compuestos electrófilos o bien factores de estrés u oxidantes como radicales libres, especies reactivas del oxígeno o nitrógeno (277,278). Además, hay estudios que muestran que esta vía puede ser activada por fosforilación mediante la acción de cascadas de señalización de quinasas como las MAPKs y PI3K/Akt (281,286). Se ha mostrado que las vías ERK, p38 y PI3K/Akt tienen una función reguladora de la expresión de HO-1, siendo mejor descrita la vía PI3K/Akt, reportándose además que puede fosforilar directamente a HO-1 (287). En cuanto a TMEM176B, se ha visto que cuando es sobreexpresado *in vitro*, activa a Akt incrementando su forma fosforilada (312). En células dendríticas WT y *Tmem176b*^{-/-}, los niveles de Akt fosforilada son en forma basal significativamente mayores en las *Tmem176b*^{-/-}, mientras que el tratamiento con SANA incrementa la Akt fosforilada en las células WT, llevando a iguales niveles que en las carentes de *Tmem176b* (Figura 2.10 A y B). Este resultado muestra de alguna forma que la presencia de *Tmem176b* mantiene inactiva la vía Akt y la intervención del SANA estimula su activación. Cuando se inhibió Akt con Triciribina y se analizó la expresión de HO-1 en las células dendríticas tratadas con SANA, la inhibición de Akt suprimió la inducción de HO-1 observada en las células tratadas (Figura 2.10 C y D). *Esto sugiere que la inducción de HO-1 por SANA es a través de un mecanismo dependiente de Akt, donde TMEM176B mantiene inactiva a la vía*

PI3K/Akt en estado basal y el SANA estimula la fosforilación de Akt, pudiendo estar activando a Nrf2 por fosforilación (281,286) para inducir a HO-1.

Otras vías que también han sido estudiadas y tienen un efecto sobre el mecanismo de expresión de HO-1 son ERK y p38. Particularmente se ha visto que los ácidos grasos nitrados regulan la vía ERK mediando efectos protectores, induciendo la expresión de HO-1 (280). En las células dendríticas WT y *Tmem176b*^{-/-} no se han observados efectos en los niveles de fosforilación de ERK y p38 al tratarlas con SANA (Figura 2.11). En p38 hay una tendencia de haber mayor proteína fosforilada en las células WT en forma basal, que es significativa al tratar durante 30 minutos con SANA (Figura 2.11 C y D), mientras que en ERK no hay diferencias entre WT y *Tmem176b*^{-/-} (Figura 2.11 A y B). *Con estos resultados, no podemos afirmar que ERK y p38 sean intermediarios en el eje TMEM176B-HO-1, mientras que Akt sí es un posible mecanismo mediador de la regulación de HO-1 por TMEM176B.*

Es importante confirmar los diferentes efectos funcionales que la inducción de HO-1 dependiente de TMEM176B puedan mostrar a nivel de la respuesta inmune y la sobrevida de trasplantes. Las células dendríticas son presentadoras de antígenos, las cuales al recibir una señal de “peligro” son estimuladas y procesan el antígeno para su presentación en las moléculas de MHC de clase I o II. Además, expresan moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 que junto al complejo MHC-péptido interactuarán con los receptores de los linfocitos T (58,59). En este trabajo utilizamos células dendríticas primarias derivadas de precursores de la médula ósea (BMDCs), las cuales se hacen madurar estimulando con LPS, adquiriendo un fenotipo con alta expresión de MHC-II y CD86. Cuando las BMDCs fueron tratadas con SANA, el porcentaje de células maduras MHC-II⁺ CD86⁺ disminuyó (Figura 2.12), sugiriendo que de alguna manera el SANA está inhibiendo la maduración de células dendríticas. Esto va acompañado con que la inducción de HO-1 en células dendríticas inhibe la maduración, impidiendo la secreción de citoquinas proinflamatorias y resultando en la inhibición de la proliferación de linfocitos T (293). Efectivamente, cuando a las BMDCs estimuladas con LPS se las trató con el SnPP (inhibidor de HO-1) y SANA, el efecto inhibidor de la maduración es revertido (Figura 2.13). No obstante, observamos que el simple tratamiento con SnPP muestra un aumento de la maduración, que al agregar el tratamiento con SANA restablece los porcentajes iniciales con la sola estimulación con LPS. *Esto sugiere que si bien la inhibición de la maduración por SANA depende de la inducción de HO-1, este nitroalqueno de alguna manera está promoviendo mecanismos compensatorios independientes de HO-1 que responden ante el efecto del SnPP sobre la maduración.*

En lo que respecta a TMEM176B, se ha reportado que regula la maduración de células dendríticas (190). En este trabajo mostramos que efectivamente en las BMDCs *Tmem176b*^{-/-} estimuladas con LPS, el porcentaje de células maduras es mayor que en las WT, sumado a que SANA inhibe la maduración tanto en WT como en *Tmem176b*^{-/-} (Figura 2.14). *Estos resultados sugieren que el efecto del SANA sobre la maduración es independiente de TMEM176B, no respondiendo a que el mecanismo SANA-TMEM176B/HO-1 propuesto tenga implicancia específica sobre la maduración de células dendríticas.*

Otro aspecto importante para estudiar, es el impacto del tratamiento con SANA a nivel de la inmunidad adaptativa en el contexto de una alorespuesta. Nos focalizamos en el análisis de las células T que tienen un papel crucial. En primera instancia, observamos que el SANA inhibe la proliferación de linfocitos T en una reacción leucocitaria mixta (MLR) con BMDCs presentadoras provenientes de ratones C57BL/6 y células de ganglios como respondedoras provenientes de ratones BALB/c (Figura 2.15). Este ensayo busca representar *in vitro* la interacción celular en un alotrasplante con incompatibilidad mayor (fully mismatched) y cabe destacar que el compuesto fue aplicado durante el cocultivo, desconociendo si el efecto inhibidor de la proliferación de linfocitos T se debe a que actúa sobre las células presentadoras o directamente sobre los linfocitos. Para confirmar esto se observó que en un sistema libre de células presentadoras (APC-free), linfocitos T purificados y activados con α -CD3 y α -CD28, al ser tratados con SANA proliferan menos (Figura 2.16), sugiriendo que hay una acción directa del compuesto sobre estas células. El siguiente paso fue evaluar el papel de HO-1 en la proliferación de linfocitos T en el MLR, donde en este caso fue necesario realizar un pretratamiento con SANA a las BMDCs para que estas logren expresar la enzima. Luego del pretratamiento, se las cocultivaron con las células respondedoras para incubar el MLR con SnPP, donde se observó que el efecto de SANA sobre la proliferación de linfocitos T es parcialmente revertido al inhibir a HO-1 (Figura 2.17). *Con estos resultados se concluyen dos puntos: 1) SANA ejerce efectos tanto a nivel de los linfocitos T y de las células dendríticas, 2) HO-1 está involucrada en la modulación de la respuesta inmune por SANA.*

Al comenzar a evaluar la sobrevida de los trasplantes, partimos de la base de que HO-1 ha mostrado efectos beneficiosos en modelos de trasplante de corazón (239,240) y TMEM176B es necesario en el efecto ejercido por SANA en los trasplantes de piel (Figura 2.5). Confirmamos en trasplante de piel en contexto de antígenos menores con ratones tratados con SANA y SnPP que esta enzima tiene un papel en el efecto prolongador del SANA en la sobrevida del injerto (Figura 2.18). Al inhibir la función de HO-1 en los ratones tratados con SANA se pierde la significancia en la sobrevida de los trasplantes respecto a los tratados con vehículo. HO-1 es una enzima inducible y no está expresada constitutivamente, por lo cual en los modelos de trasplante de corazón en ratas se ha sobreexpresado esta enzima mediante transfección génica usando adenovirus (239,240). En el trasplante de piel en ratones, SANA es el inductor de HO-1 de acuerdo a los datos obtenidos anteriormente (Figuras 2.7, 2.8 y 2.9). Con este resultado, podemos decir que *TMEM176B y HO-1 inciden a nivel del efecto in vivo de la sobrevida de los trasplantes, teniendo un papel importante en la modulación de la alorespuesta que lleva al rechazo.*

El hecho de estar trabajando con un compuesto que tiene como blanco al eje TMEM176B-HO-1 y además incide en la regulación de la alorespuesta, nos conduce a estudiar qué sucede con los linfocitos T reguladores (Tregs), actores importantes de la regulación del sistema inmune y el desarrollo de tolerancia en trasplantes (123,129,322). En el modelo de trasplante de piel con incompatibilidad menor, los ratones que son tratados con SANA muestran a los 15 días un porcentaje significativamente mayor de Tregs CD4⁺FoxP3⁺ intrainjerto, mientras que en el ganglio

drenante no se observaron diferencias (Figura 2.19). Cabe destacar que el salicilato no muestra un incremento de Tregs en ninguno de los órganos, resultado esperable debido a que no hubo efecto a nivel de la sobrevida (Figura 2.1A y B) y que no es capaz de activar a TMEM176B (Figura 2.3). Tomando en cuenta que la ventana de tiempo de 15 días posttrasplante permite que suceda la respuesta inmune innata y se desencadene la adaptativa, es coherente observar que SANA incrementalmente los Tregs en forma localizada en el injerto, modulando respuestas efectoras contra el trasplante. En definitiva, podemos concluir que *el efecto de aumento de la sobrevida por SANA se debe a un incremento de Tregs en el trasplante*. Se ha estudiado que HO-1 tiene implicancias sobre las células Tregs, donde su expresión en células dendríticas promueve la diferenciación de linfocitos T a Tregs y su actividad en células presentadoras de antígenos media la función supresora de las Tregs (185,297,298). Esto lo confirmamos *in vivo* en los trasplantes de piel, donde a 15 días en los injertos de animales tratados con SANA y con SnPP inhibiendo HO-1, no se incrementó el porcentaje de Tregs CD4⁺FOXP3⁺, suprimiéndose el efecto de SANA al inhibir HO-1 (Figura 2.20). Tomando en cuenta los resultados donde SANA prolonga la sobrevida de manera dependiente de Tmem176b (Figura 2.5), HO-1 tiene un papel importante en la sobrevida y el incremento de Tregs (Figuras 2.18 y 2.20) y que el SANA muestra más células dendríticas expresando HO-1 de manera dependiente de Tmem176b (Figura 2.9 C y D), concluimos que:

SANA activa farmacológicamente a TMEM176B induciendo la expresión de HO-1, promoviendo un incremento y diferenciación de Tregs, dando como resultado la prolongación de la sobrevida del trasplante.

Este mecanismo que concluimos a partir de los resultados obtenidos en esa tesis, se resume en el esquema mostrado a continuación en la Figura 3.1.

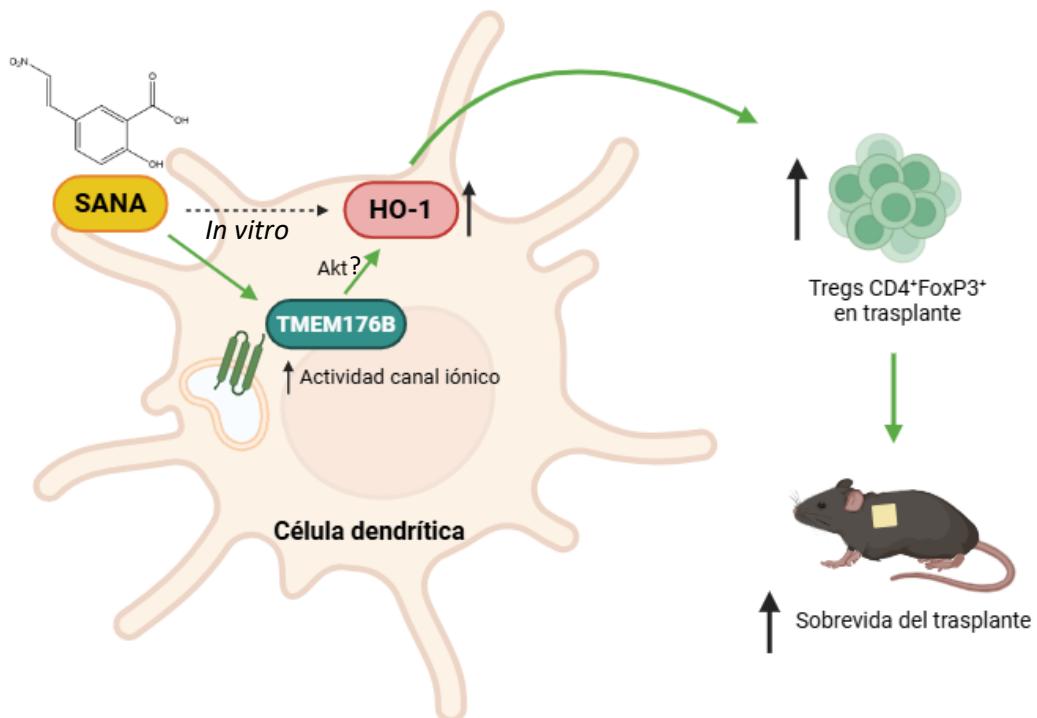


Figura 3.1. Conclusión del mecanismo inmunomodulador de la activación farmacológica de TMEM176B. Tomando en cuenta los resultados *in vivo* e *in vitro* obtenidos en este trabajo, planteamos este mecanismo por el cual la activación farmacológica de TMEM176B modula la sobrevida del trasplante. Utilizando como herramienta farmacológica al nitroalqueno SANA, este activa a TMEM176B como canal iónico, el cual se encuentra mayormente expresado en membranas intracelulares de células mieloides como las células dendríticas. TMEM176B favorece a una mejor inducción de HO-1 en la dendrítica, desencadenando luego un incremento de Tregs CD4⁺FoxP3⁺ en el trasplante que concluye en la prolongación de la sobrevida del mismo.

Se ha mostrado que utilizando un tratamiento con células dendríticas tolerogénicas (Tol-DCs), en el mismo modelo murino de antígenos menores (185), solo las WT protegían al trasplante. De un punto de vista mecanístico, esto dependía del proceso de presentación cruzada de antígenos que tenía como resultado la generación de células T CD8⁺CD11c⁺ específicas de antígenos con funciones reguladoras. Este efecto no era posible cuando se administraban Tol-DCs *Tmem176b*^{-/-} (185). Sin embargo, en un contexto tumoral en los ganglios drenantes del tumor, se ha observado un mayor porcentaje de Tregs CD4⁺FoxP3⁺ en ratones WT respecto a los *Tmem176b*^{-/-} (184). Esto sugiere que TMEM176B también promueve la diferenciación a Tregs y fortalece la idea del mecanismo propuesto del eje SANA-TMEM176B/HO-1 modulando la alorespuesta mediante un incremento de Tregs.

Sin embargo, no debemos olvidar que la inducción de HO-1 es parcialmente dependiente de la activación farmacológica de TMEM176B por SANA (Figura 2.9 A y B), lo que sugiere que existen mecanismos independientes involucrados en el aumento de la expresión de esta enzima. El hecho de que la ausencia de TMEM176B no haya impedido completamente que se exprese HO-1 en respuesta al tratamiento con SANA, puede explicarse porque estén actuando mecanismos compensatorios no relacionados a la activación de TMEM176B. Dichos mecanismos probablemente se deban a la acción

del SANA como nitroalqueno sobre otras vías que regulan a HO-1, tomando en cuenta que estos compuestos activan a Nrf-Keap1 (233). La activación de esta vía es la manera clásica por la cual se induce la expresión de HO-1 (277), aunque también existen otras alternativas independientes de Nrf2 por las cuales los nitroalquenos logran inducirla (236). De todas maneras, *nuestros resultados muestran dos aspectos biológicamente relevantes que son dependientes de la activación de TMEM176B: el efecto in vivo en la sobrevida del trasplante de piel y el aumento de DCs CD11b⁺ que expresan HO-1 en el injerto* (Figuras 2.3 y 2.7 C y D).

Se debe tener presente que un tratamiento que prevenga el rechazo de trasplantes debe tener un componente inmunosupresor que disminuya la acción del sistema inmune para evitar el rechazo agudo. Sin embargo, el desafío es disminuir las dosis y aplicaciones en forma crónica para evitar los efectos adversos mencionados, buscando que se establezcan mecanismos de tolerancia que perduren en el tiempo. El SANA ha mostrado tener un efecto significativo en la sobrevida de trasplantes en modelos animales (Figura 2.1), pero un simple tratamiento con este compuesto solo postergaría el rechazo. Es así que surge el interés de combinarlo con algún inmunosupresor, habiendo sido nuestra elección la combinación con el fragmento Fab del anti-CD3 (160). Los motivos de elección de este inmunosupresor fueron, en primer lugar, que se trata de un anticuerpo con acción específica en linfocitos T y no es sistémico como los más convencionales (por ejemplo: ciclosporina, tacrolimus, rapamicina). En segundo lugar, al tratarse del fragmento Fab se estaría evitando los efectos secundarios relacionados a la región Fc, como sucedía con la forma total del anti-CD3 original (OKT3) (162,167). Por último, se sabe que genera Tregs y especulamos sea sinérgico con SANA que también las genera (Figura 2.19). Nos propusimos seguir el protocolo de tratamiento realizado en el trabajo de *M. Segovia et al, 2014, Am. J. Transp.* (185), conservando la administración diaria de SANA desde el día previo al trasplante hasta 15 días postrasplante por vía orogástrica, inyectando en paralelo dosis del fragmento Fab de anti-CD3 desde el día previo a la cirugía hasta el día 7 por vía intraperitoneal cada 2 días. La acción del anti-CD3 consiste en dos etapas: la primera a corto plazo de depleción de los linfocitos T y una segunda a largo plazo de generación de Tregs dependiente de TGF-β (159,161,323). Con este protocolo de tratamiento, se permite que suceda durante los 7 días de su aplicación la primera etapa de depleción, dando lugar posteriormente a la generación de Tregs para establecer mecanismos de tolerancia. Esto fue confirmado en los trasplantes de piel en ratones con incompatibilidad menor, los cuales al ser tratados con SANA y anti-CD3-Fab mejoró significativamente el efecto del SANA, tendiendo a ser mejor que el simple tratamiento con anti-CD3-Fab (Figura 2.21). Cabe destacar que más del 50% de los animales tratados con ambos componentes lograron superar el día 100 sin rechazar, lo que en este tipo de modelos es considerado que alcanza la tolerancia. En los tratamientos simples con SANA o con anti-CD3-Fab, menos del 50% sobrepasaron el día 100. Hemos planteado un mecanismo de SANA como modulador de la aiorespuesta del rechazo de trasplantes a través de TMEM176B y HO-1 que deriva en un incremento de Tregs, que en conjunto con las propiedades de acción del anti-CD3 como generador de estos linfocitos, pueden establecer efectos sinérgicos que aporten a la inducción de tolerancia. Esto se confirmó al analizar las poblaciones celulares en los injertos de piel a

los 15 días, donde los ratones tratados con SANA y anti-CD3-Fab mejoraron los porcentajes de Tregs CD4⁺FoxP3⁺, incrementándose significativamente respecto a los monotratamientos con SANA y con anti-CD3-Fab (Figura 2.22). Este protocolo de SANA y anti-CD3 también se aplicó en un modelo de trasplante de piel en contexto de antígenos mayores, transplantando piel de un ratón donante de la cepa BALB/c a un receptor C57BL/6 (Figura 2.23). Este modelo tiene la particularidad de ser más exigente debido a la fuerte respuesta contra el injerto que lo hace rechazar más rápido, en lo cual está descrito una media de sobrevida en animales sin tratar de 7-8 días como obtuvimos en nuestro experimento (314,315). Por este motivo, es muy difícil observar diferencias en la sobrevida como sucede en el modelo con incompatibilidad menor, siendo que el simple tratamiento con SANA en este contexto no prolonga significativamente. Sin embargo, los tratamientos con inmunosupresores que tienen efectos significativos, se logran visualizar en estos modelos en un corrimiento de la sobrevida del injerto, hecho que sucedió cuando aplicamos el anti-CD3. Este mejoró significativamente el efecto del SANA, reproduciendo el resultado obtenido en el modelo de piel en contexto de antígenos menores. Estos resultados dan lugar a plantear que *la combinación de SANA y anti-CD3 puede ser un potencial encare terapéutico para proteger el injerto*.

En suma, este trabajo deja como aporte un mecanismo que puede ser regulado farmacológicamente, el cual puede considerarse como blanco terapéutico para modular la alorespuesta y mejorar la sobrevida de los trasplantes. Sin embargo, puede ser de interés estudiar al SANA con otras combinaciones de inmunosupresores y ampliar a otros modelos de trasplantes para ver el efecto que tiene en otros órganos y tejidos. Esto hallazgos podrían ser fundamentales para desarrollar estrategias terapéuticas, incluso en otros escenarios clínicos como lo es la autoinmunidad.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En esta tesis doctoral, nos planteamos estudiar los efectos y mecanismos inmunoreguladores inducidos farmacológicamente para favorecer la sobrevida del alotrasplante.

Las principales conclusiones que surgen de esta tesis son:

- SANA prolonga la sobrevida de los aloinjertos en modelos animales de trasplantes de piel y corazón.
- El transporte iónico mediado por TMEM176B es activado farmacológicamente por SANA.
- El efecto *in vivo* de SANA en trasplante de piel es dependiente de Tmem176b.
- La activación de Tmem176b por SANA regula la inducción de Hemoxygenasa-1, posiblemente a través de la fosforilación de Akt. Sin embargo, la inducción de HO-1 es solo parcialmente dependiente de la activación farmacológica de TMEM176B.
- La inducción de Hemoxygenasa-1 por SANA promueve el incremento de Tregs CD4⁺ FoxP3⁺ en el trasplante, favoreciendo hacia una mejor sobrevida del injerto.
- El tratamiento que combina SANA y anti-CD3 (fragmento Fab) mejoran significativamente la sobrevida de trasplantes de piel e incrementa Tregs.

En suma, se concluye de esta tesis de Doctorado que ***el canal iónico TMEM176B es activado farmacológicamente por el compuesto SANA, desencadenando la inducción de Hemoxygenasa-1 como mecanismo inmunomodulador. Este mecanismo promueve el incremento de linfocitos T reguladores, favoreciendo al aumento de la sobrevida del trasplante.***

Esto aporta un mecanismo donde sus actores moleculares pueden servir como blancos farmacológicos para otras drogas y dar lugar para profundizar en el estudio de esta vía de señalización englobada en la respuesta inmune en trasplantes. Además, en esta tesis se aporta una potencial combinación terapéutica que pueda servir como estrategia para aliviar los efectos adversos de las terapias inmunosupresoras convencionales y prolongar la sobrevida del alotrasplante.

PERSPECTIVAS

PERPECTIVAS

Los resultados obtenidos en esta tesis dejan propuesta una vía de señalización desencadenada por la activación farmacológica de TMEM176B que promueve la inducción de HO-1.

En primer lugar, es importante plantearnos un *estudio profundizado del mecanismo de activación de TMEM176B por SANA*. En este sentido, la realización de análisis de interacciones covalentes entre la droga y la estructura proteica de TMEM176B, así como ver los aminoácidos que son modificados, sería importante para reforzar el mecanismo planteado en esta tesis. En forma preliminar, se realizó una prueba mediante herramientas computacionales para analizar hipotéticas interacciones de SANA con la estructura de TMEM176B, gracias a la colaboración del Dr. Martín Sóñora y la Dra. Lucianna Silva Dos Santos del Laboratorio de Simulaciones Biomoleculares del Institut Pasteur de Montevideo. Solo se analizó en el dominio transmembrana debido a que es la parte confiable en la que se pudo trabajar, debido a que el conocimiento acerca de la estructura de TMEM176B está en desarrollo y aún no es claro. Los hipotéticos sitios en los que SANA podría interaccionar tanto en el dímero, trímero y tetrámero, se encuentran mayormente en los extremos del dominio transmembrana, aunque es necesario complementar con estudios de dinámica molecular y avanzar sobre la estructura de TMEM176B.

También observamos que el mecanismo entre *TMEM176B y HO-1 es dependiente de la activación de Akt, siendo necesario profundizar más en este aspecto para entender cómo ocurre este nexo*. Esto puede abordarse estudiando con la aplicación de otros inhibidores de la vía PI3K/Akt distintos a la triciribina (Ejemplo: LY294002, AKT VIII, Wortmanina), analizando ambas fosforilaciones de Akt en la serina 471 (Ser471) y treonina 308 (Thr308). Otro complemento importante sería estudiar qué sucede a lo largo de esta vía, analizando por ejemplo fosforilaciones en mTORC2 y PDK1 (rio arriba) o GSK-3 y mTORC1 (rio abajo).

En este trabajo utilizamos modelos de trasplantes donde se abarcaron dos tipos de incompatibilidades, diferencias en complejidad y dinámica de rechazo: piel y corazón. Sin embargo, *el estudio en otros trasplantes puede ser de especial interés*, como por ejemplo riñón, hígado y pulmón que son muy comunes en la clínica, o bien en trasplantes de médula ósea o células hematopoyéticas que tienen la particularidad de desencadenar una respuesta de donante contra receptor (GVHD, del inglés “Graft Versus Host Disease”). Al ser esta respuesta diferente a la estudiada en este trabajo (receptor contra donante), surge la interrogante acerca del funcionamiento en este contexto del mecanismo y la aproximación farmacológica planteados en esta tesis.

Otra perspectiva importante es *estudiar combinaciones de SANA con otros inmunosupresores*, principalmente con drogas convencionales (como tacrolimus y

rapamicina) siguiendo el mismo razonamiento de disminuir las dosis para aliviar los efectos secundarios y ejercer acciones sinérgicas para prevenir el rechazo.

Por último, SANA ha sido objeto de estudio en un ensayo clínico de fase I A/B en Australia como fármaco para enfermedades metabólicas y relacionadas a la obesidad (259), el cual se ha concluido con éxito sin reportarse efectos adversos de importancia y confirmado que este fármaco es seguro. En este contexto, SANA actúa a nivel del metabolismo estimulando mecanismos termogénicos dependientes de la vía de la creatina en tejido adiposo (259), despertando el interés de *estudiar mecanismos a nivel metabólico en células inmunes involucradas en la alorespuesta que puedan ser regulados por SANA*.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi tutora Mercedes Segovia por darme la oportunidad de llevar adelante este proyecto y orientarme tanto en lo académico y lo personal, contribuyendo enormemente a mi carrera científica.

A Carlos Batthyány que ha tenido una participación fundamental en este trabajo y me ha guiado y aportado en todo lo referente a los nitroalquenos. Agradecerle también por haberme integrado a su equipo de investigación en mis comienzos en el Institut Pasteur de Montevideo, realizando mi tesina de finalización de grado para recibarme de licenciado en Bioquímica y posteriormente mis estudios de Maestría que concluyeron en la realización del pasaje a Doctorado. En el marco de mi tesina de finalización de carrera, agradezco a Horacio Botti que también fue tutor de ese trabajo ayudándome a dar mis primeros pasos en el ámbito científico.

Al equipo del Laboratorio de Síntesis Orgánica y Desarrollo de Fármacos, anteriormente denominado Laboratorio de Biología Vascular y Desarrollo de Fármacos, comenzando por Jorge Rodríguez con el que diariamente hemos trabajado a la par, ayudándome y enseñándome en la rutina del laboratorio, siendo un excelente compañero. A Rosina Dapueto que durante su paso por el laboratorio ha contribuido en experimentos de mi Maestría, destacándola también como una excelente compañera. A Virginia López, Williams Porcal y todo su equipo encargado de la síntesis química de los compuestos, proporcionándome el SANA para la realización de todos los experimentos de esta tesis.

Al equipo del Laboratorio de Inmunoregulación e Inflamación, comenzando por Mercedes Segovia por aceptar y llevar adelante la tutoría de esta tesis, junto a Marcelo Hill que como responsable del laboratorio me abrió sus puertas y también ha sido parte importante del trabajo con muchos aportes. La incorporación a este grupo me ha permitido aprender y desarrollar todas las técnicas y conocimientos en inmunología mostrados en este trabajo. A todos los compañeros integrantes del LIRI que están y han estado, destacando el aporte de Sofía Russo y David Charbonnier en los experimentos en células de actividad TMEM176B.

A la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas con Rosario Duran como responsable, que junto a Alejandro Leyva han permitido que pueda realizar los experimentos de proteómica mediante espectrometría de masa utilizando los recursos de la plataforma. Además, agradecer a esta unidad por cederme el espacio en el que actualmente tengo mi escritorio y por integrarme cuando llegué al instituto para realizar mi tesina de grado.

Al Laboratorio de Patologías del Metabolismo y Envejecimiento liderado por Carlos Escande, en el cual integrantes de su grupo me han ayudado y enseñado en técnicas de biología molecular y western blot que he aplicado en esta tesis y en mi Maestría.

A Martín Soñora y Lucianna Silva Dos Santos del Laboratorio de Simulaciones Biomoleculares, quienes han colaborado en la búsqueda de posibles interacciones del SANA con TMEM176B utilizando herramientas computacionales.

A la Unidad de Biotecnología en Animales de Laboratorio por brindar los servicios de cuidado y mantenimiento en el bioriego SPF que permitieron llevar a cabo los experimentos con ratones.

A la Unidad de Biología Celular por capacitarme y permitirme el uso de la plataforma de citometría de flujo, técnica muy utilizada en esta tesis.

A nuestros colaboradores Ignacio Anegón y María Cristina Cuturi del “Centre de Recherché en Immunologie et Transplantation”, INSERM UMR 1064 en la ciudad de Nantes, Francia. Ellos y su equipo han aportado con los experimentos de trasplante de corazón en ratas y me permitieron irme de pasantía a su laboratorio en el inicio de mi Doctorado, experiencia totalmente nueva en ese momento que me sirvió para mi desarrollo y formación científica. Mi agradecimiento también a la Embajada de Francia en Uruguay que me financió una beca para la realización de esta pasantía y a ECOS SUD que también aportó en la financiación de los gastos de viaje.

Agradezco a EOLO Pharma que ha sido un pilar importante para la patente del SANA y todos los procesos que lo llevaron al ensayo clínico en humanos. EOLO también ha financiado parte de mi salario cuando ya no contaba con la financiación de las becas que habían finalizado.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) que me ha financiado con una beca de Doctorado Nacional en el período entre marzo de 2019 y febrero de 2022, y a la Comisión Académica de Posgrado que de marzo de 2022 hasta marzo de 2023 me ha otorgado una beca de Finalización de Doctorado.

A todas y todos los compañeros del instituto, de todas las áreas, con quienes de alguna manera me he vinculado y me han estimulado a trabajar, compartir varias horas del día de la mejor manera y me han tenido paciencia.

Para finalizar, quiero agradecer a mis amigos y mi familia, a los cuales les agradeceré siempre por el apoyo incondicional que me han brindado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lechler RI, Sykes M, Thomson AW, Turka LA. Organ transplantation--how much of the promise has been realized? *Nat Med* [Internet]. 2005 Jun [cited 2023 Feb 28];11(6):605–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15937473/>
2. Granot N, Storb R. History of hematopoietic cell transplantation: challenges and progress. *Haematologica* [Internet]. 2020 Oct 9 [cited 2025 May 13];105(12):2716–29. Available from: <https://haematologica.org/article/view/haematol.2019.245688>
3. Tamargo CL, Kant S. Pathophysiology of Rejection in Kidney Transplantation. *J Clin Med* [Internet]. 2023 Jun 1 [cited 2025 May 13];12(12):4130. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10299312/>
4. Feng S, Roll GR, Rouhani FJ, Sanchez Fueyo A. The future of liver transplantation. *Hepatology* [Internet]. 2024 Sep 1 [cited 2025 May 13];80(3):674–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38537154/>
5. Srivastava PK, Kittleson MM. Modern advances in heart transplantation. *Prog Cardiovasc Dis* [Internet]. 2024 Jan 1 [cited 2025 May 13];82:147–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38244826/>
6. Vos R, Lindstedt S, Levine DJ, Shigemura N. Innovations in Lung Transplant Research and Practice: The Future is Now. *Transplant International* [Internet]. 2025 Feb 4 [cited 2025 May 13];38:14336. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11832309/>
7. Espinoza-Loyola PS, Fernández-López LJ, Mogrovejo-Vázquez PS, Mondragón-Rodríguez F, González-Moreno JA, Torres-Del Real DA, et al. Pancreas transplantation: review. *Cirugía y Cirujanos (English Edition)* [Internet]. 2024 Jul 1 [cited 2025 May 13];92(4):547–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39079245/>
8. Casey MJ, Murakami N, Ong S, Adler JT, Singh N, Murad H, et al. Medical and Surgical Management of the Failed Pancreas Transplant. *Transplant Direct* [Internet]. 2023 Dec 12 [cited 2025 May 13];10(1):E1543. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38094134/>
9. Georgea AJT, Larkin DFP. Corneal Transplantation: The Forgotten Graft. *American Journal of Transplantation* [Internet]. 2004 May 1 [cited 2025 Jun 24];4(5):678–85. Available from: <https://www.amjtransplant.org/action/showFullText?pii=S1600613522075232>
10. Ramly EP, Alfonso AR, Berman ZP, Diep GK, Bass JL, Catalano LW, et al. The First Successful Combined Full Face and Bilateral Hand Transplant. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2024 Dec 3];150(2):414–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35674521/>
11. Griffith BP, Grazioli A, Singh AK, Tully A, Galindo J, Saharia KK, et al. Transplantation of a genetically modified porcine heart into a live human. *Nature Medicine* 2025 31:2 [Internet]. 2025 Jan 8 [cited 2025 Jun 23];31(2):589–98. Available from: <https://www-nature-com.proxy.timbo.org.uy/articles/s41591-024-03429-1>

12. Mallapaty S. Tiny human hearts grown in pig embryos for the first time. *Nature* [Internet]. 2025 Jun 13 [cited 2025 Jun 23]; Available from: <https://www.nature.com/articles/d41586-025-01854-x>
13. Reichman TW, Markmann JF, Odorico J, Witkowski P, Fung JJ, Wijkstrom M, et al. Stem Cell-Derived, Fully Differentiated Islets for Type 1 Diabetes. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2025 Jun 20 [cited 2025 Jun 25]; Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2506549>
14. Oli AN, Rowaiye AB, Adejumo SA, Anazodo FI, Ahmad R, Sinha S, et al. Classic and Current Opinions in Human Organ and Tissue Transplantation. *Cureus* [Internet]. 2022 Nov 1 [cited 2025 May 13];14(11):e30982. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9624478/>
15. Ley N°18968 de 2012. Donación y transplante de células, órganos y tejidos. [Internet]. <https://parlamento.gub.uy/documentosyleyes/leyes/ley/18968>. [cited 2025 Jun 26]. Available from: <https://parlamento.gub.uy/documentosyleyes/leyes/ley/18968>
16. Phillips BL, Callaghan C. The immunology of organ transplantation. *Surgery (Oxford)* [Internet]. 2023 Sep 1 [cited 2025 May 13];41(9):543–51. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263931923001436>
17. Marino J, Paster J, Benichou G. Allore cognition by T lymphocytes and allograft rejection. Vol. 7, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2016.
18. Carnel N, Lancia HH, Guinier C, Benichou G. Pathways of Antigen Recognition by T Cells in Allograft Rejection. *Transplantation* [Internet]. 2022; Available from: www.transplantjournal.com
19. Steinmuller D. Passenger leukocytes and the immunogenicity of skin allografts. *Journal of Investigative Dermatology*. 1980;75(1):107–15.
20. Rosenberg AS, Singer A. Cellular basis of skin allograft rejection: an in vivo model of immune-mediated tissue destruction. *Annu Rev Immunol*. 1992;10:333–58.
21. Lindahl KF, Wilson DB. Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes. II. Estimates of the frequency and specificity of precursors. *J Exp Med* [Internet]. 1977 Mar 1 [cited 2023 Mar 29];145(3):508–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/233899/>
22. Ashwell JD, Chen C, Schwartz RH. High frequency and nonrandom distribution of alloreactivity in T cell clones selected for recognition of foreign antigen in association with self class II molecules. *J Immunol*. 1986 Jan;136(2):389–95.
23. Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, Turka LA. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J Immunol* [Internet]. 2001 Jan 15 [cited 2023 Mar 29];166(2):973–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11145675/>
24. Benichou G, Valujskikh A, Heeger PS. Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice. *J Immunol*. 1999 Jan 1;162(1):352–8.

25. Kazansky DB. MHC restriction and allogeneic immune responses. *J Immunotoxicol* [Internet]. 2008 Oct [cited 2025 May 12];5(4):369–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19404871/>
26. Rogers NJ, Lechler RI. Allorecognition. *American Journal of Transplantation* [Internet]. 2001 Jul 1 [cited 2025 May 12];1(2):97–102. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1600613522073579?via%3Dihub>
27. Maguire C, Wang C, Ramasamy A, Fonken C, Morse B, Lopez N, et al. Molecular mimicry as a mechanism of viral immune evasion and autoimmunity. *Nature Communications* 2024 15:1 [Internet]. 2024 Oct 30 [cited 2025 May 12];15(1):1–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-024-53658-8>
28. Rojas M, Restrepo-Jiménez P, Monsalve DM, Pacheco Y, Acosta-Ampudia Y, Ramírez-Santana C, et al. Molecular mimicry and autoimmunity. *J Autoimmun* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2025 May 12];95:100–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30509385/>
29. Gowthaman U, Eswarakumar VP. Molecular mimicry. *Virulence* [Internet]. 2013 [cited 2025 May 12];34:119–32. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/viru.25780>
30. Benichou G, Takizawa PA, Ho PT, Killion CC, Olson CA, Mcmillan M, et al. Immunogenicity and Tolerogenicity of Self-Major Histocompatibility Complex Peptides.
31. Golding H, Singer A. Role of accessory cell processing and presentation of shed H-2 alloantigens in allospecific cytotoxic T lymphocyte responses. *J Immunol*. 1984 Aug;133(2):597–605.
32. Suciu-Foca N, Harris PE, Cortesini R. Intramolecular and intermolecular spreading during the course of organ allograft rejection. *Immunol Rev* [Internet]. 1998 Aug [cited 2023 Mar 29];164:241–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9795780/>
33. Goulmy E. Human minor histocompatibility antigens. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 1996 [cited 2023 Mar 29];8(1):75–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8729449/>
34. Joly E, Hudrisier D. What is trogocytosis and what is its purpose? *Nat Immunol* [Internet]. 2003 Sep 1 [cited 2023 Mar 29];4(9):815. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12942076/>
35. Brown K, Sacks SH, Wong W. Extensive and bidirectional transfer of major histocompatibility complex class II molecules between donor and recipient cells *in vivo* following solid organ transplantation. *FASEB J* [Internet]. 2008 Nov [cited 2023 Mar 29];22(11):3776–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18632850/>
36. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2002 [cited 2023 Mar 29];2(8):569–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12154376/>
37. Harper SJF, Ali JM, Wlodek E, Negus MC, Harper IG, Chhabra M, et al. CD8 T-cell recognition of acquired alloantigen promotes acute allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2015 Oct 13 [cited 2023 Mar 29];112(41):12788–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26420874/>

38. Markey KA, Koyama M, Gartlan KH, Leveque L, Kuns RD, Lineburg KE, et al. Cross-dressing by donor dendritic cells after allogeneic bone marrow transplantation contributes to formation of the immunological synapse and maximizes responses to indirectly presented antigen. *J Immunol* [Internet]. 2014 Jun 1 [cited 2023 Mar 29];192(11):5426–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24790149/>
39. Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Ochoa FS, James MJ, Marelli-Berg FM, et al. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol* [Internet]. 2004 Oct 15 [cited 2023 Mar 29];173(8):4828–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15470023/>
40. Smyth LA, Herrera OB, Golshayan D, Lombardi G, Lechler RI. A novel pathway of antigen presentation by dendritic and endothelial cells: Implications for allorecognition and infectious diseases. *Transplantation* [Internet]. 2006 Jul [cited 2023 Mar 29];82(1 Suppl). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16829787/>
41. Russo V, Zhou D, Sartirana C, Rovere P, Villa A, Rossini S, et al. Acquisition of intact allogeneic human leukocyte antigen molecules by human dendritic cells. *Blood*. 2000 Jun 1;95(11):3473–7.
42. Roopenian D, Young Choi E, Brown A. The immunogenomics of minor histocompatibility antigens. *Immunol Rev* [Internet]. 2002 Dec [cited 2023 Mar 29];190:86–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12493008/>
43. Warrens AN, Lombardi G, Lechler RI. Presentation and recognition of major and minor histocompatibility antigens. *Transpl Immunol* [Internet]. 1994 [cited 2023 Mar 29];2(2):103–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7953301/>
44. Goulmy E, Pool J, Van Lochem E, Vö lker-Dieben R. The role of human minor histocompatibility antigens in graft failure: a mini-review. *Eye (Lond)* [Internet]. 1995 [cited 2023 Mar 29];9 (Pt 2)(2):180–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7556714/>
45. Zorn E, See SB. Antibody Responses to Minor Histocompatibility Antigens After Solid Organ Transplantation. *Transplantation* [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2023 Mar 29];106(4):749–53. Available from: https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/2022/04000/Antibody_Responses_to_Minor_Histocompatibility.18.aspx
46. Simpson E, Scott D, James E, Lombardi G, Cwynarski K, Dazzi F, et al. Minor H antigens: genes and peptides. Vol. 10, *Transplant Immunology*. 2002.
47. Millrain M, Chandler P, Dazzi F, Scott D, Simpson E, Dyson PJ. Examination of HY response: T cell expansion, immunodominance, and cross-priming revealed by HY tetramer analysis. *J Immunol* [Internet]. 2001 Oct 1 [cited 2023 Mar 29];167(7):3756–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11564792/>
48. Millrain M, Scott D, Addey C, Dewchand H, Ellis P, Ehrmann I, et al. Identification of the immunodominant HY H2-D(k) epitope and evaluation of the role of direct and indirect antigen presentation in HY responses. *J Immunol* [Internet]. 2005 Dec 1 [cited 2023 Mar 29];175(11):7209–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16301625/>

49. Chen Y, Demir Y, Valujskikh A, Heeger PS. The male minor transplantation antigen preferentially activates recipient CD4+ T cells through the indirect presentation pathway in vivo. *J Immunol* [Internet]. 2003 Dec 15 [cited 2023 Mar 29];171(12):6510–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14662851/>
50. Scott DM, Ehrmann IE, Ellis PS, Chandler PR, Simpson E. Why do some females reject males? The molecular basis for male-specific graft rejection. *J Mol Med* [Internet]. 1997 [cited 2025 May 12];75(2):103–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9083928/>
51. Fernandes E, Goold HD, Kisselkell A, Malissen B, Dyson J, Bennett CL. The role of direct presentation by donor dendritic cells in rejection of minor histocompatibility antigen-mismatched skin and hematopoietic cell grafts. *Transplantation* [Internet]. 2011 Jan 27 [cited 2025 May 12];91(2):154–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21085063/>
52. James E, Scott D, Chai JG, Millrain M, Chandler P, Simpson E. HY peptides modulate transplantation responses to skin allografts. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2025 May 12];14(11):1333–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12407024/>
53. Valujskikh A, Baldwin WM, Fairchild RL. Recent Progress and New Perspectives in Studying T Cell Responses to Allografts. *American Journal of Transplantation*. 2010 May 1;10(5):1117–25.
54. Kaech SM, Ahmed R. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells. *Nat Immunol* [Internet]. 2001 [cited 2023 Mar 29];2(5):415. Available from: [/pmc/articles/PMC3760150/](https://pmc/articles/PMC3760150/)
55. Van Stipdonk MJB, Lemmens EE, Schoenberger SP. Naïve CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol* [Internet]. 2001 [cited 2023 Mar 29];2(5):423–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11323696/>
56. Wong P, Pamer EG. Cutting edge: antigen-independent CD8 T cell proliferation. *J Immunol* [Internet]. 2001 May 15 [cited 2023 Mar 29];166(10):5864–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11342598/>
57. Valujskikh A, Lantz O, Celli S, Matzinger P, Heeger PS. Cross-primed CD8(+) T cells mediate graft rejection via a distinct effector pathway. *Nat Immunol* [Internet]. 2002 [cited 2023 Mar 29];3(9):844–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12172545/>
58. Li XC, Rothstein DM, Sayegh MH. Costimulatory pathways in transplantation: challenges and new developments. *Immunol Rev* [Internet]. 2009 May [cited 2023 Mar 29];229(1):271–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19426228/>
59. Jenkins MK, Johnson JG. Molecules involved in T-cell costimulation. *Curr Opin Immunol*. 1993;5(3):361–7.
60. Clarkson MR, Sayegh MH. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Transplantation* [Internet]. 2005 Sep 15 [cited 2023 Mar 29];80(5):555–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16177624/>

61. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* [Internet]. 1991 Sep 1 [cited 2023 Mar 29];174(3):561–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1714933/>
62. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* [Internet]. 1994 [cited 2023 Mar 29];1(5):405–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7882171/>
63. Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2003 [cited 2023 Apr 3];3(8):609–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12974476/>
64. Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ. CD40/CD154 Interactions at the Interface of Tolerance and Immunity. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22012703104533> [Internet]. 2004 Mar 19 [cited 2023 Apr 3];22:307–28. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104533>
65. Ford ML, Larsen CP. Translating costimulation blockade to the clinic: lessons learned from three pathways. *Immunol Rev* [Internet]. 2009 May [cited 2023 Apr 3];229(1):294–306. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19426229/>
66. Li XC, Strom TB, Turka LA, Wells AD. T cell death and transplantation tolerance. *Immunity* [Internet]. 2001 [cited 2023 Apr 3];14(4):407–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11336686/>
67. Harty JT, Badovinac VP. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nature Reviews Immunology* 2008 8:2 [Internet]. 2008 Feb [cited 2025 May 13];8(2):107–19. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri2251>
68. Curtsinger JM, Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2010 Jun [cited 2025 May 13];22(3):333–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20363604/>
69. Bennett SRM, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JFAP, Heath WR. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* [Internet]. 1998 Jun 4 [cited 2025 May 13];393(6684):478–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9624004/>
70. Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4 + T-helper and a T-killer cell. *Nature* [Internet]. 1998 Jun 4 [cited 2025 May 13];393(6684):474–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9624003/>
71. Schoenberger SP, Toes REM, Van Dervoort EIH, Offringa R, Melief CJM. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* [Internet]. 1998 Jun 4 [cited 2025 May 13];393(6684):480–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9624005/>
72. Bevan MJ. Helping the CD8+ T-cell response. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2004 [cited 2025 May 13];4(8):595–602. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15286726/>

73. Marzo AL, Vezys V, Klonowski KD, Lee SJ, Muralimohan G, Moore M, et al. Fully Functional Memory CD8 T Cells in the Absence of CD4 T Cells. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2004 Jul 15 [cited 2025 May 13];173(2):969–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15240684/>
74. Peacock CD, Kim SK, Welsh RM. Attrition of Virus-Specific Memory CD8+ T Cells During Reconstitution of Lymphopenic Environments. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2003 Jul 15 [cited 2025 May 13];171(2):655–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12847230/>
75. Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* (1979) [Internet]. 2003 Apr 11 [cited 2025 May 13];300(5617):337–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12690201/>
76. Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, Von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* [Internet]. 2003 Feb 20 [cited 2025 May 13];421(6925):852–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12594515/>
77. D'Souza WN, Lefrançois L. IL-2 Is Not Required for the Initiation of CD8 T Cell Cycling but Sustains Expansion. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2003 Dec 1 [cited 2025 May 13];171(11):5727–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14634080/>
78. Yu A, Zhou J, Marten N, Bergmann CC, Mammolenti M, Levy RB, et al. Efficient Induction of Primary and Secondary T Cell-Dependent Immune Responses In Vivo in the Absence of Functional IL-2 and IL-15 Receptors. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2025 May 13];170(1):236–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12496405/>
79. Williams MA, Tynnik AJ, Bevan MJ. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* [Internet]. 2006 Jun 15 [cited 2025 May 13];441(7095):890–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16778891/>
80. Wilson EB, Livingstone AM. Cutting Edge: CD4+ T Cell-Derived IL-2 Is Essential for Help-Dependent Primary CD8+ T Cell Responses. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2008 Dec 1 [cited 2025 May 13];181(11):7445–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19017930/>
81. Jones ND, Carvalho-Gaspar M, Luo S, Brook MO, Martin L, Wood KJ. Effector and Memory CD8+ T Cells Can Be Generated in Response to Alloantigen Independently of CD4+ T Cell Help. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2006 Feb 15 [cited 2025 May 13];176(4):2316–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16455988/>
82. Wu Z, Wang Y, Gao F, Shen X, Zhai Y, Kupiec-Weglinski JW. Critical Role of CD4 Help in CD154 Blockade-Resistant Memory CD8 T Cell Activation and Allograft Rejection in Sensitized Recipients. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2008 Jul 15 [cited 2025 May 13];181(2):1096–102. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18606661/>
83. Horne PH, Koester MA, Jayashankar K, Lunsford KE, Dziema HL, Bumgardner GL. Disparate Primary and Secondary Allospecific CD8+ T Cell Cytolytic Effector Function in the Presence or Absence of Host CD4+ T Cells. *The Journal of Immunology* [Internet].

- 2007 Jul 1 [cited 2025 May 13];179(1):80–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17579024/>
84. Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK, et al. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*. 1999 Mar 15;162(6):3256–62.
85. Schmidt CS, Mescher MF. Adjuvant effect of IL-12: conversion of peptide antigen administration from tolerizing to immunizing for CD8+ T cells in vivo. *J Immunol*. 1999 Sep 1;163(5):2561–7.
86. Curtsinger JM, Valenzuela JO, Agarwal P, Lins D, Mescher MF. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol*. 2005 Apr 15;174(8):4465–9.
87. Oberbarnscheidt MH, Obhrai JS, Williams AL, Rothstein DM, Shlomchik WD, Chalasani G, et al. Type I interferons are not critical for skin allograft rejection or the generation of donor-specific CD8+ memory T cells: Brief communication. *American Journal of Transplantation* [Internet]. 2010 Jan [cited 2025 May 13];10(1):162–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19951284/>
88. Goldstein DR, Tesar BM, Akira S, Lakkis FG. Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection. *J Clin Invest* [Internet]. 2003 May 15 [cited 2025 May 13];111(10):1571–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12750407/>
89. Tesar BM, Zhang J, Li Q, Goldstein DR. TH1 immune responses to fully MHC mismatched allografts are diminished in the absence of MyD88, a toll-like receptor signal adaptor protein. *American Journal of Transplantation* [Internet]. 2004 Sep [cited 2025 May 13];4(9):1429–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15307830/>
90. Hodes RJ. T helper cell-b cell interaction: the roles of direct Th-B cell contact and cell-free mediators. *Semin Immunol*. 1989 Sep;1(1):33–42.
91. Kim TJ. The Role of B Cells in Transplantation Rejection. *The Journal of the Korean Society for Transplantation* [Internet]. 2018 Mar 31 [cited 2025 May 13];32(1):1–6. Available from: <https://www.ctrjournal.org/journal/view.html?doi=10.4285/jkstn.2018.32.1.1>
92. Smith RN, Colvin RB. Chronic alloantibody mediated rejection. *Semin Immunol* [Internet]. 2012 Apr 1 [cited 2025 May 13];24(2):115–21. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532311001151#bib0275>
93. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. Mackay IR, Rosen FS, editors. *N Engl J Med* [Internet]. 2000 Jul 6 [cited 2025 May 14];343(1):37–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10882768/>
94. Gavanescu I, Kessler B, Ploegh H, Benoist C, Mathis D. Loss of Aire-dependent thymic expression of a peripheral tissue antigen renders it a target of autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 Mar 13 [cited 2025 May 14];104(11):4583–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17360567/>
95. Michelson DA, Hase K, Kaisho T, Benoist C, Mathis D. Thymic epithelial cells co-opt lineage-defining transcription factors to eliminate autoreactive T cells. *Cell* [Internet].

- 2022 Jul 7 [cited 2025 Jun 24];185(14):2542-2558.e18. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867422006493?via%3Dhub>
96. Meloni A, Willcox N, Meager A, Atzeni M, Wolff ASB, Husebye ES, et al. Autoimmune polyendocrine syndrome type 1: An extensive longitudinal study in Sardinian patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* [Internet]. 2012 Apr [cited 2025 Apr 29];97(4):1114–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22344197/>
97. Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P. Impact of Negative Selection on the T Cell Repertoire Reactive to a Self-Peptide: A Large Fraction of T Cell Clones Escapes Clonal Deletion. *Immunity* [Internet]. 2000 Dec 1 [cited 2025 Jun 24];13(6):829–40. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761300000807>
98. Robinson KA, Orent W, Madsen JC, Benichou G. Maintaining T cell tolerance of alloantigens: Lessons from animal studies. *Am J Transplant*. 2018 Aug;18(8):1843–56.
99. Kenison JE, Stevens NA, Quintana FJ. Therapeutic induction of antigen-specific immune tolerance. *Nature Reviews Immunology* 2023 24:5 [Internet]. 2023 Dec 12 [cited 2025 May 14];24(5):338–57. Available from: <https://www-nature-com.proxy.timbo.org.uy/articles/s41577-023-00970-x>
100. Schwartz RH. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med* [Internet]. 1996 [cited 2023 Apr 3];184(1):1–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8691122/>
101. Li L, Boussiotis VA. Physiologic regulation of central and peripheral T cell tolerance: lessons for therapeutic applications. *J Mol Med (Berl)* [Internet]. 2006 Nov [cited 2023 Apr 3];84(11):887–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16972086/>
102. Dallman MJ, Shiho O, Page TH, Wood KJ, Morris PJ. Peripheral tolerance to alloantigen results from altered regulation of the interleukin 2 pathway. *J Exp Med* [Internet]. 1991 [cited 2023 Apr 3];173(1):79–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1985127/>
103. Jones LA, Chin LT, Merriam GR, Nelson LM, Kruisbeck AM. Failure of clonal deletion in neonatally thymectomized mice: tolerance is preserved through clonal anergy. *J Exp Med* [Internet]. 1990 Nov 1 [cited 2023 Apr 3];172(5):1277–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2230642/>
104. Priyadarshini B, Greiner DL, Brehm MA. T-cell activation and transplantation tolerance. *Transplant Rev*. 2012;26(3):212–22.
105. Kang SM, Beverly B, Tran AC, Brorson K, Schwartz RH, Lenardot MJ. Transactivation by AP-1 Is a Molecular Target of T Cell Clonal Anergy. *Science* (1979) [Internet]. 1992 Aug 21 [cited 2025 May 14];257(5073):1134–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1509265/>
106. Markees TG, Phillips NE, Gordon EJ, Noelle RJ, Shultz LD, Mordes JP, et al. Long-term survival of skin allografts induced by donor splenocytes and anti-CD154 antibody in thymectomized mice requires CD4(+) T cells, interferon-gamma, and CTLA4. *J Clin Invest* [Internet]. 1998 Jun 1 [cited 2023 Apr 3];101(11):2446–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9616216/>

107. Markees TG, Phillips NE, Noelle RJ, Shultz LD, Mordes JP, Greiner DL, et al. Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand. *Transplantation* [Internet]. 1997 Jul 27 [cited 2023 Apr 3];64(2):329–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9256196/>
108. Hancock WW, Sayegh MH, Zheng XG, Peach R, Linsley PS, Turka LA. Costimulatory function and expression of CD40 ligand, CD80, and CD86 in vascularized murine cardiac allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1996 Nov 26 [cited 2023 Apr 3];93(24):13967–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8943044/>
109. Baliga P, Chavin KD, Qin L, Woodward J, Lin J, Linsley PS, et al. CTLA4Ig prolongs allograft survival while suppressing cell-mediated immunity. *Transplantation*. 1994 Nov 27;58(10):1082–90.
110. Vincenti F, Charpentier B, Vanrenterghem Y, Rostaing L, Bresnahan B, Darji P, et al. A Phase III Study of Belatacept-based Immunosuppression Regimens versus Cyclosporine in Renal Transplant Recipients (BENEFIT Study). *American Journal of Transplantation* [Internet]. 2010 Mar 1 [cited 2025 May 1];10(3):535–46. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1600613522196115?via%3Dihub>
111. Vincenti F, Rostaing L, Grinyo J, Rice K, Steinberg S, Gaite L, et al. Belatacept and Long-Term Outcomes in Kidney Transplantation. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2016 Jan 28 [cited 2025 May 1];374(4):333–43. Available from: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa1506027>
112. Larsen CP, Pearson TC, Adams AB, Tso P, Shirasugi N, Strobert E, et al. Rational Development of LEA29Y (belatacept), a High-Affinity Variant of CTLA4-Ig with Potent Immunosuppressive Properties. *American Journal of Transplantation* [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2025 May 1];5(3):443–53. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1600613522036127?via%3Dihub>
113. Kitchens WH, Larsen CP, Badell IR. Costimulatory Blockade and Solid Organ Transplantation: The Past, Present, and Future. *Kidney Int Rep* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2025 May 1];8(12):2529–45. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468024923014742>
114. Iwakoshi NN, Markees TG, Turgeon N, Thornley T, Cuthbert A, Leif J, et al. Skin allograft maintenance in a new synchimeric model system of tolerance. *J Immunol* [Internet]. 2001 Dec 1 [cited 2023 Apr 3];167(11):6623–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11714833/>
115. Wells AD, Li XC, Li Y, Walsh MC, Zheng XX, Wu Z, et al. Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nat Med* [Internet]. 1999 Nov [cited 2023 Apr 3];5(11):1303–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10545998/>
116. Algeciras-Schimnich A, Griffith TS, Lynch DH, Paya C V. Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J Immunol*. 1999 May 1;162(9):5205–11.
117. Refaeli Y, Van Parijs L, London CA, Tschopp J, Abbas AK. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* [Internet]. 1998 [cited 2023 Apr 3];8(5):615–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9620682/>

118. Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2007 Jul [cited 2023 Apr 3];7(7):532–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17589543/>
119. Van Parijs L, Biuckians A, Abbas AK. Functional roles of Fas and Bcl-2-regulated apoptosis of T lymphocytes. *J Immunol*. 1998 Mar 1;160(5):2065–71.
120. Ju S Te, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, Ei-Khatib M, Sherr DH, et al. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* [Internet]. 1995 Feb 2 [cited 2023 Apr 3];373(6513):444–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7530337/>
121. Bouillet P, O'Reilly LA. CD95, BIM and T cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009 Jul [cited 2023 Apr 3];9(7):514–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19543226/>
122. Kurtz J, Lie A, Griffith M, Eysaman S, Shaffer J, Anosova N, et al. Lack of role for CsA-sensitive or Fas pathways in the tolerization of CD4 T cells via BMT and anti-CD40L. *Am J Transplant* [Internet]. 2003 Jul [cited 2023 Apr 3];3(7):804–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12814472/>
123. Lu J, Li P, Du X, Liu Y, Zhang B, Qi F. Regulatory T cells induce transplant immune tolerance. *Transpl Immunol*. 2021 Aug 1;67.
124. Barnes MJ, Powrie F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity* [Internet]. 2009 Sep 18 [cited 2023 Apr 3];31(3):401–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19766083/>
125. Mayne CG, Williams CB. Induced and natural regulatory T cells in the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2013 Jul [cited 2023 Apr 3];19(8):1772–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23656897/>
126. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995 Aug 1;155(3):1151–64.
127. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* [Internet]. 2010 Jan [cited 2023 Apr 3];11(1):7–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20016504/>
128. Banuelos SJ, Markees TG, Phillips NE, Appel MC, Cuthbert A, Leif J, et al. Regulation of skin and islet allograft survival in mice treated with costimulation blockade is mediated by different CD4+ cell subsets and different mechanisms. *Transplantation* [Internet]. 2004 Sep 15 [cited 2023 Apr 3];78(5):660–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15371665/>
129. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2003 Mar;3(3):199–210.
130. Safinia N, Leech J, Hernandez-Fuentes M, Lechler R, Lombardi G. Promoting transplantation tolerance; adoptive regulatory T cell therapy. *Clin Exp Immunol*. 2013 May;172(2):158–68.

131. Viel S, Marçais A, Guimaraes FSF, Loftus R, Rabilloud J, Grau M, et al. TGF- β inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Sci Signal* [Internet]. 2016 Feb 16 [cited 2023 Apr 3];9(415). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26884601/>
132. Travis MA, Sheppard D. TGF- β activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2014 [cited 2023 Apr 3];32:51–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24313777/>
133. Lenicov FR, Paletta AL, Prinz MG, Varese A, Pavillet CE, Malizia ÁL, et al. Prostaglandin E2 Antagonizes TGF- β Actions During the Differentiation of Monocytes Into Dendritic Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Jun 22 [cited 2023 Apr 3];9(JUN). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29988364/>
134. Yu X, Buttgeret A, Lelios I, Utz SG, Cansever D, Becher B, et al. The Cytokine TGF- β Promotes the Development and Homeostasis of Alveolar Macrophages. *Immunity* [Internet]. 2017 Nov 21 [cited 2023 Apr 3];47(5):903-912.e4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29126797/>
135. Li Q, Anderson CD, Egilmez NK. Inhaled IL-10 Suppresses Lung Tumorigenesis via Abrogation of Inflammatory Macrophage-Th17 Cell Axis. *J Immunol* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2023 Apr 3];201(9):2842–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30257887/>
136. Schülke S. Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells As a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Mar 19 [cited 2023 Apr 3];9(MAR). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29616018/>
137. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Dec;4(12):1206–12.
138. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* [Internet]. 2010 Jul [cited 2023 Apr 3];236(1):219–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20636820/>
139. Li P, Liu C, Yu Z, Wu M. New Insights into Regulatory T Cells: Exosome- and Non-Coding RNA-Mediated Regulation of Homeostasis and Resident Treg Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2016 [cited 2023 Apr 3];7(DEC). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27999575/>
140. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2012 Apr [cited 2023 Apr 12];30:531–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22224781/>
141. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* [Internet]. 2007 Oct 26 [cited 2023 Apr 12];27(4):635–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17919943/>
142. Borsig G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* [Internet]. 2007 Aug 15 [cited 2023 Apr 12];110(4):1225–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17449799/>

143. Halloran PF. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation [Internet]. 2004. Available from: www.nejm.org
144. ELION GB. The George Hitchings and Gertrude Elion Lecture. The pharmacology of azathioprine. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1993 [cited 2023 Apr 11];685(1):401–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8363248/>
145. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* [Internet]. 1992 [cited 2023 Apr 11];357(6380):695–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1377362/>
146. Clase CM, Mahalati K, Kiberd BA, Lawen JG, West KA, Fraser AD, et al. Adequate early cyclosporin exposure is critical to prevent renal allograft rejection: patients monitored by absorption profiling. *Am J Transplant* [Internet]. 2002 Sep [cited 2023 Apr 11];2(8):789–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12243501/>
147. A comparison of tacrolimus (FK 506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. *N Engl J Med* [Internet]. 1994 Oct 27 [cited 2023 Apr 11];331(17):1110–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7523946/>
148. European FK506 Multicentre Liver Study Group. Randomised trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporin in prevention of liver allograft rejection. *The Lancet*. 1994 Aug 13;344(8920):423–8.
149. Gblett ER, Anderson JE, Cohen F, Pollara B, Meuwissen HJ. Adenosine-deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *Lancet* [Internet]. 1972 Nov 18 [cited 2023 Apr 11];2(7786):1067–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4117384/>
150. Allison AC, Watts RWE, Hovi T, Webster ADB. Immunological observations on patients with Lesch-Nyhan syndrome, and on the role of de-novo purine synthesis in lymphocyte transformation. *Lancet* [Internet]. 1975 Dec 13 [cited 2023 Apr 11];2(7946):1179–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/53661/>
151. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. *The Lancet*. 1995 May 27;345(8961):1321–5.
152. Meier-Kriesche HU, Steffen BJ, Hochberg AM, Gordon RD, Liebman MN, Morris JA, et al. Long-term use of mycophenolate mofetil is associated with a reduction in the incidence and risk of late rejection. *Am J Transplant* [Internet]. 2003 Jan [cited 2023 Apr 11];3(1):68–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12492713/>
153. Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009 May [cited 2023 Apr 11];9(5):324–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19390566/>
154. Weichhart T, Säemann MD. The multiple facets of mTOR in immunity. *Trends Immunol* [Internet]. 2009 May [cited 2023 Jun 28];30(5):218–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19362054/>
155. Vézina C, Kudelski A. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*

- [Internet]. 1975 [cited 2023 Apr 12];28(10):721–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1102508/>
156. Kirk AD, Hale DA, Mannon RB, Kleiner DE, Hoffmann SC, Kampen RL, et al. Results from a human renal allograft tolerance trial evaluating the humanized CD52-specific monoclonal antibody alemtuzumab (CAMPATH-1H). *Transplantation* [Internet]. 2003 Jul 15 [cited 2023 Apr 12];76(1):120–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12865797/>
157. Becker YT, Becker BN, Pirsch JD, Sollinger HW. Rituximab as treatment for refractory kidney transplant rejection. *Am J Transplant* [Internet]. 2004 Jun [cited 2023 Apr 12];4(6):996–1001. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15147435/>
158. Chatenoud L, Bluestone JA. CD3-specific antibodies: A portal to the treatment of autoimmunity. Vol. 7, *Nature Reviews Immunology*. 2007. p. 622–32.
159. Penaranda C, Tang Q, Bluestone JA. Anti-CD3 Therapy Promotes Tolerance by Selectively Depleting Pathogenic Cells while Preserving Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*. 2011 Aug 15;187(4):2015–22.
160. Hirsch R, Bluestone JA, DeNenno L, Gress RE. Anti-CD3 F(ab')2 fragments are immunosuppressive in vivo without evoking either the strong humoral response or morbidity associated with whole mAb. *Transplantation* [Internet]. 1990 Jun;49(6):1117–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2141740>
161. Perruche S, Zhang P, Liu Y, Saas P, Bluestone JA, Chen WJ. CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor- β from phagocytes digesting apoptotic T cells. *Nat Med*. 2008 May;14(5):528–35.
162. Alegre ML, Tso JY, Sattar HA, Smith J, Desalle F, Cole M, et al. An anti-murine CD3 monoclonal antibody with a low affinity for Fc gamma receptors suppresses transplantation responses while minimizing acute toxicity and immunogenicity. *J Immunol*. 1995 Aug 1;155(3):1544–55.
163. A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. *N Engl J Med* [Internet]. 1985 Aug 8 [cited 2023 Apr 12];313(6):337–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2861567/>
164. Kung PC, Goldstein G, Reinherz EL, Schlossman SF. Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science* [Internet]. 1979 [cited 2023 Apr 12];206(4416):347–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/314668/>
165. Abramowicz D, Schandene L, Goldman M, Crusiaux A, Vereerstraeten P, de Pauw L, et al. Release of tumor necrosis factor, interleukin-2, and gamma-interferon in serum after injection of OKT3 monoclonal antibody in kidney transplant recipients. *Transplantation* [Internet]. 1989 [cited 2023 Apr 12];47(4):606–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2523100/>
166. Li C, Cai F, Ai R, Chen L, Yang G, He K, et al. Systemic reaction to the anti-T-cell monoclonal antibody OKT3 in relation to serum levels of tumor necrosis factor and interferon-gamma [corrected]. *N Engl J Med* [Internet]. 1989 May 25 [cited 2023 Apr 12];320(21):1420–1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2785642/>

167. Chatenoud L, Baudrihaye MF, Chkoff N, Kreis H, Goldstein G, Bach JF. Restriction of the human in vivo immune response against the mouse monoclonal antibody OKT3. *J Immunol*. 1986 Aug 1;137(3):830–8.
168. Lobo PI, Patel HC. Murine monoclonal IgG antibodies: differences in their IgG isotypes can affect the antibody effector activity when using human cells. *Immunol Cell Biol [Internet]*. 1997 [cited 2023 Apr 12];75(3):267–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9243292/>
169. Hooks MA, Wade CS, Millikan WJ. Muromonab CD-3: A Review of Its Pharmacology, Pharmacokinetics, and Clinical Use in Transplantation. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy [Internet]*. 1991 Jan 2 [cited 2023 Apr 12];11(1):26–37. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/j.1875-9114.1991.tb03595.x>
170. Bolt S, Routledge E, Lloyd I, Chatenoud L, Pope H, Gorman SD, et al. The generation of a humanized, non-mitogenic CD3 monoclonal antibody which retains in vitro immunosuppressive properties. *Eur J Immunol*. 1993 Feb;23(2):403–11.
171. Alegre ML, Peterson LJ, Xu D, Sattar HA, Jeyarajah DR, Kowalkowski K, et al. A non-activating “humanized” anti-CD3 monoclonal antibody retains immunosuppressive properties in vivo. *Transplantation*. 1994 Jun 15;57(11):1537–43.
172. Cole MS, Stellrecht KE, Shi JD, Homola M, Hsu DH, Anasetti C, et al. HuM291, a humanized anti-CD3 antibody, is immunosuppressive to T cells while exhibiting reduced mitogenicity in vitro. *Transplantation*. 1999 Aug 27;68(4):563–71.
173. Dean Y, Dépis F, Kosco-Vilbois M. Combination therapies in the context of anti-CD3 antibodies for the treatment of autoimmune diseases. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:w13711.
174. You S, Candon S, Kuhn C, Bach JF, Chatenoud L. Chapter 2 CD3 Antibodies as Unique Tools to Restore Self-Tolerance in Established Autoimmunity: Their Mode of Action and Clinical Application in Type 1 Diabetes. *Adv Immunol*. 2008 Jan 1;100:13–37.
175. Chatenoud L, Baudrihaye MF, Kreis H, Goldstein G, Schindler J, Bach J -F. Human in vivo antigenic modulation induced by the anti-T cell OKT3 monoclonal antibody. *Eur J Immunol [Internet]*. 1982 [cited 2023 Apr 12];12(11):979–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6759145/>
176. Smith JA, Tso JY, Clark MR, Cole MS, Bluestone JA. Nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibodies deliver a partial T cell receptor signal and induce clonal anergy. *J Exp Med [Internet]*. 1997 Apr 21 [cited 2023 Apr 12];185(8):1413–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9126922/>
177. Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, et al. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med [Internet]*. 1986 May 1 [cited 2023 Apr 12];163(5):1037–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2871125/>

178. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2003 [cited 2023 Apr 12];21:685–711. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12615891/>
179. Van Der Woude CJ, Stokkers P, Van Bodegraven AA, Van Assche G, Hebzda Z, Paradowski L, et al. Phase I, double-blind, randomized, placebo-controlled, dose-escalation study of NI-0401 (a fully human anti-CD3 monoclonal antibody) in patients with moderate to severe active Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2010 Oct [cited 2023 Apr 12];16(10):1708–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20848453/>
180. Herold KC, Gitelman SE, Masharani U, Hagopian W, Bisikirska B, Donaldson D, et al. A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3gamma1(Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes. *Diabetes* [Internet]. 2005 Jun [cited 2023 Apr 12];54(6):1763–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15919798/>
181. Herold KC, Hagopian W, Auger JA, Poumian-Ruiz E, Taylor L, Donaldson D, et al. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* [Internet]. 2002 May 30 [cited 2023 Apr 12];346(22):1692–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12037148/>
182. Friend PJ, Hale G, Chatenoud L, Rebello P, Bradley J, Thiru S, et al. Phase I study of an engineered aglycosylated humanized CD3 antibody in renal transplant rejection. *Transplantation* [Internet]. 1999 Dec 15 [cited 2023 Apr 12];68(11):1632–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10609938/>
183. Herold KC, Bundy BN, Long SA, Bluestone JA, DiMeglio LA, Dufort MJ, et al. An Anti-CD3 Antibody, Teplizumab, in Relatives at Risk for Type 1 Diabetes. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2019 Aug 15 [cited 2025 May 21];381(7):603–13. Available from: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa1902226>
184. Segovia M, Russo S, Jeldres M, Mahmoud YD, Perez V, Duhalde M, et al. Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing Inflammasome Activation. *Cancer Cell*. 2019 May 13;35(5):767–781.e6.
185. Segovia M, Louvet C, Charnet P, Savina A, Tilly G, Gautreau L, et al. Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation. *American Journal of Transplantation*. 2014;14(5):1021–31.
186. Vega MD, Olivera D, Davanzo GG, Bertullo M, Noya V, de Souza GF, et al. PD-1/PD-L1 blockade abrogates a dysfunctional innate-adaptive immune axis in critical β -coronavirus disease. *Sci Adv* [Internet]. 2022 Sep 23 [cited 2023 Feb 21];8(38). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36129987/>
187. Hill M, Russo S, Olivera D, Malcuori M, Galliussi G, Segovia M. The intracellular cation channel TMEM176B as a dual immunoregulator. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2022 Oct 20 [cited 2023 Apr 13];10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36340035/>
188. Louvet C, Chiffolleau E, Heslan M, Tesson L, Heslan JM, Brion R, et al. Identification of a new member of the CD20/FcepsilonRIbeta family overexpressed in tolerated allografts.

- Am J Transplant [Internet]. 2005 Sep [cited 2024 Apr 22];5(9):2143–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16095493/>
189. Kuek LE, Leffler M, Mackay GA, Hulett MD. The MS4A family: counting past 1, 2 and 3. Immunol Cell Biol [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2023 Apr 13];94(1):11–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25835430/>
190. Condamine T, Le Texier L, Howie D, Lavault A, Hill M, Halary F, et al. Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells. J Leukoc Biol [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2023 Apr 13];88(3):507–15. Available from: <https://academic.oup.com/jleukbio/article/88/3/507/6959765>
191. Drujont L, Lemoine A, Moreau A, Bienvenu G, Lancien M, Cens T, et al. ROR γ t+ cells selectively express redundant cation channels linked to the Golgi apparatus. Sci Rep [Internet]. 2016 Mar 24 [cited 2023 Apr 13];6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27009467/>
192. Picotto G, Morse LR, Nguyen N, Saltzman J, Battaglino R. TMEM176A and TMEM176B Are Candidate Regulators of Inhibition of Dendritic Cell Maturation and Function after Chronic Spinal Cord Injury. J Neurotrauma [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2024 Aug 19];37(3):528. Available from: [/pmc/articles/PMC6978786/](https://pmc/articles/PMC6978786/)
193. Crozat K, Tamoutounour S, Vu Manh TP, Fossum E, Luche H, Arduouin L, et al. Cutting edge: expression of XCR1 defines mouse lymphoid-tissue resident and migratory dendritic cells of the CD8 α + type. J Immunol [Internet]. 2011 Nov 1 [cited 2024 Aug 21];187(9):4411–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21948982/>
194. Binnewies M, Mujal AM, Pollack JL, Combes AJ, Hardison EA, Barry KC, et al. Unleashing Type-2 Dendritic Cells to Drive Protective Antitumor CD4+ T Cell Immunity. Cell [Internet]. 2019 Apr 18 [cited 2025 Mar 18];177(3):556–571.e16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30955881/>
195. Anandasabapathy N, Feder R, Mollah S, Tse SW, Longhi MP, Mehandru S, et al. Classical Flt3L-dependent dendritic cells control immunity to protein vaccine. J Exp Med [Internet]. 2014 [cited 2025 Mar 18];211(9):1875–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25135299/>
196. Lancien M, Bienvenu G, Salle S, Gueno L, Feyeux M, Merieau E, et al. Dendritic Cells Require TMEM176A/B Ion Channels for Optimal MHC Class II Antigen Presentation to Naive CD4+ T Cells. J Immunol [Internet]. 2021 Jul 15 [cited 2024 Nov 24];207(2):421–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34233909/>
197. Amigorena S, Savina A. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. Curr Opin Immunol [Internet]. 2010 Feb [cited 2025 Mar 24];22(1):109–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20171863/>
198. Savina A, Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. Immunol Rev [Internet]. 2007 Oct [cited 2025 Mar 24];219(1):143–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17850487/>
199. Savina A, Peres A, Cebrian I, Carmo N, Moita C, Hacohen N, et al. The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalinization and antigen crosspresentation selectively in CD8(+)

- dendritic cells. *Immunity* [Internet]. 2009 Apr 17 [cited 2025 Mar 24];30(4):544–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19328020/>
200. Mantegazza AR, Savina A, Vermeulen M, Pérez L, Geffner J, Hermine O, et al. NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. *Blood* [Internet]. 2008 Dec 1 [cited 2025 Mar 24];112(12):4712–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18682599/>
201. Jancic C, Savina A, Wasmeier C, Tolmachova T, El-Benna J, Dang PMC, et al. Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2007 Apr [cited 2025 Mar 24];9(4):367–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17351642/>
202. Savina A, Jancic C, Hugues S, Guermonprez P, Vargas P, Moura IC, et al. NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* [Internet]. 2006 Jul 14 [cited 2025 Mar 24];126(1):205–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16839887/>
203. Albert ML, Jegathesan M, Darnell RB. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nat Immunol* [Internet]. 2001 [cited 2025 Mar 20];2(11):1010–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11590405/>
204. Li XL, Ménoret S, Bezie S, Caron L, Chabannes D, Hill M, et al. Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J Immunol* [Internet]. 2010 Jul 15 [cited 2025 Mar 20];185(2):823–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20543104/>
205. Seo SK, Choi JH, Kim YH, Kang WJ, Park HY, Suh JH, et al. 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nat Med* [Internet]. 2004 Oct [cited 2025 Mar 20];10(10):1088–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15448685/>
206. Lee SJ, Channappanavar R, Kanneganti TD. Coronaviruses: Innate Immunity, Inflammasome Activation, Inflammatory Cell Death, and Cytokines. *Trends Immunol* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2025 Mar 24];41(12):1083–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33153908/>
207. Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell* [Internet]. 2020 Nov 12 [cited 2025 Mar 24];183(4):996–1012.e19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33010815/>
208. Mathew D, Giles JR, Baxter AE, Oldridge DA, Greenplate AR, Wu JE, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science* [Internet]. 2020 Sep 4 [cited 2025 Mar 24];369(6508). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32669297/>
209. Rodrigues TS, de Sá KSG, Ishimoto AY, Becerra A, Oliveira S, Almeida L, et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J Exp Med* [Internet]. 2021 [cited 2025 Mar 24];218(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33231615/>
210. Zheng M, Karki R, Williams EP, Yang D, Fitzpatrick E, Vogel P, et al. TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nat Immunol*

- [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2025 Mar 24];22(7):829–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33963333/>
211. Hill M, Segovia M, Russo S, Girotti MR, Rabinovich GA. The Paradoxical Roles of Inflammation during PD-1 Blockade in Cancer. *Trends Immunol* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2025 Mar 24];41(11):982–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33036910/>
212. Nickles D, Chen HP, Li MM, Khankhanian P, Madireddy L, Caillier SJ, et al. Blood RNA profiling in a large cohort of multiple sclerosis patients and healthy controls. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2013 Oct [cited 2023 Apr 13];22(20):4194–205. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23748426/>
213. Wysocki T, Paradowska-Gorycka A. Pharmacogenomics of Anti-TNF Treatment Response Marks a New Era of Tailored Rheumatoid Arthritis Therapy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2023 Apr 13];23(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35216481/>
214. Gong T, Yang Y, Jin T, Jiang W, Zhou R. Orchestration of NLRP3 Inflammasome Activation by Ion Fluxes. *Trends Immunol* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2023 Apr 13];39(5):393–406. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29452983/>
215. Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor a, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* [Internet]. 2007 Sep [cited 2014 Nov 24];14(9):1583–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17599094>
216. Murakami T, Ockinger J, Yu J, Byles V, McColl A, Hofer AM, et al. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012 Jul 10 [cited 2023 Apr 17];109(28):11282–7. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1117765109>
217. Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez G. K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* [Internet]. 2013 Jun 27 [cited 2014 Nov 20];38(6):1142–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/article/fcgi?artid=3730833&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
218. Hamilton SL, Yatani A, Brush K, Schwartz A, Brown AM. A comparison between the binding and electrophysiological effects of dihydropyridines on cardiac membranes. *Mol Pharmacol* [Internet]. 1987 Mar 1 [cited 2025 Mar 24];31(3):221–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026895X25104252>
219. Beckel JM, de Groat WC. The effect of the electrophilic fatty acid nitro-oleic acid on TRP channel function in sensory neurons. *Nitric Oxide* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2023 Jan 31];78:154–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29578059/>
220. Schopfer FJ, Vitturi DA, Jorkasky DK, Freeman BA. Nitro-fatty acids: New drug candidates for chronic inflammatory and fibrotic diseases. *Nitric Oxide*. 2018 Sep 1;79:31–7.

221. Khoo NKH, Freeman B a. Electrophilic nitro-fatty acids: anti-inflammatory mediators in the vascular compartment. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2010 Apr [cited 2015 Feb 3];10(2):179–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2843800/>&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
222. Delmastro-Greenwood M, Freeman BA, Wendell SG. Redox-dependent anti-inflammatory signaling actions of unsaturated fatty acids. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2014;76:79–105. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC24161076/>
223. Sculptoreanu A, Kullmann FA, Artim DE, Bazley FA, Schopfer F, Woodcock S, et al. Nitro-oleic acid inhibits firing and activates TRPV1- and TRPA1-mediated inward currents in dorsal root ganglion neurons from adult male rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [Internet]. 2010 Jun [cited 2025 Jun 24];333(3):883–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20304940/>
224. Taylor-Clark TE, Ghatta S, Bettner W, Undem BJ. Nitrooleic acid, an endogenous product of nitritative stress, activates nociceptive sensory nerves via the direct activation of TRPA1. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2009 [cited 2025 Jun 24];75(4):820–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19171673/>
225. Artim DE, Bazely F, Daugherty SL, Sculptoreanu A, Koronowski KB, Schopfer FJ, et al. Nitro-oleic acid targets transient receptor potential (TRP) channels in capsaicin sensitive afferent nerves of rat urinary bladder. *Exp Neurol* [Internet]. 2011 [cited 2025 Jun 24];232(1):90–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21867704/>
226. Batthyany C, Schopfer FJ, Baker PRS, Durán R, Baker LMS, Huang Y, et al. Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Jul 21;281(29):20450–63.
227. Mather BD, Viswanathan K, Miller KM, Long TE. Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies. *Prog Polym Sci* [Internet]. 2006 May [cited 2014 Dec 10];31(5):487–531. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670006000335>
228. Freeman B a, Baker PRS, Schopfer FJ, Woodcock SR, Napolitano A, d'Ischia M. Nitro-fatty acid formation and signaling. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 Jun 6 [cited 2014 Dec 16];283(23):15515–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2414282/>&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
229. Fazzari M, Woodcock SR, Rowart P, Ricart K, Lancaster JR, Patel R, et al. Endogenous generation of nitro-fatty acid hybrids having dual nitrate ester (RONO₂) and nitroalkene (RNO₂) substituents. *Redox Biol* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2024 Aug 8];41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33819836/>
230. Villacorta L, Chang L, Salvatore SR, Ichikawa T, Zhang J, Petrovic-Djergovic D, et al. Electrophilic nitro-fatty acids inhibit vascular inflammation by disrupting LPS-dependent TLR4 signalling in lipid rafts. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2014 Oct 12];98(1):116–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3598418/>&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

231. He Y, Varadarajan S, Muñoz-Planillo R, Burberry A, Nakamura Y, Núñez G. 3,4-methylenedioxy- β -nitrostyrene inhibits NLRP3 inflammasome activation by blocking assembly of the inflammasome. *J Biol Chem* [Internet]. 2014 Jan 10 [cited 2015 Jan 29];289(2):1142–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3887181/>
232. Dapueto R, Rodriguez-Duarte J, Galliussi G, Kamaid A, Bresque M, Batthyány C, et al. A novel nitroalkene vitamin E analogue inhibits the NLRP3 inflammasome and protects against inflammation and glucose intolerance triggered by obesity. *Redox Biol*. 2021 Feb 1;39:101833.
233. Kansanen E, Bonacci G, Schopfer FJ, Kuosmanen SM, Tong KI, Leinonen H, et al. Electrophilic nitro-fatty acids activate NRF2 by a KEAP1 cysteine 151-independent mechanism. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 Apr 22 [cited 2015 Feb 3];286(16):14019–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3077602/>
234. Waku T, Shiraki T, Oyama T, Fujimoto Y, Maebara K, Kamiya N, et al. Structural insight into PPARgamma activation through covalent modification with endogenous fatty acids. *J Mol Biol* [Internet]. 2009 Jan 9 [cited 2015 Feb 9];385(1):188–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1897723/>
235. Kansanen E, Jyrkkänen HK, Volger OL, Leinonen H, Kivelä AM, Häkkinen SK, 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* [Internet]. 2009 Nov 27 [cited 2014 Dec 16];284(48):33233–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2785166/>
236. Wright MM, Kim J, Hock TD, Leitinger N, Freeman BA, Agarwal A. Human haem oxygenase-1 induction by nitro-linoleic acid is mediated by cAMP, AP-1 and E-box response element interactions. *Biochemical Journal*. 2009 Sep 1;422(2):353–61.
237. Wright MM, Schopfer FJ, Baker PRS, Vidyasagar V, Powell P, Chumley P, et al. Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: Nitrolinoleic acid potently activates endothelial heme oxygenase 1 expression [Internet]. 2006. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0506541103
238. Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme Oxygenase-1. Vol. 50, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2010. p. 323–54.
239. Braudeau C, Bouchet D, Tesson L, Iyer S, Rémy S, Buelow R, et al. Induction of long-term cardiac allograft survival by heme oxygenase-1 gene transfer. *Gene Ther*. 2004 Apr;11(8):701–10.
240. Chauveau C, Bouchet D, Roussel JC, Mathieu P, cile Braudeau C, Renaudin Laurent Tesson K, et al. Gene Transfer of Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide Delivery Inhibit Chronic Rejection. Vol. 2, *American Journal of Transplantation*. 2002.

241. Rudolph V, Schopfer FJ, Khoo NKH, Rudolph TK, Cole MP, Woodcock SR, et al. Nitro-fatty acid metabolome: saturation, desaturation, beta-oxidation, and protein adduction. *J Biol Chem* [Internet]. 2009 Jan 16 [cited 2014 Dec 16];284(3):1461–73. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2615530&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
242. Batthyány Dighiero Cl, López Gonzalez GV. WO2015073527A1 - Nitroalkene tocopherols and analogs thereof for use in the treatment and prevention of inflammation related conditions - Google Patents [Internet]. 2015 [cited 2023 Apr 12]. Available from: <https://patents.google.com/patent/WO2015073527A1/ru>
243. Lemaire-Ewing S, Desrumaux C, Néel D, Lagrost L. Vitamin E transport, membrane incorporation and cell metabolism: Is alpha-tocopherol in lipid rafts an oar in the lifeboat? *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2010 May [cited 2023 Apr 12];54(5):631–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20166147/>
244. Rodriguez-Duarte J, Galliussi G, Dapueto R, Rossello J, Malacrida L, Kamaid A, et al. A novel nitroalkene- α -tocopherol analogue inhibits inflammation and ameliorates atherosclerosis in Apo E knockout mice. *Br J Pharmacol*. 2019;
245. Batthyany C, Lopez GV, Escande C, Rodriguez J, Porcal W, Dapueto R, et al. Methods of treatment of inflammation related conditions using pluripotent anti-inflammatory and metabolic modulators. U.S. PCT patent; WO 2018/069907 A1. 2018.
246. Fuster V, Sweeny JM. Aspirin: a historical and contemporary therapeutic overview. *Circulation* [Internet]. 2011 Feb 22 [cited 2023 Jan 30];123(7):768–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21343593/>
247. Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *American Journal of Medicine*. 1998 Mar 30;104(3 A).
248. Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* [Internet]. 1994 Aug 12;265(5174):956–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8052854>
249. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β . *Nature* [Internet]. 1998 Nov;396(6706):77–80. Available from: <https://www.nature.com/articles/23948>
250. Hawley SA, Fullerton MD, Ross FA, Schertzer JD, Chevtzoff C, Walker KJ, et al. The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase. *Science* (1979). 2012 May 18;336(6083):918–22.
251. Choi HE, Jeon EJ, Kim DY, Choi MJ, Yu H, Kim J II, et al. Sodium salicylate induces browning of white adipocytes via M2 macrophage polarization by HO-1 upregulation. *Eur J Pharmacol*. 2022 Aug 5;928.
252. Fleischman A, Shoelson SE, Bernier R, Goldfine AB. Salsalate improves glycemia and inflammatory parameters in obese young adults. *Diabetes Care* [Internet]. 2008 Mar [cited 2017 Jan 30];31(2):289–94. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3226794&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

253. Goldfine AB, Fonseca V, Jablonski KA, Pyle L, Staten MA, Shoelson SE. The Effects of Salsalate on Glycemic Control in Patients With Type 2 Diabetes: A Randomized Trial. 2010; Available from: www.annals.org
254. Hauser TH, Salastekar N, Schaefer EJ, Desai T, Goldfine HL, Fowler KM, et al. Effect of targeting inflammation with salsalate: The TINSAL-CVD randomized clinical trial on progression of coronary plaque in overweight and obese patients using statins. *JAMA Cardiol.* 2016 Jul 1;1(4):413–23.
255. Shoelson S, Goldfine A. Treatment of Cardiovascular Disease with Salicylates. U.S. PCT Application; WO/2009/006583. 2009.
256. Shaw JF. Comparison of the effects of acetylsalicylic acid and sodium salicylate on prolongation of rat cardiac allograft survival and on inhibition of rat platelet aggregation. *Transplantation.* 1983 Jul;36(1):33–6.
257. Minno G Di, Reyers I, Donati MB, Gaetano G De. SALICYLATES AND SURVIVAL OF HEART ALLOGRAFTS IN RATS. *The Lancet.* 1979 Mar 31;313(8118):731.
258. Schopfer FJ, Batthyany C, Baker PRS, Bonacci G, Cole MP, Rudolph V, et al. Detection and quantification of protein adduction by electrophilic fatty acids: mitochondrial generation of fatty acid nitroalkene derivatives. *Free Radic Biol Med [Internet].* 2009 May 1 [cited 2014 Dec 16];46(9):1250–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/article/fcgi?artid=3144282&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
259. Cal K, Leyva A, Rodríguez-Duarte J, Ruiz S, Santos L, Garat MP, et al. A nitroalkene derivative of salicylate, SANA, induces creatine-dependent thermogenesis and promotes weight loss. *Nature Metabolism* 2025 [Internet]. 2025 Jun 17 [cited 2025 Jun 17];1–20. Available from: <https://www-nature-com.proxy.timbo.org.uy/articles/s42255-025-01311-z>
260. Weigt SS, Palchevskiy V, Belperio JA. Inflammasomes and IL-1 biology in the pathogenesis of allograft dysfunction. Vol. 127, *Journal of Clinical Investigation.* American Society for Clinical Investigation; 2017. p. 2022–9.
261. Amores-Iniesta J, Barberà-Cremades M, Martínez CM, Pons JA, Revilla-Nuin B, Martínez-Alarcón L, et al. Extracellular ATP Activates the NLRP3 Inflammasome and Is an Early Danger Signal of Skin Allograft Rejection. *Cell Rep.* 2017 Dec 19;21(12):3414–26.
262. Liu H, Lo CM, Yeung OWH, Li CX, Liu XB, Qi X, et al. NLRP3 inflammasome induced liver graft injury through activation of telomere-independent RAP1/KC axis. *J Pathol [Internet].* 2017 Jul 1 [cited 2025 Mar 24];242(3):284–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28378341/>
263. Chen C, Rong P, Yang M, Ma X, Feng Z, Wang W. The Role of Interleukin-1 β in Destruction of Transplanted Islets. *Cell Transplant [Internet].* 2020 [cited 2025 Mar 24];29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32543895/>
264. Dassing MC, Kers J, Damman J, Navis GJ, Florquin S, Leemans JC. Donor and recipient genetic variants in NLRP3 associate with early acute rejection following kidney

- transplantation. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Nov 7 [cited 2025 Mar 24];6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27819323/>
265. Barbeito L, Trias E, Ibarburi S, Batthyány C, Escande C, López GV, et al. Electrophilic nitroalkene benzoic acid derivates as therapeutic drugs in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and other neurodegenerative conditions [Internet]. US20210121425A1, 2020 [cited 2025 May 25]. Available from: <https://patents.google.com/patent/US20210121425A1/en>
266. Bridges JW, French MR, Smith RL, Williams RT. The fate of benzoic acid in various species. *Biochemical Journal* [Internet]. 1970 Jun 1 [cited 2025 Jun 24];118(1):47–51. Available from: [/biochemj/article/118/1/47/4566/The-fate-of-benzoic-acid-in-various-species](https://biochemj/article/118/1/47/4566/The-fate-of-benzoic-acid-in-various-species)
267. Leonard J V., Morris AAM. Urea cycle disorders. *Seminars in Neonatology* [Internet]. 2002 Feb 1 [cited 2025 Jun 24];7(1):27–35. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084275601900855?via%3Dhub>
268. Modi KK, Roy A, Brahmachari S, Rangasamy SB, Pahan K. Cinnamon and its metabolite sodium benzoate attenuate the activation of p21rac and protect memory and learning in an animal model of Alzheimer's disease. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jun 23 [cited 2025 Jun 24];10(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26102198/>
269. Khasnavis S, Pahan K. Sodium benzoate, a metabolite of cinnamon and a food additive, upregulates neuroprotective Parkinson disease protein DJ-1 in astrocytes and neurons. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* [Internet]. 2012 Jun [cited 2025 Jun 24];7(2):424–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21701815/>
270. Ibarburu S, Kovacs M, Varela V, Rodríguez-Duarte J, Ingold M, Invernizzi P, et al. A Nitroalkene Benzoic Acid Derivative Targets Reactive Microglia and Prolongs Survival in an Inherited Model of ALS via NF-κB Inhibition. *Neurotherapeutics* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2025 May 21];18(1):309–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33118131/>
271. Martinon F, Burns K, Boveresses C, Epalinges C. The Inflammasome : A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL-¹L. 2002;10:417–26.
272. Van Opdenbosch N, Gurung P, Vande Walle L, Fossoul A, Kanneganti TD, Lamkanfi M. Activation of the NLRP1b inflammasome independently of ASC-mediated caspase-1 autoproteolysis and speck formation. *Nature Communications* 2014 5:1 [Internet]. 2014 Feb 4 [cited 2023 May 8];5(1):1–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms4209>
273. Miao EA, Mao DP, Yudkovsky N, Bonneau R, Lorang CG, Warren SE, et al. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010 Feb 16 [cited 2023 May 8];107(7):3076–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20133635/>
274. Rathinam VAK, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, et al. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nature Immunology* 2010 11:5 [Internet]. 2010 Mar 28 [cited 2023 May 8];11(5):395–402. Available from: <https://www.nature.com/articles/ni.1864>

275. Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2014 Jun [cited 2015 May 6];1319:82–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24840700>
276. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* [Internet]. 2010 Apr 29 [cited 2014 Sep 7];464(7293):1357–61. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2946640&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
277. Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med* [Internet]. 2004 Nov [cited 2014 Jul 23];10(11):549–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15519281>
278. Mitsuishi Y, Motohashi H, Yamamoto M. The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Front Oncol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Dec 28];2(December):200. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3530133&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
279. Jian Z, Tang L, Yi X, Liu B, Zhang Q, Zhu G, et al. Aspirin induces Nrf2-mediated transcriptional activation of haem oxygenase-1 in protection of human melanocytes from H2O2-induced oxidative stress. *J Cell Mol Med*. 2016 Jul 1;20(7):1307–18.
280. Iles KE, Wright MM, Cole MP, Welty NE, Ware LB, Matthay MA, et al. Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: nitrolinoleic acid mediates protective effects through regulation of the ERK pathway. *Free Radic Biol Med*. 2009 Apr 1;46(7):866–75.
281. Kim KC, Kang KA, Zhang R, Piao MJ, Kim GY, Kang MY, et al. Up-regulation of Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression by eckol, a phlorotannin compound, through activation of Erk and PI3K/Akt. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2010 Feb;42(2):297–305.
282. Shan Y, Pepe J, Lu TH, Elbirt KK, Lambrecht RW, Bonkovsky HL. Induction of the heme oxygenase-1 gene by metalloporphyrins. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Aug 15;380(2):219–27.
283. Kietzmann T, Samoylenko A, Immenschuh S. Transcriptional Regulation of Heme Oxygenase-1 Gene Expression by MAP Kinases of the JNK and p38 Pathways in Primary Cultures of Rat Hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2003 May;278(20):17927–36.
284. Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, et al. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J* [Internet]. 2003 May 1 [cited 2023 Oct 30];371(Pt 3):887–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12570874/>
285. Wei Z, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* [Internet]. 2002 [cited 2023 Oct 30];12(1):9–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11942415/>
286. Martin D, Rojo AI, Salinas M, Diaz R, Gallardo G, Alam J, et al. Regulation of Heme Oxygenase-1 Expression through the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway and

- the Nrf2 Transcription Factor in Response to the Antioxidant Phytochemical Carnosol. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Mar 5;279(10):8919–29.
287. Salinas M, Wang J, Rosa De Sagarrá M, Martín D, Rojo AI, Martín-Pérez J, et al. Protein kinase Akt/PKB phosphorylates heme oxygenase-1 in vitro and in vivo. 2004; Available from: <http://scansite.mit.edu>
288. Acosta-Martinez M, Cabail MZ. The PI3K/Akt Pathway in Meta-Inflammation. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Jun 28];23(23). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36499659/>
289. Liao Y, Hung MC. Physiological regulation of Akt activity and stability. *Am J Transl Res* [Internet]. 2010 [cited 2023 Jun 28];2(1):19. Available from: [/pmc/articles/PMC2826820/](https://pmc/articles/PMC2826820/)
290. Hemmings BA, Restuccia DF. The PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2023 Jun 28];7(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25833846/>
291. Fayard E, Xue G, Parcellier A, Bozulic L, Hemmings BA. Protein kinase B (PKB/Akt), a key mediator of the PI3K signaling pathway. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2010 [cited 2023 Jun 28];346:31–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20517722/>
292. Li R, Zou X, Huang H, Yu Y, Zhang H, Liu P, et al. HMGB1/PI3K/Akt/mTOR Signaling Participates in the Pathological Process of Acute Lung Injury by Regulating the Maturation and Function of Dendritic Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Jun 19 [cited 2023 Jun 28];11:1104. Available from: [/pmc/articles/PMC7318890/](https://pmc/articles/PMC7318890/)
293. Chauveau C, Rémy S, Royer PJ, Hill M, Tanguy-Royer S, Hubert FX, et al. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood*. 2005 Sep 1;106(5):1694–702.
294. Pae HO, Oh GS, Choi BM, Chae SC, Kim YM, Chung KR, et al. Carbon Monoxide Produced by Heme Oxygenase-1 Suppresses T Cell Proliferation via Inhibition of IL-2 Production. *The Journal of Immunology*. 2004 Apr 15;172(8):4744–51.
295. Burt TD, Seu L, Mold JE, Kappas A, McCune JM. Naive Human T Cells Are Activated and Proliferate in Response to the Heme Oxygenase-1 Inhibitor Tin Mesoporphyrin. *The Journal of Immunology*. 2010 Nov 1;185(9):5279–88.
296. Pae HO, Oh GS, Choi BM, Chae SC, Chung HT. Differential expressions of heme oxygenase-1 gene in CD25- and CD25+ subsets of human CD4+ T cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Jul 4;306(3):701–5.
297. George JF, Braun A, Brusko TM, Joseph R, Bolisetty S, Wasserfall CH, et al. Suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is dependent on expression of heme oxygenase-1 in antigen-presenting cells. *American Journal of Pathology*. 2008;173(1):154–60.
298. Wong TH, Chen HA, Gau RJ, Yen JH, Suen JL. Heme oxygenase-1-expressing dendritic cells promote Foxp3+ regulatory T cell differentiation and induce less severe airway inflammation in murine models. *PLoS One*. 2016 Dec 1;11(12).

299. Park DJ, Agarwal A, George JF. Heme oxygenase-1 expression in murine dendritic cell subpopulations: Effect on CD8+ dendritic cell differentiation in vivo. *American Journal of Pathology*. 2010;176(6):2831–9.
300. Riquelme SA, Pogu J, Anegon I, Bueno SM, Kalergis AM. Carbon monoxide impairs mitochondria-dependent endosomal maturation and antigen presentation in dendritic cells. *Eur J Immunol [Internet]*. 2015 Dec 1 [cited 2025 Jun 24];45(12):3269–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26461179/>
301. Tognarelli EI, Duarte LF, Farías MA, Cancino FA, Corrales N, Ibáñez FJ, et al. Heme Oxygenase-1 Expression in Dendritic Cells Contributes to Protective Immunity against Herpes Simplex Virus Skin Infection. *Antioxidants [Internet]*. 2023 Jun 1 [cited 2025 Jun 24];12(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37371900/>
302. Workman CJ, Vignali DAA. Negative Regulation of T Cell Homeostasis by Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223). *The Journal of Immunology [Internet]*. 2005 Jan 15 [cited 2025 May 15];174(2):688–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15634887/>
303. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity [Internet]*. 2004 Oct [cited 2025 May 15];21(4):503–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15485628/>
304. Karimi K, Kandiah N, Chau J, Bienenstock J, Forsythe P. A Lactobacillus rhamnosus Strain Induces a Heme Oxygenase Dependent Increase in Foxp3+ Regulatory T Cells. *PLoS One [Internet]*. 2012 Oct 15 [cited 2025 May 15];7(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23077634/>
305. Schumacher A, Wafula PO, Teles A, El-Mousleh T, Linzke N, Zenclussen ML, et al. Blockage of Heme Oxygenase-1 abrogates the protective effect of regulatory T cells on murine pregnancy and promotes the maturation of dendritic cells. *PLoS One [Internet]*. 2012 Aug 10 [cited 2025 May 15];7(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22900010/>
306. Corona D, Ekser B, Gioco R, Caruso M, Schipa C, Veroux P, et al. Heme-oxygenase and kidney transplantation: A potential for target therapy? Vol. 10, *Biomolecules*. MDPI AG; 2020.
307. Öllinger R, Pratschke J. Role of heme oxygenase-1 in transplantation. Vol. 23, *Transplant International*. 2010. p. 1071–81.
308. Mcdaid J, Yamashita K, Chora A, Öllinger R, Strom TB, Li XC, et al. Heme oxygenase-1 modulates the allo-immune response by promoting activation-induced cell death of T cells. *The FASEB Journal*. 2005 Mar;19(3):1–22.
309. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*. 2008 Jun 5;3(6):1101–8.
310. Carvalho PC, Lima DB, Leprevost F V., Santos MDM, Fischer JSG, Aquino PF, et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat Protoc*. 2016 Jan 3;11(1):102–17.
311. Su X, Liu B, Wang S, Wang Y, Zhang Z, Zhou H, et al. NLRP3 inflammasome: A potential therapeutic target to minimize renal ischemia/reperfusion injury during

- transplantation. *Transpl Immunol* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Apr 13];75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36126906/>
312. Kang C, Rostoker R, Ben-Shumel S, Rashed R, Duty JA, Demircioglu D, et al. Tmem176b regulates akt/mTOR signaling and tumor growth in triple-negative breast cancer. *Cells*. 2021 Dec 1;10(12).
313. Hackstein H, Morelli AE, Larregina AT, Ganster RW, Papworth GD, Logar AJ, et al. Aspirin Inhibits In Vitro Maturation and In Vivo Immunostimulatory Function of Murine Myeloid Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*. 2001 Jun 15;166(12):7053–62.
314. Schwoebel F, Barsig J, Wendel A, Hamacher J. Quantitative assessment of mouse skin transplant rejection using digital photography. *Lab Anim* [Internet]. 2005 Apr;39(2):209–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15901364>
315. Pilat N, Wiletel M, Weijler AM, Steiner R, Mahr B, Warren J, et al. Treg-mediated prolonged survival of skin allografts without immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2019 Jul 2 [cited 2025 Feb 5];116(27):13508–16. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1903165116>
316. Bates DJP, Smitherman PK, Townsend AJ, King SB, Morrow CS. Nitroalkene fatty acids mediate activation of Nrf2/ARE-dependent and PPAR γ -dependent transcription by distinct signaling pathways and with significantly different potencies. *Biochemistry*. 2011 Sep 13;50(36):7765–73.
317. Cui T, Schopfer FJ, Zhang J, Chen K, Ichikawa T, Baker PRS, et al. Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Nov 24 [cited 2014 Dec 16];281(47):35686–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/article/2169500>&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
318. Mitchell JA, Saunders M, Barnes PJ, Newton R, Belvisi MG. Sodium Salicylate Inhibits Cyclo-Oxygenase-2 Activity Independently of Transcription Factor (Nuclear Factor B) Activation: Role of Arachidonic Acid.
319. Moretti J, Jia B, Hutchins Z, Roy S, Yip H, Wu J, et al. Caspase-11 interaction with NLRP3 potentiates the noncanonical activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2024 Aug 21];23(5):705–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35487985/>
320. Abraham NG, Drummond GS, Lutton JD, Kappas A. The Biological Significance and Physiological Role of Heme Oxygenase. *Cellular Physiology and Biochemistry* [Internet]. 1996 Jul 1 [cited 2024 Aug 11];6(3):129–68. Available from: <https://doi.org/10.1159/000154819>
321. Ryter SW. Heme Oxygenase-1, a Cardinal Modulator of Regulated Cell Death and Inflammation. *Cells* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2024 Aug 11];10(3):1–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33671004/>
322. Beyzaei Z, Shojazadeh A, Geramizadeh B. The role of regulatory T cells in liver transplantation. *Transpl Immunol*. 2022 Feb 1;70:101512.
323. Chen WJ, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of

transcription factor Foxp3. *J Exp Med* [Internet]. 2003 Dec 15 [cited 2023 Apr 12];198(12):1875–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14676299/>

ANEXO

Anexo 1: Artículo publicado relacionado a esta tesis

Original Basic Science—General



Activation of the Immunoregulatory Cation Channel TMEM176B by a Nitroalkene Derivative of Salicylate Prolongs Graft Survival

Germán Galliussi, BSc,^{1,2} Javier Noboa, MD,³ Alejandro Leyva, PhD,⁴ Sofía Russo, PhD,^{1,5} Lucía Collela, MSc,^{2,6} Claire Usal, BSc,⁷ Mateo Malcuori, MD,¹ David Charbonnier, BSc,¹ Carlos Escande, PhD,⁸ Gloria Virginia López, PhD,^{2,6} Rosario Durán, PhD,⁴ Ignacio Anegón, MD,⁷ Marcelo Hill, MD, PhD,^{1,5} Carlos Batthyán, MD, PhD², and Mercedes Segovia, MD, PhD^{1,5}

Background. Targeting emerging immunoregulatory molecules may open new therapeutic perspectives to control alloresponses and alleviate the burden of immunosuppressors. Transmembrane protein 176B (TMEM176B) is an intracellular cation channel highly expressed by myeloid cells. We have shown that TMEM176B is associated with allograft tolerance. Moreover, it controls the tolerogenic function of dendritic cells and inhibits NOD-, LRR-, and pyrin domain-containing protein 3 inflammasome. Here, we speculated that pharmacological activation of TMEM176B by the nitroalkene derivative of 5-(2-nitroethenyl) salicylic acid (SANA) may prolong allograft survival through active immunoregulatory mechanisms. **Methods.** SANA impact on TMEM176B activity was studied in vitro and in vivo. We assessed the potential efficacy of SANA treatment in prolonging graft survival in 2 allograft models: a mouse skin model with minor mismatches and a rat heart model with fully mismatches. Wild type and *Tmem176b*^{-/-} recipient mice were used. Graft survival and innate and adaptive immune response were analyzed at the skin graft and draining lymph nodes through flow cytometry studies. **Results.** SANA was identified as an activator of TMEM176B-dependent ion transport. SANA prolongs allograft survival in a *Tmem176b*-dependent manner. SANA triggered the expression of the immunoregulatory enzyme heme oxygenase-1 in wild type but not in *Tmem176b*^{-/-} MHCI⁺CD11c^{high}CD11b⁺ conventional dendritic cells within the graft. SANA therapy was associated with increased CD4⁺Forkhead box P3⁺ regulatory T (Treg) in the graft. The heme oxygenase-1 inhibitor tin protoporphyrin IX completely blocked the effect of SANA on graft survival and Treg in vivo. Furthermore, Treg modulation by anti-CD3 antibodies improves the graft-protecting effect of SANA. **Conclusions.** SANA-mediated activation of TMEM176B triggers an immunoregulatory pathway that prolongs skin and heart graft survival.

(Transplantation 2025;00: 00–00).

Received 2 January 2025. Revision received 19 May 2025.

Accepted 22 May 2025.

¹ Laboratory of Immunoregulation and Inflammation, Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay.

² Laboratory of Vascular Biology and Drug Development, Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay.

³ Centro de Nefrología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

⁴ Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay.

⁵ Immunobiology Department, Faculty of Medicine, University of the Republic, Montevideo, Uruguay.

⁶ Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

⁷ Institut National de la Santé et la Recherche Médicale (INSERM), Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR1064, Nantes Université, Nantes, France.

⁸ Laboratory of Metabolic Diseases and Aging, Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay.

This study was supported by the MERCOSUR Structural Convergence Fund (FOCEM) Convenio de Financiamiento (COF) 03/11 (C.B. and M.H.). G.G. was supported by scholarships from Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) (POS_NAC_2018_1_151162), and Comisión Académica

de Posgrado, Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) UdelaR, Uruguay.

C.E., G.V.L., and C.B. hold shares in EOLO USA Inc. G.G. and L.C. are employed by EOLO USA Inc. M.H. hold shares in ARDAN Pharma USA Inc. The other authors declare no conflicts of interest.

G.G., I.A., M.H., C.B., and M.S. participated in conceptualization and research design. G.G., J.N., A.L., S.R., L.C., C.U., M.M., and D.C. participated in performance of the research. G.G., A.L., S.R., R.D., I.A., M.H., C.B., and M.S. participated in data analysis. R.D., I.A., M.H., C.B., and M.S. participated in validation. M.S. participated in writing—original draft. G.G., I.A., M.H., and C.B. participated in writing—review and editing. M.H., M.S., and C.B. participated in funding acquisition. R.D., G.V.L., and C.E. participated in new reagents or analytic tools. M.H., C.B., and C.E. participated in supervision.

C.B. and M.S. are co-senior authors.

Visual abstract is available online at doi.org/10.1097/TP.0000000000005483.

Supplemental digital content (SDC) is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text, and links to the digital files are provided in the HTML text of this article on the journal's Web site (www.transplantjournal.com).

Correspondence: Mercedes Segovia, MD, PhD, Immunobiology Department, Faculty of Medicine, University of the Republic, Mataojo 2020 11400, Montevideo, Uruguay. (msegovia@pasteur.edu.uy).

Copyright © 2025 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0041-1337/20/0000-00

DOI: 10.1097/TP.0000000000005483

INTRODUCTION

The transplantation of organs and tissues is the most suitable strategy when an organ exhibits severe functional failure.¹ While systemic immunosuppressants effectively alleviate episodes of acute rejection in the majority of cases, lifelong treatment is required and is associated with frequent and severe adverse effects.² Conversely, the therapeutic management of chronic rejection remains an unresolved medical issue.^{3,4} Therefore, the characterization of pharmacological targets involved in immune-regulatory pathways appears necessary. Early studies have shown that in rat allotransplantation models, transmembrane protein 176B (TMEM176B) expression was associated with immunological tolerance, suggesting a potential immunoregulatory role for this protein.⁵ We subsequently described TMEM176B as an intracellular, acid-sensitive, nonspecific cation channel.⁶ Moreover, we demonstrated its role in regulating the cross-presentation of alloantigens, necessary for generating donor-specific regulatory CD8⁺ T lymphocytes.⁶ In mouse and human myeloid cells, TMEM176B inhibits NOD-, LRR-, and pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome activation through ionic mechanisms.⁷ Accordingly, genetic deletion and pharmacological blockade of TMEM176B enhance CD8-mediated anti-tumoral immune responses through mechanisms involving inflammasome activation.⁷ In mouse coronavirus infection, TMEM176B deletion was associated with inflammasome-dependent control of exhausted CD8⁺ T cells.⁸ Conversely, TMEM176B expression in peripheral blood has been associated with clinical responses to anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis.⁹ Thus, identifying pharmacological approaches to trigger TMEM176B activity may open new strategies to modulate alloresponses.

Nitroalkenes are nonconventional anti-inflammatory compounds that have been reported to modulate inflammatory ion channels.¹⁰ We have shown that the nitroalkene derivative of salicylate, 5-(2-nitroethenyl) salicylic acid (SANA), inhibits inflammatory responses in vitro.¹¹ In vivo, SANA can alleviate the effects of diet-induced obesity, liver steatosis, and insulin resistance.¹² Moreover, it has also recently completed a phase I A/B first-in-human clinical trial, in healthy lean and overweight/obese volunteers, where SANA was found to be safe, well-tolerated and demonstrated promising results in promoting weight loss (secondary identification data: MVD1-AU-001).¹³ Recent studies have shown that aspirin use is associated with a protective effect against the development of moderate to severe coronary allograft vasculopathy in heart transplant patients.¹⁴ However, to our knowledge, no published studies have explored the use of nitroalkenes in organ or bone marrow transplantation or in autoimmune diseases.

Here, we show that SANA triggers TMEM176B ion transport activity and prolongs allograft survival in a *Tmem176b*-dependent manner. Mechanistically, pharmacological activation of TMEM176B by SANA leads to the induction of the immunoregulatory enzyme heme oxygenase-1 (HO-1) in CD11b⁺ conventional dendritic cells. Downstream, HO-1 promotes the generation of CD4-Forkhead box P3 (FoxP3)⁺ T cells within the skin graft. Accordingly, regulatory T (Treg) modulation with anti-CD3 antibodies improves the graft-protecting effect

of SANA. Thus, pharmacological activation of the immunoregulatory ion channel TMEM176B contributes to protecting the allograft through active mechanisms.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All mice were obtained and housed in a specific pathogen-free animal facility at the Institut Pasteur de Montevideo. The study used C57BL/6 and *Tmem176b*^{-/-}, aged 6–12 wk. Experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA number 005-22) and performed according to National Law Number 18.611 and relevant international laboratory animal welfare guidelines and regulations. Heart allografts in rats were performed in the animal facility at the UMR-S 1064 Center for Research in Transplantation and Translational Immunology, following INSERM ethical guidelines.

Cells

Bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) were generated from bone marrow precursors isolated from C57BL/6 or *Tmem176b*^{-/-}, following established protocols.⁷ Human Tohoku Hospital Pediatrics-1 (THP-1) monocytes (TIB-202) and the Chinese hamster ovary (CHO-K1) cell line was obtained from American Type Culture Collection.

Reagents

SANA was synthesized as described before.¹² Other reagents are described in Table S1 (SDC, <https://links.lww.com/TP/D291>).

Transplant Models and Treatments

For the skin allograft, tail skin from male donors of the same strain was grafted onto female recipients as described by Segovia et al.⁶ Skin allografts were visually inspected every 48–72 h. Rejection was clinically diagnosed when the skin allograft lost >50% of its original size and/or >10% showed necrosis.^{15,16} Heterotopic heart allografts were performed in rats following the procedure described by Braudeau et al¹⁷ and using the Ono and Lindsey¹⁸ technique. Briefly, a heart from 8–12-wk-old male Lewis 1 (LEW1) rat (haplotype RT1u) was transplanted transversely into the right flank, within the abdominal cavity of an LEW1A rat (haplotype RT1a). Two main vascular anastomoses are performed: the aorto-aortic anastomosis (ascending aorta of the heart allograft and the recipient abdominal aorta) and the anastomosis of the donor's pulmonary artery with the recipient's inferior vena cava. Graft functionality was assessed by palpation of the heartbeat through the abdominal wall. Rejection was defined as the cessation of the grafted heart's beating. In both models, animals were treated with SANA or salicylate administered by gavage (100 mg/kg) for 15 d, beginning the day before grafting. HO-1 inhibition was achieved using tin protoporphyrin IX (SnPP) at 40 mg/kg in PBS-NaOH 0.1 N, and pH 7.4. SnPP was injected intraperitoneally on days -1, 3, 7, 11, and 15 posttransplantation. Fragment antigen-binding anti-CD3ε was administered via i.p. injection (5 µg/mouse) on days -1, 1, 3, and 7 posttransplantation.

TMEM176B Activation Assay

TMEM176B activity was evaluated as described by Segovia et al.⁷ Briefly, CHO cells were transfected with either the pmCherry-N1 control plasmid or the hTMEM176b-pmCherry-N1 plasmid using Lipofectamine LTX with Plus Reagent. Transfection was conducted for 4h, followed by washing and culturing for an additional 24h.

Proteomic Analysis by Mass Spectrometry

THP-1 macrophages were treated with 0.1mM SANA or 0.1% dimethyl sulfoxide for 24h. Cells were lysed using nuclear and cytoplasmic extraction lysis buffer supplemented with protease inhibitors, and protein quantification was performed through densitometric in-gel analysis. Equal amounts of protein samples were resolved to a depth of 1cm in a polyacrylamide gel, then fixed and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. In-gel protein digestion involved excising the 1cm bands, followed by reduction and alkylation of cysteine residues through sequential incubation with 10mM dithiothreitol and 55mM iodoacetamide. Overnight trypic digestion was performed in-gel with 0.017mg/mL Trypsin at 37 °C. Tryptic peptides were extracted by incubating the gel slices with 60% acetonitrile 0.1% trifluoroacetic acid in two 1-h steps at 30 °C. Samples were then vacuum-dried, and peptides were desalted using ZipTip C18 (Merck Millipore). Eluates were vacuum-dried again, reconstituted in 0.1% trifluoroacetic acid, and injected into an Orbitrap Thermo Q Exactive Plus mass spectrometer. Proteome data analysis was conducted using PatternLab for Proteomics V software.¹⁹ A target-reverse database was generated using the "Homo sapiens" proteome downloaded from Uniprot (May 12, 2016) and most common contaminants in proteomic experiments were also included. Raw files were searched against the database using the following search parameters: precursor mass tolerance: 40ppm; enzyme: trypsin; enzyme specificity: fully specific; missed cleavages: 2; and modifications: methionine oxidation as variable modification and carbamidomethylation of cysteine as fixed modification. Peptide spectrum matches were filtered to achieve <1% of false discovery rate at the protein level. To compare the proteome of treated and untreated macrophages, PatternLab's Venn diagram and T-fold modules were used. Venn diagram allowed pinpointing proteins exclusively detected in 1 biological condition using a probability mode that relies on a Bayesian model integrated into PatternLab for Proteomics ($P < 0.05$). For protein quantification, we relied on the spectral counts considering proteins identified in at least 4 of the 6 biological replicates.

HO-1 Gene Expression Study by Quantitative Polymerase Chain Reaction

THP-1 macrophages were treated with SANA or salicylate (0.1mM), or 0.1% dimethyl sulfoxide for 5h at 37 °C in 5% CO₂. Total RNA was extracted using TRIzol reagent, and RNA concentration was quantified with a Thermo NanoDrop spectrophotometer. Reverse transcription of 1 µg of RNA was performed using SuperScript II Reverse Transcriptase, following the manufacturer's protocol. cDNA (20ng) was analyzed by real time-quantitative polymerase chain reaction on an Eco Illumina thermocycler using FastStart Universal SYBR Green Master. Primer

sequences are listed in Table S1 (SDC, <https://links.lww.com/TP/D291>). Relative mRNA expression levels were calculated using the delta delta threshold cycle method²⁰ and normalized to the housekeeping gene β-actin.

Western Blot

BMDCs from C57BL/6, wild type (WT) and *Tmem176b*^{-/-} mice were treated with SANA (0.1 or 0.2mM) for 10, 30, 60, and 180min in assays for AK strain transforming (AKT), extracellular signal-regulated kinase (ERK), and p38 activation, or for 24h in assays to measure the HO-1 expression. Additionally, BMDCs were pretreated with 10 µM Triciribine, for 30min, washed with PBS, and then treated with SANA (0.2mM) for 3h. Following cells were harvested by scraping, and lysed in radioimmunoprecipitation assay buffer (25mM Tris, pH 8.0, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS), supplemented with 5mM sodium fluoride, a protease inhibitor cocktail, 50mM β-glycerophosphate, 5mM nicotinamide, and 1mM sodium orthovanadate for phosphorylated protein analysis. Primary antibodies were incubated overnight at 4 °C, followed by 1-h incubation with secondary antibodies at room temperature. Signal detection was performed using chemiluminescence with enhanced chemiluminescence, and images were captured with an ImageQuant-800 system. Image quantification was conducted using ImageJ software.

Flow Cytometry Analysis and Staining

Draining lymph nodes (dLNs) were disaggregated in PBS-Serum-EDTA (PBS with 2% fetal bovine serum and 0.7mM EDTA), then washed. Skin grafts were treated with collagenase D (2mg/mL) for 20 min at 37 °C, then disaggregated in PBS-Serum-EDTA. Cell viability was assessed with eFluor506 dye in PBS for 30 min, followed by membrane antibody staining on ice. Cells were fixed with 2% paraformaldehyde, and intracellular staining was performed using PSA-Saponin. For HO-1 staining, cells were blocked with 10% normal rat serum. Foxp3 and HO-1 staining used respective antibodies and isotype controls, with secondary anti-mouse IgG Alexa 488. Cells were finally fixed with paraformaldehyde, and cell death staining was done using 4',6-diamidino-2-phenylindole. Flow cytometry was conducted on various platforms (Attune NxT, Accord C6, FACS Aria Fusion, Cytek Aurora, and Cyan ADP) and data were analyzed with FlowJo V10.

Mixed Lymphocyte Reaction

BMDCs from C57BL/6 mice were seeded into round-bottom 96-well plates and incubated for 1-2h at 37 °C in 5% CO₂ and then treated with SANA or salicylate (0.2mM) for 24h. Inguinal and mesenteric lymph nodes were harvested from Bagg albino/c (BALB/c) mice and disaggregated in PBS-fetal bovine serum free. The lymph node cells were stained with the proliferation marker Cell Trace Far Red at a concentration of 0.66 µM, incubating for 15 min at room temperature in the dark. In experiments where lymph node cells were stimulated before the mixed lymphocyte reaction, cells were incubated overnight in flat-bottom 96-well plates coated with anti-CD3ε (1 µg/mL) and supplemented with soluble anti-CD28 (1.5 µg/mL). Subsequently, the stained lymph node cells were added

to the BMDCs in the plate. SnPP was also added at this time at a concentration of 50 μ M, incubated for 3–5 d and stained with anti-T-cell receptor beta (TCR β) fluorescein isothiocyanate.

T-Cell Activation APC-Free Assay

Purified T cells were isolated from BALB/c mouse splenocytes using a negative selection magnetic column kit (Pan T-Cell Isolation Kit; Miltenyi Biotec). The T-cell fraction was labeled with the proliferation marker Cell Trace Far Red, as previously described. Cells were then plated in flat-bottom 96-well plate's precoated with anti-CD3 ϵ (1 μ g/mL) and supplemented with soluble anti-CD28 (1 μ g/mL). SANA (0.2 mM) was added to the cultures, and cells were incubated for 72 h. Following incubation, cells were harvested and stained with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-TCR β .

Statistics Analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was assessed using 1-way or 2-way ANOVA, followed by multiple comparison tests (Tukey or Bonferroni), as indicated in the figure legends. A *P*-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant. Before conducting ANOVA, the normality of the data was verified using the Shapiro-Wilk test. Survival analysis significance was evaluated using the Mantel-Cox log-rank test. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

RESULTS

Pharmacological Activation of TMEM176B by SANA Improves Allograft Survival

We first wished to determine whether SANA may trigger TMEM176B-dependent intracellular ion transport. For this purpose, CHO cells were transfected with TMEM176B-mCherry-coding and mCherry control plasmids. TMEM176B-dependent ion transport activity was assessed (Figure 1A) by using the Na $^+$ -sensitive fluorescent probe Asante NaTRIUM Green-2. As expected, the fluorescent emission of Asante NaTRIUM Green-2 was higher in the TMEM176B+mCherry CHO cells compared with the control plasmid (mCherry).^{7,8} We observed that SANA but not salicylate (precursor of SANA) activated the ion transport mediated by TMEM176B. Consequently, we hypothesized that SANA could activate TMEM176B to elicit immune responses aimed at protecting the allograft. To investigate this hypothesis, we first evaluated the impact of SANA and Salicylate on allograft survival in 2 different models. In the first model, heterotopic fully mismatched heart allografts in rats were performed. Lewis 1W hearts were grafted onto LEW1A recipients¹⁷ (Figure 1B). In the second model (Figure 1C), male skin was grafted onto recipient female mice. In this case, the alloantigens expressed by the Y chromosome are recognized by the immune system of the female recipient from the same strain.^{15,16} We observed that the treatment with SANA for 15 d significantly prolonged the allograft survival in both models (Figure 1B and C). In heart transplantation, salicylate prolonged heart allograft survival although the efficacy was significantly lower when compared with SANA

(Figure 1B). In the skin graft model, salicylate failed to prolong allograft survival in comparison with untreated animals (Figure 1C). Then, we investigated whether SANA-related effect relies on its capability to activate the ion transport capacity of TMEM176B. To assess this issue, littermate WT and *Tmem176b*^{-/-} female mice were grafted with WT or *Tmem176b*^{-/-} male donor skin and treated with SANA or vehicle (Figure 1D). As expected, SANA prolonged allograft survival in WT animals. In contrast, SANA completely failed to prolong allograft survival in *Tmem176b*^{-/-} mice (Figure 1D). We therefore concluded that SANA prolongs allograft survival in a *Tmem176b*-dependent manner.

TMEM176B Activation by SANA Induces the Expression of HO-1 in CD11c^{high}CD11b⁺ MHCII⁺ DCs

We then aimed at understanding the mechanisms by which TMEM176B modulation by SANA might control allograft responses. We focused on myeloid cells since we have shown that TMEM176B function in this compartment plays an immunoregulatory role in different pathophysiological settings.^{5,8} To investigate this issue, we treated human THP-1 macrophages with SANA followed by an unbiased shotgun proteomics analysis by mass spectrometry. With this approach, 46 proteins were identified only in SANA-treated cells, being HO-1 one of the most enriched (Table S2, SDC, <https://links.lww.com/TP/D291>; Figure 2A). HO-1 is an immunoregulatory molecule known to modulate alloresponses^{17,21} and one of the mechanisms through which immature regulatory DCs control effector immune responses.^{22,23} We then performed a western blot analysis comparing the expression of HO-1 in WT and *Tmem176b*^{-/-} BMDCs treated with SANA or untreated control (Figure 2B and C). Treatment of BMDCs with 0.2 mM SANA significantly triggered HO-1 expression in WT and *Tmem176b*^{-/-} BMDCs. However, at 0.2 mM SANA, HO-1 expression was higher in WT versus *Tmem176b*^{-/-} BMDCs. Thus, in vitro SANA-triggered HO-1 expression partially depends on *Tmem176b*. Of note, salicylate was unsuccessful in inducing HO-1 (Figure S1A, SDC, <https://links.lww.com/TP/D291>). In untreated BMDCs, WT cells tended to express higher levels of HO-1 versus their *Tmem176b*^{-/-} counterparts. Although statistical significance was not reached, this observation might be biologically relevant. Indeed, HO-1 and *Tmem176b* has been associated with the immature state of DCs.^{5,22,24} Thus, these proteins might be inter-regulated within immature DCs. Mechanistically, AKT phosphorylation was required for HO-1 induction by SANA in BMDCs (Figure S2A–F, SDC, <https://links.lww.com/TP/D291>). In contrast, SANA did not affect the ERK or p38 pathways (Figure S2G–J, SDC, <https://links.lww.com/TP/D291>). In functional assays, BMDCs pre-treated with SANA failed to stimulate allogeneic T cells in mixed lymphocyte reaction (Figure 2D). Moreover, SANA also inhibited proliferation of T cells stimulated with anti-CD3 + anti-CD28 antibodies (Figure S2K and L, SDC, <https://links.lww.com/TP/D291>). SANA-dependent inhibition of the BMDCs allostimulatory capacity was partially rescued by the HO-1 inhibitor SnPP (Figure 2D). To further assess the *in vivo* relevance of these findings, we analyzed HO-1 expression by flow cytometry at 15

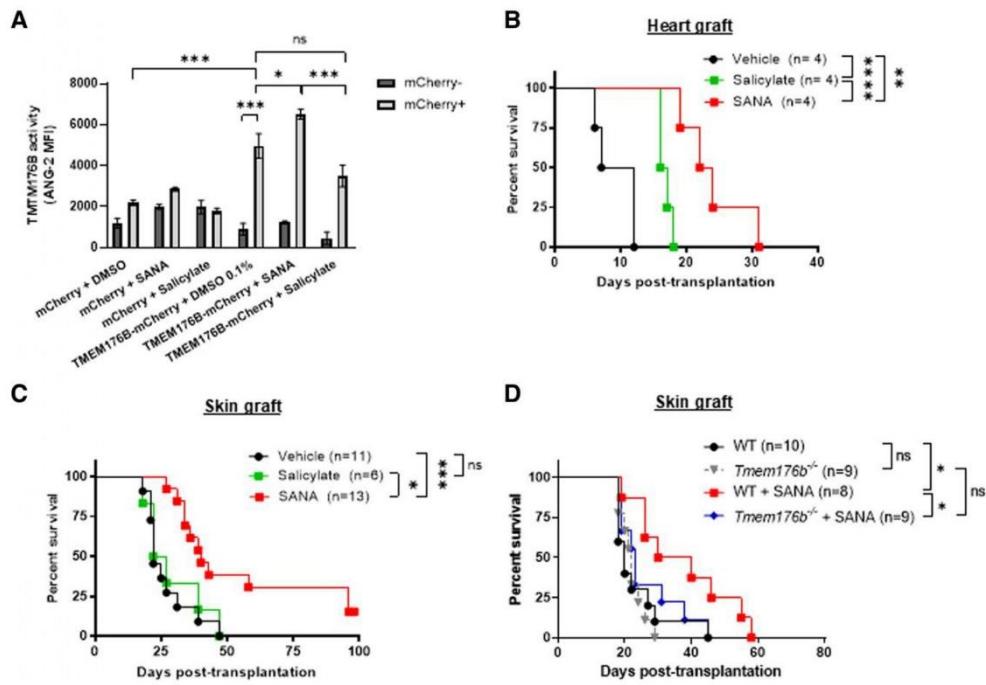


FIGURE 1. SANA prolongs allograft survival in a *TMEM176B*-dependent manner. A, TMEM176B activity was assessed in transfected Chinese hamster ovary (CHO; pmCherry-N1, huTMEM176bpmCherry-N1 plasmids). Cells were then loaded with 1 mM ANG-2 washed and incubated with 140 mM Na⁺-containing phosphatase buffer or 140 mM N-methyl-D-glucamine (NMDG) to substitute Na⁺. Cells were treated with DMSO 0.1% (vehicle), SANA (0.1 mM) or salicylate (0.1 mM) and then analyzed by flow cytometry. Mean fluorescence intensity (MFI) from NMDG-containing solutions was subtracted to MFI from Na⁺-containing solution. Two-way ANOVA test, *P ≤ 0.05, ***P ≤ 0.001. One experiment representative of the 3 is shown. B, A heart from Lewis 1W rats was implanted into the abdominal cavity of LEW1A rats. Receptors were treated with SANA or salicylate (100 mg/kg, by oral gavage) or vehicle from day -1 before transplantation to day 15 after transplantation. Rejection was diagnosed when the heartbeat stopped. Log-rank Mantel-Cox test, **P ≤ 0.01. One experiment with 4 animals per condition was performed. C, Minor mismatched skin allograft. Briefly, 1 cm² piece of skin taken from the tail of the male mouse is grafted into the left subscapular region of a female mouse. Receptors were treated with SANA as described in (B). Rejection was diagnosed clinically when the allograft lost >50% of its size and/or >10% of allograft was necrotic. Log-rank Mantel-Cox test, *P ≤ 0.05, ***P ≤ 0.001. Three independent experiments were performed. D, WT or *Tmem176b*^{-/-} female mice were grafted with skin from the tails of WT or *Tmem176b*^{-/-} male mice, respectively. Receptors were treated with SANA as described in (B) and (C). Log-rank Mantel-Cox, *P ≤ 0.05. Three independent experiments were performed. B-D, The number of animals (n) in each group is indicated in the survival graph. ANG-2, Asante NaTRIUM Green-2; DMSO, dimethyl sulfoxide; ns, not significant; SANA, 5-(2-nitroethyl) salicylic acid; TMEM176B, transmembrane protein 176B; WT, wild type.

d posttransplantation in the skin graft and the dLN. As depicted in Figure 2E–G, SANA induced HO-1 expression in WT but not in *Tmem176b*^{-/-} MHCII⁺CD11c^{high}CD11b⁺ conventional (co)DCs within the skin graft. Thus, SANA may prolong allograft survival by triggering HO-1 expression through mechanisms involving TMEM176B and AKT phosphorylation in DCs.

SANA Promotes CD4⁺FoxP3⁺ Regulatory T Lymphocytes Within the Skin Graft Through HO-1

In the field of transplantation, regulatory T lymphocytes play a crucial role in allograft survival.²⁵ HO-1 has been shown to suppress alloimmune responses by inducing CD4⁺ Treg cells.²⁶ These results led us to propose that, in vivo, activation of the TMEM176B-HO-1 axis could lead to the generation of Treg and prolonged allograft survival. To study this hypothesis, we assessed whether

specific inhibition of HO-1 with SnPP in vivo in the skin graft model may undermine the allograft-protective effect of SANA (Figure 3A). Although statistical significance was not reached, graft survival in SnPP-treated animals tended to be longer than in untreated (vehicle) mice. Thus, we cannot rule out immune effector functions mediated by HO-1 in untreated grafted mice as previously reported in other settings.^{27–29} Graft survival in SANA + SnPP was not significantly different versus SANA-treated mice. However, our results showed (Figure 3A) that while SANA significantly prolongs allograft survival compared with the vehicle condition (P ≤ 0.05), this effect was lost in mice co-treated with SANA + SnPP compared with the vehicle condition (SANA + SnPP versus vehicle; P = 0.2). Thus, these results may suggest that SANA prolongs graft survival through mechanisms involving HO-1. To understand the immunological bases of this observation, we immunophenotyped intragraft

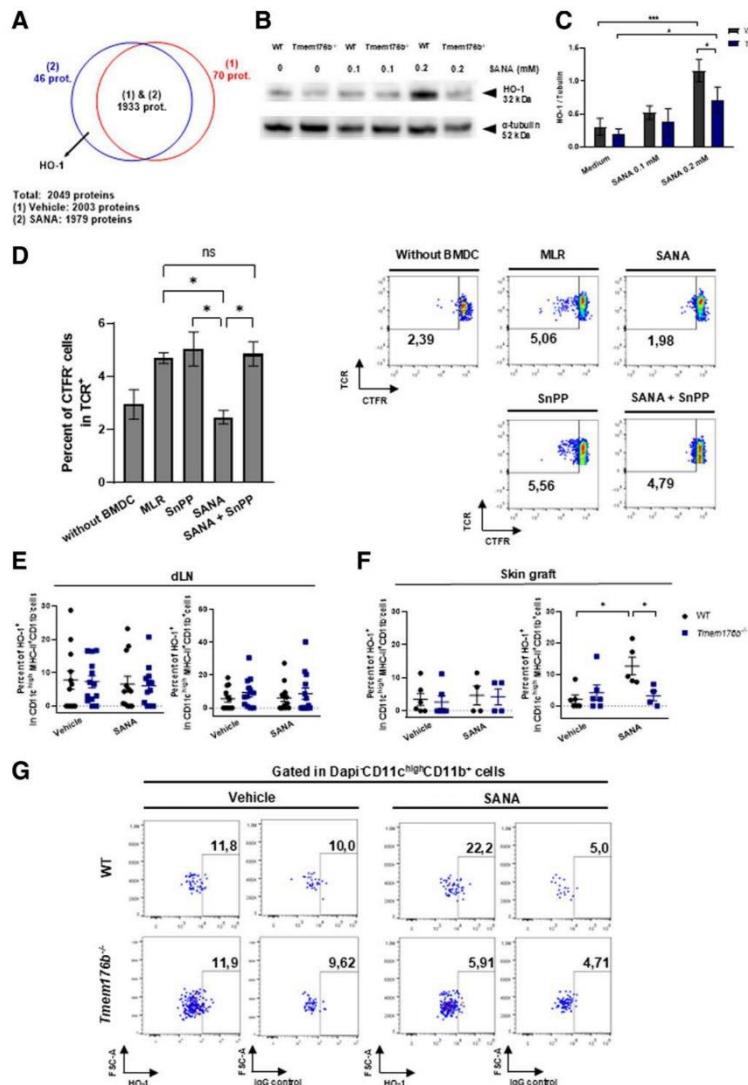


FIGURE 2. HO-1 expression is induced by TMEM176B activation in dendritic cells (DCs). A, Proteomic analysis by mass spectrometry in Tohoku Hospital Pediatrics-1 (TH-1) cells differentiated into macrophages as previously done in Dapueto et al⁵⁵ (2021), *Redox Biology*. Then, cells were treated with SANA (0.1 mM) or vehicle (dimethyl sulfoxide [DMSO]) for 24 h and lysed. Venn diagram shows number of significant identified proteins in each condition, $P \leq 0.05$. The identified proteins are listed in **Tables S2 and S3 (SDC)**, <https://links.lww.com/TP/D291>. For the protein quantification, we relied on the spectral counts, considering proteins identified in at least 4 of the 6 biological replicates. B, *Tmem176b*^{-/-} or WT BMDCs were cultured, differentiated, and then treated with SANA (0.1–0.2 mM) for 24 h. After incubation, the cells were harvested and lysed. C, Pool of HO-1 protein expression from 3 independent experiments, 2-way ANOVA test, $*P \leq 0.05$, $***P \leq 0.001$. D, BMDCs were pretreated with SANA (0.2 mM, 24 h), then washed and added into MLR culture (ratio 1:1 BMDC: lymph nodes [LN] cells) with or without SnPP (50 μ M). The cells were harvested and stained with anti-TCR β antibody. T-cell proliferation was measured by flow cytometry using CTFR staining. Values are shown as mean \pm SEM in a representative graph of 3 independent experiments. One-way ANOVA, $*P \leq 0.05$. E–F, At day 15 posttransplantation, HO-1 expression was assessed by flow cytometry in CD11b⁺ and CD11b⁺CD11c⁺ cells isolated from SANA- or vehicle-treated (0.5% weight/volume [w/v] + 0.5% volume/volume [v/v] Tween-80) WT and *Tmem176b*^{-/-} skin-grafted mice. Panels show quantification in the skin graft and dLN (2-way ANOVA; $*P \leq 0.05$). Data are representative of 2 independent experiments. Representative dot plots illustrating the analyzed cell populations are shown. BMDC, bone marrow-derived dendritic cell; CTFR, Cell Trace Far Red; dLN, draining lymph node; HO-1, heme oxygenase-1; MHC-II, major histocompatibility complex; MLR, mixed lymphocyte reaction; ns, not significant; SANA, 5-(2-nitroethyl) salicylic acid; SnPP, Tin Protoporphyrin IX; TCR β , T-cell receptor beta; TMEM176B, transmembrane protein 176B; WT, wild type.

Copyright © 2025 Wolters Kluwer Health, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

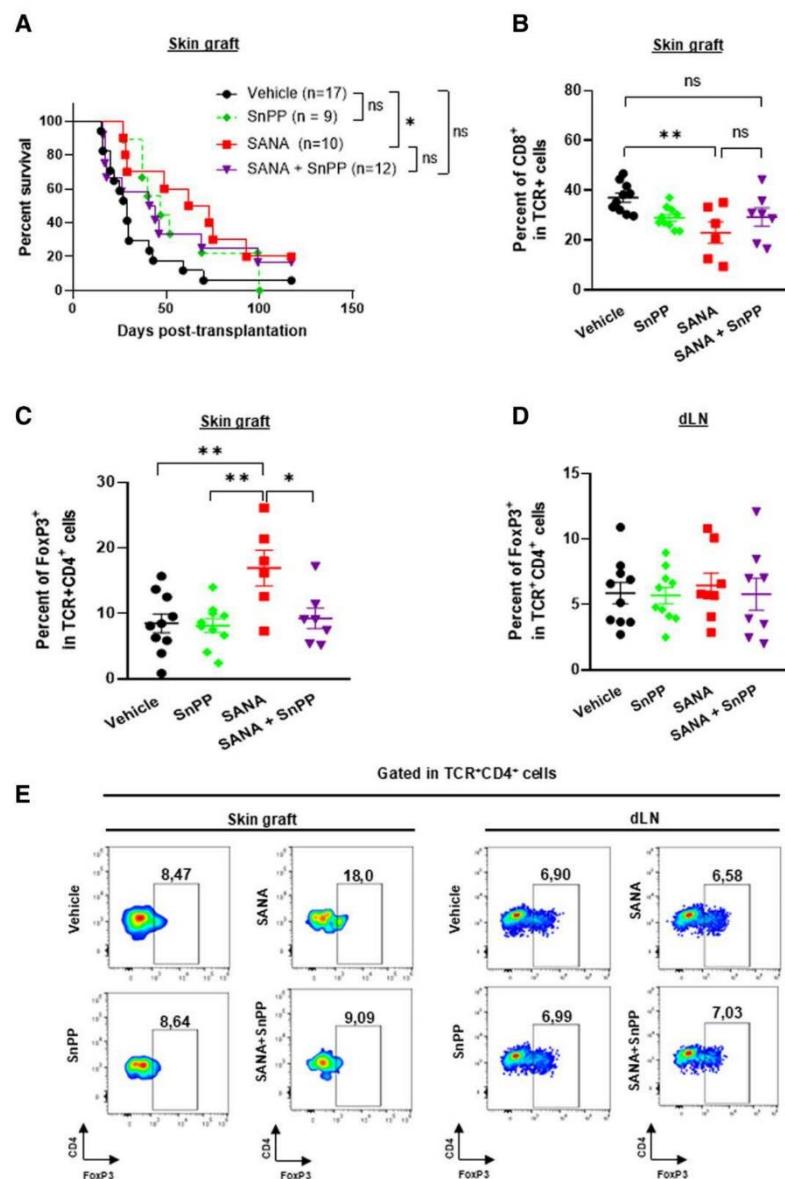


FIGURE 3. Heme oxygenase-1 (HO-1) is indispensable for the SANA-mediated generation of CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T lymphocytes in the skin graft. A, C57BL/6 female mice were transplanted and treated with SANA as described in Figure 1. The SnPP was injected i.p. (40 mg/kg) every 4 d from day -1 to day 15 posttransplantation. Log-rank Mantel-Cox test, * $P \leq 0.05$. Two independent experiments were performed. The number of animals (n) in each group is indicated in the survival graph. B, Analysis of total CD8⁺ T cells (CD8⁺ in TCR⁺) in skin graft by flow cytometry was conducted 15 d after SANA and SnPP treatment. The values are shown as mean \pm SEM of CD8⁺ percentage values. One-way ANOVA test, ** $P \leq 0.01$. Two independent experiments were performed. Analysis of regulatory T-cell populations (TCR⁺CD4⁺FoxP3⁺) were conducted 15 d after treatment with SANA and SnPP in the skin graft (C) and the dLN (D) by flow cytometry. The values are shown as mean \pm SEM of the FoxP3⁺ percentage values. One-way ANOVA test. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$. Two independent experiments were performed. E, Representative dot plot showing the analyzed cell populations in (C) and (D). CD4, cluster of differentiation 4; CD8, cluster of differentiation 8; dLN, draining lymph node; FoxP3, Forkhead box P3; ns, not significant; SANA, 5-(2-nitroethyl) salicylic acid; SnPP, Tin Protoporphyrin IX; TCR, T-cell receptor.

Copyright © 2025 Wolters Kluwer Health, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

lymphocytes by flow cytometry. In SANA-treated mice, the percentage of total CD8⁺ T lymphocytes within the skin graft decreased; however, this reduction was not significant when SnPP was added (Figure 3B). No significant differences were observed in the percentage of total CD4⁺ T lymphocytes within the graft or in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in the dLN when comparing untreated, SnPP, SANA, and SANA + SnPP treatment groups (Figure S3A and B, SDC, <https://links.lww.com/TP/D291>). However, SANA therapy was associated with increased CD4-FoxP3⁺ Treg lymphocytes within the skin graft (Figure 3C-E) but not in the dLN (Figure 3D and E). Furthermore, this effect was dependent on HO-1 activity since it was completely inhibited when animals were co-treated with SnPP (SANA + SnPP). Notably, when skin graft recipients were treated with salicylate, these regulatory populations were not generated (Figure S3C-G, SDC, <https://links.lww.com/TP/D291>).

Overall, our results strongly suggest that the TMEM176B-HO-1 axis triggered by SANA induces the generation and/or accumulation of CD4⁺ Treg.

Anti-CD3 Therapy Improves the Graft-protecting Effect of SANA

We reasoned that SANA-dependent prolongation of graft survival would be improved by a Treg-targeting approach such as anti-CD3 antibodies. The use of anti-CD3 antibodies has garnered significant support from accumulated data in recent decades for its immunosuppressive and tolerogenic properties in the field of allotransplantation.^{30,31} In autoimmunity, anti-CD3 antibodies have gained clinical use.^{32,33} One of the most characterized mechanisms of anti-CD3 therapy is the induction of Treg. We have reported that in the minor-mismatch skin graft model, a short administration of soluble anti-CD3 together with autologous tolerogenic DCs gives rise to specific CD8-CD11c⁺ Treg in a TMEM176B-dependent antigen cross-presentation, necessary to prolong allograft survival.⁶ Here, we showed that SANA induces CD4-FoxP3⁺ T cells within the skin graft (Figure 3C). These results led us to speculate that anti-CD3 antibodies may improve the therapeutic efficacy of SANA. To study this hypothesis, C57BL/6 female mice were grafted with male skin from the same strain and treated with SANA as described in Figure 1. Additionally, some groups of recipients were treated with fragment antigen-binding anti-CD3 at the time of transplantation, as we previously did,⁶ with or without SANA. As expected, both single treatments with anti-CD3 and SANA significantly prolonged transplant survival compared with the control untreated groups (Figure 4A). Moreover, the graft-protecting effect of SANA was further significantly enhanced by adding anti-CD3 antibodies to the therapeutic protocol. Then, we analyzed the T- and regulatory T-cell populations, both CD8⁺ and CD4⁺, in the skin graft (Figure S4B-D, SDC, <https://links.lww.com/TP/D291>), as well as B lymphocytes (Figure S4E, SDC, <https://links.lww.com/TP/D291>). As shown in Figure S4 (SDC, <https://links.lww.com/TP/D291>), there is no difference between groups in terms of total CD4⁺ or CD8⁺ T cells, CD8⁺ Treg or B cells. However, we found that this was not the case for the CD4-FoxP3⁺ population, where a synergy between the treatments allows an increase at the graft level (Figure 4B and C). We conducted additional experiments using the same skin graft model and treatment

conditions but with a fully mismatched major histocompatibility complex system.³⁴ Specifically, skin from BALB/c mice was transplanted onto C57BL/6 recipients. As shown in Figure S4A (SDC, <https://links.lww.com/TP/D291>), we did not observe a significant difference between anti-CD3 alone and SANA + anti-CD3, whereas a significant difference was detected between SANA alone and SANA + anti-CD3, consistent with our findings in the minor-mismatch model. Based on our findings (Figure 4; Figure S4E, SDC, <https://links.lww.com/TP/D291>), we conclude that, in both models and under the tested treatment conditions, anti-CD3 enhances the effect of SANA.

Thus, the mechanisms reported here support SANA as a pharmacological strategy that, in combination with other immunosuppressants, can generate active regulatory mechanisms for modulating the immune response.

DISCUSSION

Targeting emerging immunoregulatory pathways will help to continue improving immunomodulation in transplantation. Our previous work has shown that TMEM176B is an emerging immunoregulator that inhibits proinflammatory and immunogenic responses in mice and human myeloid immune cells.^{5-8,35} Thus, *Tmem176b*^{-/-} DCs fail to cross-present alloantigens necessary for generating donor-specific regulatory T lymphocytes.⁶ Furthermore, genetic deletion and pharmacological inhibition of TMEM176B triggers *in vivo* and *in vitro* NLRP3 inflammasome activation in CD11c^{high}CD11b⁺DCs.⁷ Conversely, by activating TMEM176B in primary human CD14⁺ monocytes with isoquercetin, we blocked SARS-CoV-2-induced inflammasome activation.⁸ In human autoimmune diseases, TMEM176B has been associated with therapy response.^{9,36}

Here, we showed that pharmacological activation of TMEM176B by SANA promotes immune responses aimed at protecting the graft. Interestingly, studies have reported that nitro-oleic acid activates transient receptor potential channels in primary sensory neurons.¹⁰ Nitroalkenes are endogenous electrophilic signaling mediators that are generated in the course of the normal inflammatory response and certain metabolic processes.³⁷ They arise from the reaction between derivatives of nitrogen dioxide and unsaturated fatty acids, forming electrophilic fatty acid nitroalkenes.³⁸ These compounds exhibit cytoprotective capabilities and potent anti-inflammatory effects.³⁸ Accordingly, nitroalkenes are clinically used in pathophysiological contexts where chronic inflammation is a component of the pathogenic process, including certain cardiovascular, metabolic, and respiratory diseases.^{39,40} We synthesized a nitroalkene derivative of salicylate, namely, SANA.¹¹ We have reported that SANA regulates inflammatory responses within the context of metabolic syndrome such as liver steatosis and insulin resistance.¹² Here, we show that SANA was able to activate TMEM176B ion-channel function and prolong graft survival in a *Tmem176b*^{-/-} dependent manner. Even though no baseline differences in allograft survival were observed between WT and *Tmem176b*^{-/-} mice (likely because of compensatory mechanisms), the pharmacological activation of this protein appears to engage regulatory pathways that ultimately enhance graft survival. We previously demonstrated that the activation or inhibition of TMEM176B modulates immunoregulatory mechanisms

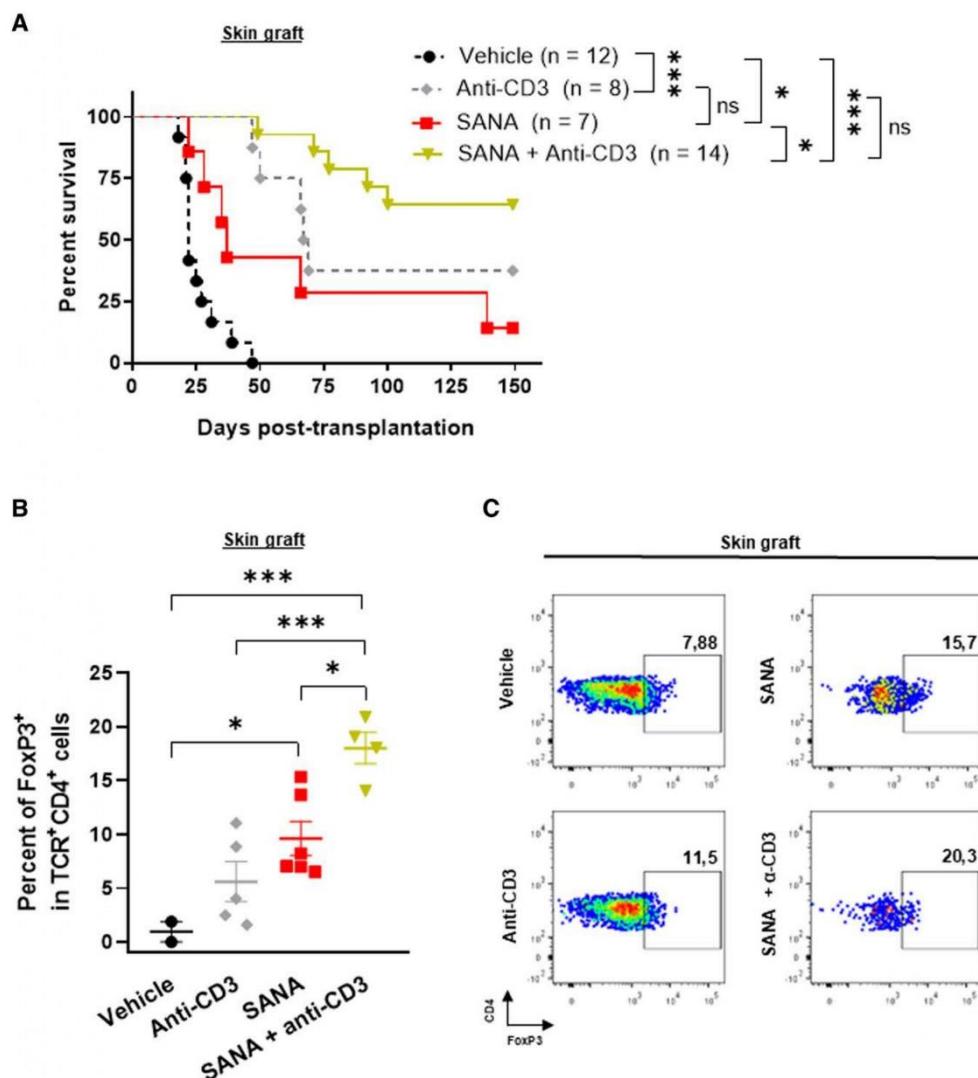


FIGURE 4. Anti-CD3 therapy improves SANA in prolonging allograft survival. A, C57BL/6 female mice were transplanted and treated with SANA as described in Figure 1. Anti-CD3 antibody (fragment antigen-binding [Fab] fragment) was injected i.p. (5 µg per animal) at days -1; 1; 3; 5 and 7. Log-rank Mantel-Cox test, *P ≤ 0.05, ***P ≤ 0.001. Two independent experiments were performed. The number of animals (n) in each group is indicated in the survival graph. B, The analysis of regulatory T-cell populations (TCR⁺CD4⁺FoxP3⁺) was conducted 15 d after treatment with SANA and anti-CD3 in the skin graft by flow cytometry. The values are shown as mean ± SEM of the FoxP3 values minus the value of the control isotype. One-way ANOVA test, *P ≤ 0.05, ***P ≤ 0.001. C, The panels display a representative dot plot showing the analyzed cell populations. CD3, cluster of differentiation 3; CD4, cluster of differentiation 4; FoxP3, Forkhead box P3; ns, not significant; SANA, 5-(2-nitroethyl) salicylic acid; TCR, T-cell receptor.

within the myeloid compartment.⁶⁻⁸ Here, we observed that SANA induces the production of HO-1 by CD11b^{high} CD11b⁺MHCII⁺ DCs within the skin graft, which is completely lost in *Tmem176b*^{-/-} mice. These results are in agreement with the fact that TMEM176B is preferentially expressed in CD11b⁺ DCs.²⁴ Moreover, we have shown

that another nitroalkene, the nitroalkene- α -tocopherol analogue induces HO-1 mRNA in THP-1-differentiated macrophages.⁴¹ From a mechanistic point of view, it has been shown that nitroalkenes activate the canonical nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and Kelch-like ECH-associated protein 1 pathway,⁴² which in turn induces

HO-1 expression among other cytoprotective phase-2 enzymes.⁴³⁻⁴⁷ The AKT/PI3K and mitogen-activated protein kinase pathways were reported to be involved in this activation.⁴⁸⁻⁵⁰ As far as TMEM176B is concerned, it has been reported that TMEM176B activates the AKT pathway and promote tumor growth in triple-negative breast cancer,⁵¹ while its homolog, transmembrane protein 176a, inhibits the ERK.⁵² Moreover, nitro fatty acids induce HO-1 expression through ERK activation.⁵³ Indeed, the phosphorylated AKT/AKT ratio increases significantly in WT BMDCs upon SANA treatment.

We observed that in vitro, SANA-triggered HO-1 expression partially depends on Tmem176b. SANA is a nitroalkene and, as such, participates in and/or modulates various molecular pathways. Like all nitroalkenes, SANA consists of a nitro group attached to a carbon-carbon double bond, making it a potent electrophile. This property allows nitroalkenes to form reversible adducts with thiols or nucleophilic amino acid residues, such as cysteines and histidines,⁵⁴ which themselves exhibit high reactivity. Consequently, nitroalkenes influence molecular pathways relevant to inflammatory processes. Specifically, they inhibit pro-inflammatory pathways such as nuclear factor kappa B and the NLRP3 inflammasome⁵⁵⁻⁵⁷ while activating anti-inflammatory, cytoprotective, and antioxidant pathways such as nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and Kelch-like ECH-associated protein 1,⁴² peroxisome proliferator-activated receptor gamma,⁵⁸ and heat shock factor-1.⁵⁹ SANA combines the properties of a nitroalkene with those of salicylic acid (or its deprotonated form, salicylate). Salicylic acid is known for its analgesic and anti-inflammatory effects, which primarily stem from the inhibition of cyclooxygenase enzymes involved in prostaglandin synthesis—key mediators of inflammation and pain in the nervous system and muscles.⁶⁰ Other mechanisms of action include inhibition of the pro-inflammatory NF-κB pathway at high doses,^{61,62} activation of 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase⁶³ and induction of macrophage polarization toward an M2 phenotype via HO-1.⁶⁴ These mechanisms may explain a redundant action of SANA, independent of Tmem176b activation.

Nonetheless, we highlight 3 biologically relevant in vivo aspects that depend on Tmem176b: prolonged allograft survival, the induction of HO-1 in intragraft CD11b⁺ DCs, and the generation of Treg induced by SANA but not by salicylate (which does not activate Tmem176b).

HO-1 has been associated with beneficial outcomes in inflammatory diseases or self-reactivity such as psoriasis,⁶⁵ inflammatory bowel disease,^{66,67} and airway inflammation among others.⁶⁸ We have also shown that HO-1 prevents the maturation of DCs, which retain the ability to produce interleukin-10²² and inhibits antigen presentation to T lymphocytes.⁶⁹ In the field of transplantation, HO-1 has been shown to suppress immune alloresponses leading to a greater graft survival. Some mechanisms that explain this property include the activation-induced cell death within alloreactive CD4 T cells,⁷⁰ the cytoprotective activity of products such as carbon monoxide and biliverdin,⁷¹ and the modulation of DCs to promote the generation of Treg.⁷² In agreement with the latter, the TMEM176B-HO-1 axis activated by SANA, promotes the generation of CD4-FoxP3⁺ T lymphocytes within the graft, enhancing its survival. SANA therapy increased the presence of CD4-FoxP3⁺ Treg within

the graft but not in the dLN. Along the same line, SANA-triggered HO-1 expression within DCs in the graft and not in the dLN. Thus, the proposed SANA/HO-1/Treg axis would be directly working in the graft and not in the dLN. However, we cannot rule out an effect of SANA on HO-1 expression and Treg modulation in the dLN at early time points after transplantation. The mechanisms described as well as the fact that SANA discontinuation is not associated with allograft rejection in the mouse skin model suggest that this therapy triggers active regulatory mechanisms that prolong allograft survival.

Anti-CD3 antibodies are known selectively deplete antigen-specific activated T lymphocytes, following the expansion and/or activation of Treg through a transforming growth factor beta-dependent mechanism.⁷³ Therefore, SANA with the anti-CD3 therapy emerges as a promising pharmacological strategy in the context of transplantation. Further studies should assess whether this therapeutic combination is worth considering in autoimmunity.^{32,33}

Collectively, our results underscore the role of the SANA-triggered TMEM176B-HO-1 axis to generate regulatory mechanisms to prolong allograft survival. Thus, tackling immunoregulatory critical players may be a way to contribute to designing therapeutic strategies to develop long-term tolerance/regulatory mechanisms. The immunoregulatory mechanisms triggered by SANA might also be relevant to treating autoimmune diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the following core facilities and technological platforms at the Institut Pasteur of Montevideo for their support and assistance in the present work: Animal Biotechnology Unit (UBAL) and the Cell Biology Unit (UBC).

REFERENCES

1. Lechner RI, Sykes M, Thomson AW, et al. Organ transplantation—how much of the promise has been realized? *Nat Med.* 2005;11:605-613.
2. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med.* 2004;351:2715-2729.
3. Cravedi P, Maggiore U, Molinari P, et al. Where are all the clinical trials for chronic rejection? *Transplantation.* 2025;109:411-417.
4. Diebold M, Mayer KA, Hidalgo L, et al. Chronic rejection after kidney transplantation. *Transplantation.* 2025;109:610-621.
5. Louvet C, Chiffolleau E, Heslan M, et al. Identification of a new member of the CD20/FceR1 β family overexpressed in tolerated allografts. *Am J Transplant.* 2005;5:2143-2153.
6. Segovia M, Louvet C, Charmet P, et al. Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation. *Am J Transplant.* 2014;14:1021-1031.
7. Segovia M, Russo S, Jeldres M, et al. Targeting TMEM176B enhances antitumor immunity and augments the efficacy of immune checkpoint blockers by unleashing inflammasome activation. *Cancer Cell.* 2019;35:767-781.e6.
8. Vega MD, Olvera D, Davanzo GG, et al. PD-1/PD-L1 blockade abrogates a dysfunctional innate-adaptive immune axis in critical β -coronavirus disease. *Sci Adv.* 2022;8:eaabn6545.
9. Wysocki T, Paradowska-Gorycka A. Pharmacogenomics of anti-TNF treatment response marks a new era of tailored rheumatoid arthritis therapy. *Int J Mol Sci.* 2022;23:2366.
10. Beckel JM, Groat WC de. The effect of the electrophilic fatty acid nitro-oleic acid on TRP channel function in sensory neurons. *Nitric Oxide Biol Chem.* 2018;78:154-160.
11. Bathyany C, López G, Escande C, et al. Methods of treatment of inflammation related conditions using pluripotent anti-inflammatory and metabolic modulators. U.S. PCT Patent; WO 2018/069907 A1. 2018.

12. Cal K, Leyva A, Rodríguez-Duarte J, et al. A nitroalkene derivative of salicylate alleviates diet-induced obesity by activating creatine metabolism and non-shivering thermogenesis. *Res Sq*. 2023;rs.3.rs-3101395.
13. Ltd EPP. A phase 1, randomized, double-blind, placebo-controlled, first in human study of the safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of single and multiple doses of MVD1 in healthy adult volunteers. 2022. Available at: <https://anzctr.org.au/Trial/Registration/TrialReview.aspx?id=384635&lsReview=true>.
14. Kessler Iglesias C, Bloom JE, Xiao X, et al. Early use of aspirin for coronary allograft prophylaxis in heart transplant recipients. *Transplantation*. 2025;109:346–351.
15. Wilde VD, Rompeay NV, Hill M, et al. Endotoxin-induced myeloid-derived suppressor cells inhibit alloimmune responses via heme oxygenase-1. *Am J Transplant*. 2009;9:2034–2047.
16. Schwoebel F, Barsig J, Wendel A, et al. Quantitative assessment of mouse skin transplant rejection using digital photography. *Lab Anim*. 2005;39:209–214.
17. Braudeau C, Bouchet D, Tesson L, et al. Induction of long-term cardiac allograft survival by heme oxygenase-1 gene transfer. *Gene Ther*. 2004;11:701–710.
18. Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1969;57:225–229.
19. Carvalho PC, Lima DB, Leprevost FV, et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat Protoc*. 2016;11:102–117.
20. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method. *Methods (San Diego, Calif)*. 2001;25:402–408.
21. Chauveau C, Boucher D, Roussel JC, et al. Gene transfer of heme oxygenase-1 and carbon monoxide delivery inhibit chronic rejection. *Am J Transplant*. 2002;2:581–592.
22. Chauveau C, Rémy S, Royer PJ, et al. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood*. 2005;106:1694–1702.
23. Rémy S, Blancou P, Tesson L, et al. Carbon monoxide inhibits TLR-induced dendritic cell immunogenicity. *J Immunol*. 2009;182:1877–1884.
24. Condamine T, Le Texier L, Howie D, et al. Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2010;88:507–515.
25. Li S, Zhang P, Li A, et al. TIGIT-Fc prolongs corneal allograft survival in mice by upregulating TIGIT/CD226 expression and the proportion of Helios+Foxp3+ Treg cells. *Transplantation*. 2023;107:372–381.
26. Yamashita K, Ollinger R, McDaid J, et al. Heme oxygenase-1 is essential for and promotes tolerance to transplanted organs. *FASEB J*. 2006;20:776–778.
27. Epiphaniou S, Mikolajczak SA, Gonçalves LA, et al. Heme oxygenase-1 is an anti-inflammatory host factor that promotes murine plasmodium liver infection. *Cell Host Microbe*. 2008;3:331–338.
28. Bonnell MR, Visner GA, Zander DS, et al. Heme-oxygenase-1 expression correlates with severity of acute cellular rejection in lung transplantation. *J Am Coll Surg*. 2004;198:945–952.
29. Wegiel B, Larsen R, Galli D, et al. Macrophages sense and kill bacteria through carbon monoxide-dependent inflammasome activation. *J Clin Invest*. 2014;124:4926–4940.
30. Baas M, Oh AB, Gonçalves T, et al. TGF β -dependent expression of PD-1 and PD-L1 controls CD8+ T cell anergy in transplant tolerance. *Elife*. 2016;5:e08133.
31. Plain KM, Chen J, Merten S, et al. Induction of specific tolerance to allografts in rats by therapy with non-mitogenic, non-depleting ANTI-CD3 monoclonal antibody: association with TH2 cytokines not anergy. *Transplantation*. 1999;67:605–613.
32. Chatenoud L, Bluestone JA. CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:622–632.
33. Kuhn C, Weiner HL. Therapeutic anti-CD3 monoclonal antibodies: from bench to bedside. *Immunotherapy*. 2016;8:889–906.
34. Tesar BM, Zhang J, Li Q, et al. TH1 immune responses to fully MHC mismatched allografts are diminished in the absence of MyD88, a Toll-like receptor signal adaptor protein. *Am J Transplant*. 2004;4:1429–1439.
35. Victoria S, Castro A, Pittini A, et al. Formulating a TMEM176B blocker in chitosan nanoparticles uncouples its paradoxical roles in innate and adaptive antitumoral immunity. *Int J Biol Macromol*. 2024;279:135327.
36. Comabella M, Lünenmann JD, Rio J, et al. A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain*. 2009;132(Pt 12):3353–3365.
37. Fazzari M, Woodcock SR, Rowart P, et al. Endogenous generation of nitro-fatty acid hybrids having dual nitrate ester (RONO2) and nitroalkene (RNO2) substituents. *Redox Biol*. 2021;41:101913.
38. Grippo V, Mojovic M, Pavcevic A, et al. Electrophilic characteristics and aqueous behavior of fatty acid nitroalkenes. *Redox Biol*. 2021;38:101756.
39. Rudolph TK, Ravekes T, Klinke A, et al. Nitrated fatty acids suppress angiotensin II-mediated fibrotic remodelling and atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2016;109:174–184.
40. Schopfer FJ, Vitturi DA, Jorkasky DK, et al. Nitro-fatty acids: new drug candidates for chronic inflammatory and fibrotic diseases. *Nitric Oxide*. 2018;79:31–37.
41. Rodriguez-Duarte J, Gallissi G, Dapueto R, et al. A novel nitroalkene- α -tocopherol analogue inhibits inflammation and ameliorates atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Br J Pharmacol*. 2019;176:757–772.
42. Kansanen E, Bonacci G, Schopfer FJ, et al. Electrophilic nitro-fatty acids activate NRF2 by a KEAP1 cysteine 151-independent mechanism. *J Biol Chem*. 2011;286:14019–14027.
43. Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*. 2004;10:549–557.
44. Mitsuishi Y, Motohashi H, Yamamoto M. The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Front Oncol*. 2012;2:200.
45. Balogun E, Hoque M, Gong P, et al. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J*. 2003;371(Pt 3):887–895.
46. Wright MM, Schopfer FJ, Baker PRS, et al. Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: nitrolinoleic acid potently activates endothelial haem oxygenase 1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:4299–4304.
47. Wright MM, Kim J, Hock TD, et al. Human haem oxygenase-1 induction by nitro-linoleic acid is mediated by cAMP, AP-1 and E-box response element interactions. *Biochem J*. 2009;422:353–361.
48. Martin D, Rojo Al, Salinas M, et al. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J Biol Chem*. 2004;279:8919–8929.
49. Salinas M, Wang J, Sagarra MRD, et al. Protein kinase Akt/PKB phosphorylates heme oxygenase-1 in vitro and in vivo. *FEBS Lett*. 2004;578:90–94.
50. Kim KC, Kang KA, Zhang R, et al. Up-regulation of Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression by eckol, a phlorotannin compound, through activation of Erk and PI3K/Akt. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42:297–305.
51. Kang C, Rostoker R, Ben-Shumel S, et al. Tmem176b regulates AKT/mTOR signaling and tumor growth in triple-negative breast cancer. *Cells*. 2021;10:3430.
52. Li H, Zhang M, Linghu E, et al. Epigenetic silencing of TMEM176A activates ERK signaling in human hepatocellular carcinoma. *Clin Epigenetics*. 2018;10:137.
53. Illes KE, Wright MM, Cole MP, et al. Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: nitrolinoleic acid mediates protective effects through regulation of the ERK pathway. *Free Radic Biol Med*. 2009;46:866–875.
54. Baththyany C, Schopfer FJ, Baker PRS, et al. Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. *J Biol Chem*. 2006;281:20450–20463.
55. Dapueto R, Rodriguez-Duarte J, Gallissi G, et al. A novel nitroalkene vitamin E analogue inhibits the NLRP3 inflammasome and protects against inflammation and glucose intolerance triggered by obesity. *Redox Biol*. 2021;39:101833.
56. He Y, Varadarajan S, Muñoz-Planillo R, et al. 3,4-Methylenedioxy- β -nitrostyrene inhibits NLRP3 inflammasome activation by blocking assembly of the inflammasome. *J Biol Chem*. 2014;289:1142–1150.
57. Villacorta L, Chang L, Salvatore SR, et al. Electrophilic nitro-fatty acids inhibit vascular inflammation by disrupting LPS-dependent TLR4 signalling in lipid rafts. *Cardiovasc Res*. 2013;98:116–124.
58. Waku T, Shiraki T, Oyama T, et al. Structural insight into PPAR γ activation through covalent modification with endogenous fatty acids. *J Mol Biol*. 2009;385:188–199.
59. Akagi R, Kubo T, Hatori Y, et al. Heme oxygenase-1 induction by heat shock in rat hepatoma cell line is regulated by the coordinated function of HSF1, NRP2 and BACH1. *J Biochem (Tokyo)*. 2021;170:501–510.
60. Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med*. 1998;104:8S–8S; discussion 21S.
61. Kopf E, Ghosh S. Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin. *Science*. 1994;265:956–959.

62. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β . *Nature*. 1998;396:77–80.
63. Hawley SA, Fullerton MD, Ross FA, et al. The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase. *Science*. 2012;336:918–922.
64. Choi HE, Jeon EJ, Kim DY, et al. Sodium salicylate induces browning of white adipocytes via M2 macrophage polarization by HO-1 upregulation. *Eur J Pharmacol*. 2022;928:175085.
65. Campbell NK, Fitzgerald HK, Malaria A, et al. Naturally derived heme-oxygenase 1 inducers attenuate inflammatory responses in human dendritic cells and T cells: relevance for psoriasis treatment. *Sci Rep*. 2018;8:10287.
66. Takagi T, Naito Y, Mizushima K, et al. Heme oxygenase-1 prevents murine intestinal inflammation. *J Clin Biochem Nutr*. 2018;63:169–174.
67. Paul G, Bataille F, Obermeier F, et al. Analysis of intestinal haem-oxygenase-1 (HO-1) in clinical and experimental colitis. *Clin Exp Immunol*. 2005;140:547–555.
68. Espinoza JA, León MA, Céspedes PF, et al. Heme oxygenase-1 modulates human respiratory syncytial virus replication and lung pathogenesis during infection. *J Immunol*. 2017;199:212–223.
69. Tardif V, Riquelme SA, Remy S, et al. Carbon monoxide decreases endosome-lysosome fusion and inhibits soluble antigen presentation by dendritic cells to T cells. *Eur J Immunol*. 2013;43:2832–2844.
70. Mcdaid J, Yamashita K, Chora A, et al. Heme oxygenase-1 modulates the allo-immune response by promoting activation-induced cell death of T cells. *FASEB J*. 2005;19:458–460.
71. Tang LM, Wang YP, Wang K, et al. Exogenous biliverdin ameliorates ischemia-reperfusion injury in small-for-size rat liver grafts. *Transplant Proc*. 2007;39:1338–1344.
72. Blancou P, Anegon IE. Heme oxygenase-1 and dendritic cells: what else? *J Leukoc Biol*. 2010;87:185–187.
73. You S, Leforban B, Garcia C, et al. Adaptive TGF- β -dependent regulatory T cells control autoimmune diabetes and are a privileged target of anti-CD3 antibody treatment. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104:6335–6340.

Anexo 2: Tablas de listas de proteínas del análisis proteómico de macrófagos THP-1 tratados con SANA (Figura 2.7A)

Lista de proteínas significativas más abundantes identificadas en células tratadas con SANA

Protein Index	Locus	Replicate Count	Total Signal	SANA 1	SANA 2	SANA 3	Description
198	P17066	3	83	29	32	22	Heat shock 70 kDa protein 6 OS=Homo sapiens GN=HSPA6 PE=1 SV=2
442	P09601	3	34	15	11	8	Heme oxygenase 1 OS=Homo sapiens GN=HMOX1 PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: B1AHA8
1413	Q9UQ35	3	21	7	7	7	Serine/arginine repetitive matrix protein 2 OS=Homo sapiens GN=SRRM2 PE=1 SV=2
1089	P08240	3	16	7	5	4	Signal recognition particle receptor subunit alpha OS=Homo sapiens GN=SRPR PE=1 SV=2
873	P02511	3	14	3	4	7	Alpha-crystallin B chain OS=Homo sapiens GN=CRYAB PE=1 SV=2; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: E9PR44, A0A024R3B9, E9PNH7, HOYCW8
1020	Q6IN85	3	14	4	7	3	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A OS=Homo sapiens GN=SMEK1 PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: G3V5Z3, HOYIY8
1467	P04062	3	13	6	5	2	Glucosylceramidase OS=Homo sapiens GN=GBA PE=1 SV=3
1091	P23368	3	12	2	5	5	NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ME2 PE=1 SV=1
1695	H0Y3U8	3	12	5	4	3	Chitinase-3-like protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CHI3L1 PE=3 SV=1
1509	Q99653	3	11	4	5	2	Calcineurin B homologous protein 1 OS=Homo sapiens GN=CHP1 PE=1 SV=3; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: HOYNG9, F5GX29, HOYKE7, HOYLY7
2098	P26572	3	11	4	3	4	Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase OS=Homo sapiens GN=MGAT1 PE=2 SV=2
389	Q03252	3	10	4	3	3	Lamin-B2 OS=Homo sapiens GN=LMNB2 PE=1 SV=3; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: J9JID7
1248	P15309	3	10	4	3	3	Prostatic acid phosphatase OS=Homo sapiens GN=ACPP PE=1 SV=3

1854	Q9Y4B 6	3	10	4	4	2	Protein VPRBP OS=Homo sapiens GN=VPRBP PE=1 SV=3
1873	P2209 0	3	10	5	3	2	40S ribosomal protein S4, Y isoform 1 OS=Homo sapiens GN=RPS4Y1 PE=1 SV=2
739	Q1350 1	3	9	4	3	2	Sequestosome-1 OS=Homo sapiens GN=SQSTM1 PE=1 SV=1
1865	Q8WY P5	3	9	2	4	3	Protein ELYS OS=Homo sapiens GN=AHCTF1 PE=1 SV=3
2291	O6030 6	3	9	3	4	2	Intron-binding protein aquarius OS=Homo sapiens GN=AQR PE=1 SV=4
189	Q9H0 B6	3	8	4	2	2	Kinesin light chain 2 OS=Homo sapiens GN=KLC2 PE=1 SV=1
1505	Q0178 0	3	8	3	3	2	Exosome component 10 OS=Homo sapiens GN=EXOSC10 PE=1 SV=2
1546	Q2TAL 8	3	8	3	2	3	Glutamine-rich protein 1 OS=Homo sapiens GN=QRICH1 PE=1 SV=1
2303	Q6P1J 9	3	8	3	3	2	Parafibromin OS=Homo sapiens GN=CDC73 PE=1 SV=1
2476	Q9BPZ 3	3	8	2	3	3	Polyadenylate-binding protein- interacting protein 2 OS=Homo sapiens GN=PAIP2 PE=1 SV=1
396	Q9276 9	3	7	2	3	2	Histone deacetylase 2 OS=Homo sapiens GN=HDAC2 PE=1 SV=2
							Uncharacterized protein OS=Homo sapiens PE=4 SV=1;
490	A0A09 6LP26	3	7	2	2	3	Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: A8MWX3, A8K0Z3, Q6VEQ5, A0A096LP75, C4AMC7, Q9NQA3
1860	P0823 6	3	7	3	2	2	Beta-glucuronidase OS=Homo sapiens GN=GUSB PE=1 SV=2
2293	Q9UJY 4	3	7	3	2	2	ADP-ribosylation factor-binding protein GGA2 OS=Homo sapiens GN=GGA2 PE=1 SV=3
2455	P2205 9	3	7	3	2	2	Oxysterol-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=OSBP PE=1 SV=1
1412	P0962 2	3	6	2	2	2	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=DLD PE=1 SV=2; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: E9PEX6
1754	P0510 7	2	38	18	20		Integrin beta-2 OS=Homo sapiens GN=ITGB2 PE=1 SV=2
1724	A0A08 7X2D8	2	21	10	11		C-Jun-amino-terminal kinase- interacting protein 4 OS=Homo sapiens GN=SPAG9 PE=1 SV=1
227	Q9292 2	2	16	7	9		SWI/SNF complex subunit SMARCC1 OS=Homo sapiens GN=SMARCC1 PE=1 SV=3
2292	P0670 2	2	10	4	6		Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1
722	Q9UQ 16	2	9	3	6		Dynamin-3 OS=Homo sapiens GN=DNM3 PE=1 SV=4
1602	P0628 0	2	9	7	2		Alpha-galactosidase A OS=Homo sapiens GN=GLA PE=1 SV=1
2469	Q96PK 6	2	9	5	4		RNA-binding protein 14 OS=Homo sapiens GN=RBM14 PE=1 SV=2

234	Q9UKN8	2	8	4	4	General transcription factor 3C polypeptide 4 OS=Homo sapiens GN=GTF3C4 PE=1 SV=2
1606	Q9H488	2	8	5	3	GDP-fucose protein O-fucosyltransferase 1 OS=Homo sapiens GN=POFUT1 PE=1 SV=1
1864	Q9P2I0	2	8	3	5	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2 OS=Homo sapiens GN=CPSF2 PE=1 SV=2
1511	P60891	2	8		2	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1 OS=Homo sapiens GN=PRPS1 PE=1 SV=2
835	Q15582	2	7	3	4	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 OS=Homo sapiens GN=TGFBI PE=1 SV=1
905	Q5JRA6	2	7	5		Melanoma inhibitory activity protein 3 OS=Homo sapiens GN=MIA3 PE=1 SV=1
919	P51571	2	7	3		Translocon-associated protein subunit delta OS=Homo sapiens GN=SSR4 PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: A6NLM8
1578	Q8WUA2	2	7	3	4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 4 OS=Homo sapiens GN=PPIL4 PE=1 SV=1
1858	Q9HAT2	2	7	5	2	Sialate O-acetylesterase OS=Homo sapiens GN=SIAE PE=1 SV=1
2276	Q14562	2	7	4	3	ATP-dependent RNA helicase DHX8 OS=Homo sapiens GN=DHX8 PE=1 SV=1

Lista de proteínas significativas más abundantes identificadas en células tratadas con vehículo

Protein Index	Locus	Replicate Count	Total Signal	Ctrl 1	Ctrl 2	Ctrl 3	Description
2141	Q96CW5	3	12	6	3	3	Gamma-tubulin complex component 3 OS=Homo sapiens GN=TUBGCP3 PE=1 SV=2
542	P29466	3	11	4	5	2	Caspase-1 OS=Homo sapiens GN=CASP1 PE=1 SV=1
1837	Q8TDP1	3	11	3	4	4	Ribonuclease H2 subunit C OS=Homo sapiens GN=RNASEH2C PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: E9PN81, HOYEF3
1659	Q9Y5K8	3	10	3	5	2	V-type proton ATPase subunit D OS=Homo sapiens GN=ATP6V1D PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: G3V2S6, HOYJH8, G3V2V6
1665	Q8N573	3	10	3	4	3	Oxidation resistance protein 1 OS=Homo sapiens GN=OXR1 PE=1 SV=2; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: HOYC07
968	Q9NZQ3	3	9	4	2	3	NCK-interacting protein with SH3 domain OS=Homo sapiens

								GN=NCKIPSD PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: C9JSC3
1338	Q9NRX4	3	9	4	2	3		14 kDa phosphohistidine phosphatase OS=Homo sapiens GN=PHPT1 PE=1 SV=1
1660	Q9NZD8	3	9	4	2	3		Maspardin OS=Homo sapiens GN=SPG21 PE=1 SV=1
2361	Q8WWM7	3	9	4	3	2		Ataxin-2-like protein OS=Homo sapiens GN=ATXN2L PE=1 SV=2
544	Q96FS4	3	8	3	2	3		Signal-induced proliferation-associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=SIPA1 PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: F6RY50
972	Q5SW79	3	8	3	2	3		Centrosomal protein of 170 kDa OS=Homo sapiens GN=CEP170 PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: H0Y2V6
1793	Q6NYC8	3	8	4	2	2		Phostensin OS=Homo sapiens GN=PPP1R18 PE=1 SV=1
2347	Q13131	3	8	4	2	2		5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=PRKAA1 PE=1 SV=4
533	P53990	3	7	3	2	2		IST1 homolog OS=Homo sapiens GN=IST1 PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: H3BUI0, H3BMU1, H3BQF7, F5GXM3
548	A6NC98	3	7	3	2	2		Coiled-coil domain-containing protein 88B OS=Homo sapiens GN=CCDC88B PE=1 SV=1
1661	Q9BQ67	3	7	3	2	2		Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=GRWD1 PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: M0QX71
1043	Q9NRF8	3	6	2	2	2		CTP synthase 2 OS=Homo sapiens GN=CTPS2 PE=1 SV=1
1669	Q9Y3C8	3	6	2	2	2		Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1 OS=Homo sapiens GN=UFC1 PE=1 SV=3
1670	Q13637	3	6	2	2	2		Ras-related protein Rab-32 OS=Homo sapiens GN=RAB32 PE=1 SV=3
2045	Q9Y5K6	3	6	2	2	2		CD2-associated protein OS=Homo sapiens GN=CD2AP PE=1 SV=1
57	P35580	2	27	15		12		Myosin-10 OS=Homo sapiens GN=MYH10 PE=1 SV=3
1253	F8W8D8	2	19		10	9		Plastin-3 OS=Homo sapiens GN=PLS3 PE=1 SV=1
1343	Q8TE82	2	7		2	5		SH3 domain and tetratricopeptide repeat-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=SH3TC1 PE=1 SV=3
1976	Q9NVZ3	2	7	5		2		Adaptin ear-binding coat-associated protein 2 OS=Homo sapiens GN=NECAP2 PE=1 SV=1
1926	Q53EL6	2	7	4	3			Programmed cell death protein 4 OS=Homo sapiens GN=PDCD4 PE=1 SV=2
532	H0YHG0	2	6	4		2		Uncharacterized protein (Fragment) OS=Homo sapiens PE=4

							SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: P82979
543	Q06187	2	6	3	3		Tyrosine-protein kinase BTK OS=Homo sapiens GN=BTK PE=1 SV=3; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: U3NG26, Q5JY90
1350	Q00688	2	6	3	3		Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3 OS=Homo sapiens GN=FKBP3 PE=1 SV=1
1351	P49247	2	6		2	4	Ribose-5-phosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=RPIA PE=1 SV=3
779	P12236	2	6	2	4		ADP/ATP translocase 3 OS=Homo sapiens GN=SLC25A6 PE=1 SV=4
1354	Q9BV57	2	6	3	3		1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase OS=Homo sapiens GN=ADI1 PE=1 SV=1
1360	Q92734	2	6	3	3		Protein TFG OS=Homo sapiens GN=TFG PE=1 SV=2
1674	Q9Y277	2	6	2	4		Voltage-dependent anion-selective channel protein 3 OS=Homo sapiens GN=VDAC3 PE=1 SV=1
2264	Q9UJ83	2	6	3	3		2-hydroxyacyl-CoA lyase 1 OS=Homo sapiens GN=HACL1 PE=1 SV=2
539	O95848	2	5	2		3	Uridine diphosphate glucose pyrophosphatase OS=Homo sapiens GN=NUDT14 PE=1 SV=2
569	P22087	2	5	2		3	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin OS=Homo sapiens GN=FBL PE=1 SV=2; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: M0R2Q4, M0QXL5, M0R299, M0ROP1, M0R2B0, M0R1H0, M0R2U2
967	Q12972	2	5		2	3	Nuclear inhibitor of protein phosphatase 1 OS=Homo sapiens GN=PPP1R8 PE=1 SV=2; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: A0AOA0MT09
975	O15305	2	5	3		2	Phosphomannomutase 2 OS=Homo sapiens GN=PMM2 PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: H3BV55, H3BPH4
1007	Q9BUL8	2	5		3	2	Programmed cell death protein 10 OS=Homo sapiens GN=PDCD10 PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: C9J363
1339	Q96EK9	2	5		3	2	Protein KTI12 homolog OS=Homo sapiens GN=KTI12 PE=1 SV=1
1348	H0YGL6	2	5		3	2	Ras-related protein Rab-6A (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RAB6A PE=1 SV=1
1755	P49356	2	5		2	3	Protein farnesyltransferase subunit beta OS=Homo sapiens GN=FNTB PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: B4DL54

1779	Q96Q15	2	5		2	3	Serine/threonine-protein kinase SMG1 OS=Homo sapiens GN=SMG1 PE=1 SV=3; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: J3KRA9
2246	O00273	2	5	2		3	DNA fragmentation factor subunit alpha OS=Homo sapiens GN=DFFA PE=1 SV=1
981	Q96C11	2	5	3	2		FGGY carbohydrate kinase domain-containing protein OS=Homo sapiens GN=FGGY PE=1 SV=2; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: F2Z2V1
986	P55039	2	5	3	2		Developmentally-regulated GTP-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=DRG2 PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: A8MZF9, J3QKW7, J3QRI9, J3QR71
1681	Q9Y520	2	5	3	2		Protein PRRC2C OS=Homo sapiens GN=PRRC2C PE=1 SV=4; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: E7EPN9, H7C5N8
527	Q9Y4A5	2	4		2	2	Transformation/transcription domain-associated protein OS=Homo sapiens GN=TRRAP PE=1 SV=3; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: F2Z2U4
528	O14745	2	4	2		2	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 OS=Homo sapiens GN=SLC9A3R1 PE=1 SV=4; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: J3QRP6
545	H7BZ14	2	4	2		2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PPIL3 PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: Q9H2H8, B8ZZ77
974	Q7L591	2	4	2		2	Docking protein 3 OS=Homo sapiens GN=DOK3 PE=1 SV=2; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: D6RAM3
977	Q96EPO	2	4	2		2	E3 ubiquitin-protein ligase RNF31 OS=Homo sapiens GN=RNF31 PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: H0YM13
978	Q9H7E9	2	4	2		2	UPF0488 protein C8orf33 OS=Homo sapiens GN=C8orf33 PE=1 SV=1
1341	O95671	2	4		2	2	N-acetylserotonin O-methyltransferase-like protein OS=Homo sapiens GN=ASMTL PE=1 SV=3
1349	Q92889	2	4	2		2	DNA repair endonuclease XPF OS=Homo sapiens GN=ERCC4 PE=1 SV=3
1664	A0MZ66	2	4		2	2	Shootin-1 OS=Homo sapiens GN=KIAA1598 PE=1 SV=4
1667	Q96II5	2	4		2	2	ARAF protein OS=Homo sapiens GN=ARAF PE=2 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: P10398

2046	Q9HAU5	2	4	2	2	Regulator of nonsense transcripts 2 OS=Homo sapiens GN=UPF2 PE=1 SV=1
2143	P51151	2	4	2	2	Ras-related protein Rab-9A OS=Homo sapiens GN=RAB9A PE=1 SV=1
568	P33897	2	4	2	2	ATP-binding cassette sub-family D member 1 OS=Homo sapiens GN=ABCD1 PE=1 SV=2; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: H0Y7L9
990	Q5T6J7	2	4	2	2	Probable gluconokinase OS=Homo sapiens GN=IDNK PE=2 SV=1
991	Q5JSP0	2	4	2	2	FYVE, RhoGEF and PH domain- containing protein 3 OS=Homo sapiens GN=FGD3 PE=1 SV=1
1366	P55735	2	4	2	2	Protein SEC13 homolog OS=Homo sapiens GN=SEC13 PE=1 SV=3; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: A8MXL6
1684	Q14165	2	4	2	2	Malectin OS=Homo sapiens GN=MLEC PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: F5H1S8
1930	Q9BZV1	2	4	2	2	UBX domain-containing protein 6 OS=Homo sapiens GN=UBXN6 PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: K7EP32
2121	Q7Z6I6	2	4	2	2	Rho GTPase-activating protein 30 OS=Homo sapiens GN=ARHGAP30 PE=1 SV=3; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: A0A0A0MRJ8
2124	Q9H4A3	2	4	2	2	Serine/threonine-protein kinase WNK1 OS=Homo sapiens GN=WNK1 PE=1 SV=2; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: F5GWT4, F6UYGO
2193	Q9NPP4	2	4	2	2	NLR family CARD domain- containing protein 4 OS=Homo sapiens GN=NLRC4 PE=1 SV=2
2350	Q96JH7	2	4	2	2	Deubiquitinating protein VCIP135 OS=Homo sapiens GN=VCPIP1 PE=1 SV=2
2377	Q0VDF9	2	4	2	2	Heat shock 70 kDa protein 14 OS=Homo sapiens GN=HSPA14 PE=1 SV=1

Lista de proteínas diferenciales significativas en ambas condiciones

Locus	Fold Change	pValue	Signal (Ctrl)	Signal (SANA)	Description
P15090	5.3908046	0.00095864	29	156.333333	Fatty acid-binding protein, adipocyte OS=Homo sapiens GN=FABP4 PE=1 SV=3
P08107	5.01265823	0.00017219	26.3333333	132	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=5; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: contaminant_GR78_HUMAN, contaminant_GR78_KLULA
Q14669	3.73333333	0.04073181	2.5	9.33333333	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12 OS=Homo sapiens GN=TRIP12 PE=1 SV=1
P13674	2.88888889	0.00289228	3	8.66666667	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=P4HA1 PE=1 SV=2
Q14956	2.83333333	0.03349609	3	8.5	Transmembrane glycoprotein NMB OS=Homo sapiens GN=GPNMB PE=1 SV=2
Q8NI27	2.8	0.00622418	2.5	7	THO complex subunit 2 OS=Homo sapiens GN=THOC2 PE=1 SV=2
Q02880	2.66666667	0.02005603	2.5	6.66666667	DNA topoisomerase 2-beta OS=Homo sapiens GN=TOP2B PE=1 SV=3; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: E9PCY5
Q9P2E9	2.375	0.00885215	2.66666667	6.33333333	Ribosome-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=RRBP1 PE=1 SV=4; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: A0A0A0MRV0, A0A087WVV2, F8W7S5
Q8N20_1	2.375	0.0348579	2.66666667	6.33333333	Integrator complex subunit 1 OS=Homo sapiens GN=INTS1 PE=1 SV=2
Q15459	2.35294118	0.02467719	5.66666667	13.3333333	Splicing factor 3A subunit 1 OS=Homo sapiens GN=SF3A1 PE=1 SV=1
Q14839	2.35	0.00097784	6.66666667	15.6666667	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4 OS=Homo sapiens GN=CHD4 PE=1 SV=2; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: F5GWX5, K7EMY3
O75396	2.33333333	0.00633234	3	7	Vesicle-trafficking protein SEC22b OS=Homo sapiens GN=SEC22B PE=1 SV=4
P16278	2.33333333	0.02668136	3	7	Beta-galactosidase OS=Homo sapiens GN=GLB1 PE=1 SV=2
H3BP20	2.25	0.01534727	4	9	Beta-hexosaminidase OS=Homo sapiens GN=HEXA PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: P06865, H3BS10
P25685	2.18181818	0.001445	3.66666667	8	DnaJ homolog subfamily B member 1 OS=Homo sapiens GN=DNAJB1 PE=1 SV=4
Q92598	2.13333333	0.01113494	15	32	Heat shock protein 105 kDa OS=Homo sapiens GN=HSPH1 PE=1 SV=1
P34931	2.12	0.00692758	16.6666667	35.3333333	Heat shock 70 kDa protein 1-like OS=Homo sapiens GN=HSPA1L PE=1 SV=2
P10809	2.10569106	0.01086896	41	86.3333333	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2

Q8IV08	2.05882353	0.00010976	5.66666667	11.6666667	Phospholipase D3 OS=Homo sapiens GN=PLD3 PE=1 SV=1
P14314	2.05	0.0103062	6.66666667	13.6666667	Glucosidase 2 subunit beta OS=Homo sapiens GN=PRKCSH PE=1 SV=2; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: K7ELL7
Q9Y266	2	0.00001	2	4	Nuclear migration protein nudC OS=Homo sapiens GN=NUDC PE=1 SV=1
Q12996	1.93333333	0.00572346	5	9.66666667	Cleavage stimulation factor subunit 3 OS=Homo sapiens GN=CSTF3 PE=1 SV=1
P16435	1.85714286	0.00483948	7	13	NADPH--cytochrome P450 reductase OS=Homo sapiens GN=POR PE=1 SV=2
Q8TC07	1.83333333	0.00374522	2	3.66666667	TBC1 domain family member 15 OS=Homo sapiens GN=TBC1D15 PE=1 SV=2
P12109	1.7804878	0.00100936	13.6666667	24.3333333	Collagen alpha-1(VI) chain OS=Homo sapiens GN=COL6A1 PE=1 SV=3; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: A0A087X0S5
O75369	1.69565217	0.00153047	15.3333333	26	Filamin-B OS=Homo sapiens GN=FLNB PE=1 SV=2
Q09161	1.65217391	0.00128513	7.66666667	12.6666667	Nuclear cap-binding protein subunit 1 OS=Homo sapiens GN=NCBP1 PE=1 SV=1
O75534	1.63636364	0.00109606	3.66666667	6	Cold shock domain-containing protein E1 OS=Homo sapiens GN=CSDE1 PE=1 SV=2; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: E9PLT0
Q9H0E2	1.5	0.00001	2	3	Toll-interacting protein OS=Homo sapiens GN=TOLLIP PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: F2Z2Y8
H0YI09	1.5	0.00001	2	3	Methyltransferase-like protein 7A (Fragment) OS=Homo sapiens GN=METTL7A PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: Q9H8H3, F8VQX6
P16298	1.5	0.00001	2	3	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit beta isoform OS=Homo sapiens GN=PPP3CB PE=1 SV=2
H0Y8X4	1.14285714	0.00001	7	8	2'-deoxyribonucleoside 5'-phosphate N-hydrolase 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DNPH1 PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: O43598
Q8WZA9	-1.16666667	0.00001	7	6	Immunity-related GTPase family Q protein OS=Homo sapiens GN=IRGQ PE=1 SV=1
O14920	-1.33333333	0.00001	4	3	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta OS=Homo sapiens GN=IKBKB PE=1 SV=1
O43237	-1.5	0.00001	3	2	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2 OS=Homo sapiens GN=DYNC1LI2 PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: J3KRI4
Q9BVK6	-1.5	0.00001	3	2	Transmembrane emp24 domain-containing protein 9 OS=Homo sapiens GN=TMED9 PE=1 SV=2
Q13867	-1.5	0.00001	3	2	Bleomycin hydrolase OS=Homo sapiens GN=BLMH PE=1 SV=1; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: K7ES02, J3KSD8, K7ESE8

Q12797	-1.5	0.00001	3	2	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase OS=Homo sapiens GN=ASPH PE=1 SV=3
P22102	-1.90909091	0.00082064	14	7.33333333	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3 OS=Homo sapiens GN=GART PE=1 SV=1
P13807	-2.25	0.00338007	4.5	2	Glycogen [starch] synthase, muscle OS=Homo sapiens GN=GYS1 PE=1 SV=2
P17931	-2.27272727	0.01004605	8.33333333	3.66666667	Galectin-3 OS=Homo sapiens GN=LGALS3 PE=1 SV=5; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: G3V3R6
Q9NQR4	-2.33333333	0.02668136	7	3	Omega-amidase NIT2 OS=Homo sapiens GN=NIT2 PE=1 SV=1
Q9BXS5	-2.4	0.01313549	8	3.33333333	AP-1 complex subunit mu-1 OS=Homo sapiens GN=AP1M1 PE=1 SV=3; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: E7ENJ6, K7EJL1
Q92835	-2.57894737	0.00470558	16.33333333	6.33333333	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1 OS=Homo sapiens GN=INPP5D PE=1 SV=2; Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: A0A0A0MTP6
P0CG39	-2.74074074	0.01521282	24.66666667	9	POTE ankyrin domain family member J OS=Homo sapiens GN=POTEJ PE=3 SV=1