



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR fcien.edu.uy



Universidad de la República

Facultad de Ciencias

PEDECIBA Biología-Biología Celular y Molecular

Tesis de Doctorado

Rol de SIRT6 en la respuesta inflamatoria, aspectos regulatorios y su relación con la inflamación crónica asociada a obesidad

Msc. Mariana Bresque

**Laboratorio de Patologías del Metabolismo y el Envejecimiento,
Institut Pasteur Montevideo.**

Tutor: Dr. Carlos Escande

Tribunal: Dra. Patricia Cassina (Presidente), Dra. Natalia Lago y Dr. Gustavo Bonacci (Vocales).

Montevideo, Septiembre
2021

Resumen

La familia de las Sirtuinas, enzimas desacilasas NAD⁺ dependientes, han sido descritas como reguladores claves de múltiples procesos biológicos, implicadas en el mantenimiento de la homeostasis de los organismos. Participan en diversos procesos tales como la resistencia al estrés, estabilidad genómica, metabolismo energético, envejecimiento y tumorigénesis. Dado su rol en el mantenimiento de la homeostasis, déficits o alteraciones en las mismas han sido vinculadas a varias enfermedades.

Dentro de esta familia, SIRT6, una sirtuina nuclear en estrecha comunicación con la cromatina, ha despertado creciente interés tanto en el área metabólica como en el área inflamatoria. Los primeros estudios en modelos de ratones knock out (KO) genéricos para SIRT6, muestran que su ausencia genera ratones que no logran alcanzar el mes de vida, desarrollando linfopenia, envejecimiento prematuro e hipoglucemia. Las investigaciones en modelos murinos SIRT6 KO específicos en adipocitos, macrófagos y células B pancreáticas, muestran una mayor sensibilidad a los efectos inducidos por una dieta rica en grasas HFD (del inglés, High Fat Diet). En contraposición, se ha visto que la sobreexpresión de SIRT6 en ratones incrementa el tiempo de vida, mejora la tolerancia a la glucosa y atenúa la inflamación del tejido adiposo. Respecto a la relación de SIRT6 con la inflamación, se ha propuesto que la enzima mediante su actividad deacilasa sobre su sustrato Ac. H3K9 participa en la inhibición de la señalización mediada por NFκB y c-JUN. Así, silencia la señalización de estos dos factores de transcripción, mostrando un rol anti-inflamatorio. Adicionalmente, SIRT6, tiene una función pro-inflamatoria en la regulación de TNFα, participando en la regulación de su síntesis así como en su secreción.

Persisten al día de hoy, evidencias aparentemente contradictorias respecto a la función de esta Sirtuina que oscilan entre un rol anti-inflamatorio y otro pro-inflamatorio, así como un papel benéfico o perjudicial en los procesos de inflamación crónica que ocurren en la obesidad. Frente a estas dicotomías, y en vista de que no hay una respuesta clara sobre cuál es el rol de SIRT6 en procesos inflamatorios agudos y crónicos, nuestro objetivo consistió en evaluar su participación en las dos situaciones antes mencionadas.

Iniciamos nuestros estudios analizando el rol de SIRT6 en la respuesta inflamatoria aguda generada tras un estímulo pro-inflamatorio ampliamente conocido, el lipopolisacárido de pared de bacterias gram negativas (LPS). Para ello utilizamos abordajes en cultivos celulares mediante los que pudimos determinar que SIRT6 es regulada temprana y post-traduccionalmente durante la primera fase de la respuesta inflamatoria aguda. Por medio de esta regulación, ocurre un cambio temprano en la estabilidad de SIRT6 y una localización de la enzima en compartimentos citoplasmáticos, enriqueciéndose a nivel del retículo endoplasmático (RE). Es allí, donde se sintetiza el TNFα, producto de la cascada de señalización que se desencadena en respuesta a LPS y donde SIRT6 ejerce su actividad desmiristoilasa, con la cual la enzima es capaz de orquestar, qué cantidad de TNFα será destinado a la degradación lisosomal y cuánto será secretado. Al ser inhibida tempranamente, la secreción de TNFα baja significativamente en respuesta a LPS. En

concordancia con estos resultados, mediante abordajes *in vivo*, pudimos confirmar que la inhibición específica de SIRT6, disminuye también la secreción de TNF α en las células del peritoneo en respuesta al LPS. Consecuentemente, la supervivencia de ratones expuestos a LPS es modestamente mayor en aquellos ratones que recibieron el inhibidor de SIRT6. Todos estos resultados, posicionan a SIRT6 participando dentro de la cascada de activaciones tempranas que ocurren a nivel pro-inflamatorio, con una participación activa y clave para el desarrollo de una respuesta inflamatoria completa y resolutive.

Más adelante, nos propusimos evaluar la importancia de SIRT6 en un modelo de inflamación crónica inducida por obesidad y para ello generamos un modelo de ratones inducibles con macrófagos KO para SIRT6, mediante la utilización de la tecnología FLOX-iCre. En este modelo, realizamos una primera evaluación de los efectos de la ausencia de SIRT6 en macrófagos durante la inflamación crónica, encontrando una disminución de la inflamación sistémica, así como la secreción de TNF α . Como consecuencia de estos cambios, estos ratones presentaron una protección contra la hiperglucemia generada por la obesidad, lo cual sugiere una función pro-inflamatoria de SIRT6 en contextos de inflamación crónica.

Finalmente, en adición a este trabajo, estudiamos la regulación y posible modulación de la actividad enzimática de SIRT6 en respuesta a la utilización de compuestos de probada acción anti-inflamatoria, los nitrolípidos. Pudimos así, determinar que esta enzima es capaz de ser modulada *in vitro* por el NO₂OA, y más aún, también modifica su actividad deacilasa sobre su sustrato Ac. H3K9 en células HEK293FT que sobreexpresan SIRT6. Como perspectiva, este activador podría convertirse en un buen candidato para evaluar las consecuencias de su activación en los modelos de inflamación previamente mencionados, así como en otros modelos donde la activación de la enzima posee efectos beneficiosos para el organismo.

Los resultados de esta tesis son relevantes en el área immuno-metabólica, y posicionan a SIRT6 como un participante nuevo, activo y funcional en la respuesta inflamatoria crónica y aguda. Este hecho, realza su importancia como blanco molecular para futuras intervenciones y pone de manifiesto la importancia de la actividad deacilasa de estas enzimas y su capacidad de participar en diferentes niveles de regulación, orquestando respuestas importantes a nivel celular.

Dedico este trabajo a todas las mujeres de mi clan, que no tuvieron la libertad de elegir lo que querían ser y que se brindaron por completo al bienestar de los otros, gracias por su entrega y amor, para Ustedes todo mi reconocimiento.

Índice

Resumen.....	2
Dedicatoria.....	4
Índice.....	5
Abreviaturas.....	6
Índice de figuras.....	8
Agradecimientos.....	10
Introducción.....	12
Antecedentes generales	12
Antecedentes específicos.....	35
Hipótesis de trabajo,Objetivo General y Específicos.....	44
Materiales y métodos.....	45
Capítulo I: Resultados primera parte.....	60
Manuscrito 1.....	82
Capítulo II.....	97
Manuscrito 2	98
Discusión.....	102
Conclusiones y perspectivas.....	117
Referencias bibliográficas.....	120

Abreviaturas (por orden alfabético)

AAM macrófagos residentes del tejido de tipo M2 anti-inflamatorios o alternativamente activados (del inglés, alternative activated macrophages)
ALT Alanina aminotransferasa
AP1 proteína de activación 1
APC células presentadoras de Antígeno (del inglés, Antigen Presenting Cells)
AR Artritis Reumatoidea
BER mecanismo de reparación del ADN por escisión de base (del inglés, base excision repair)
BMDM macrófagos de médula ósea (del inglés Bone Marrow Derived Macrophages)
CAM macrófagos de tipo M1 pro-inflamatorios o clásicamente activados (del inglés classically activated macrophages)
CD14 antígeno CD propio del sistema inmune (del inglés, cluster of differentiation)
CEUA Comisión de Ética en el Uso de Animales
CRE Creatinina
CREB1 proteína de unión al elemento de respuesta del cAMP1 (del inglés, cAMP responsive element binding protein 1)
DAMPs patrones moleculares asociados al daño (del inglés, Damage Associated Molecular Patterns)
DMEM medio de cultivo (del inglés, Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO Dimetilsulfóxido
DSBs mecanismo de reparación del ADN por corte de doble hebra (del inglés, Double Strand Break)
ELISA ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
FC fracción citosólica
FEV fracción estromal vascular
FFAs ácidos grasos libres (del inglés, Free Fatty Acids)
FN fracción nuclear
GMFI Media Geométrica de la Intensidad de Fluorescencia
HFD dieta rica en grasas (del inglés High Fat Diet)
HIF1 α factor de hipoxia (del inglés, Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha)
HR mecanismo de reparación del ADN por recombinación homóloga (del inglés, homologous recombination)
HSP chaperonas o proteínas de choque térmico (del inglés, Heat shock protein)
IA Inmunidad adaptativa
IF Inmunofluorescencia
II Inmunidad innata
IKKi proteínas relacionadas con las IKK quinasas
IPMON Institut Pasteur de Montevideo
IRAK1 e IRAK4 quinasas asociadas al receptor L1 (del inglés, IL1 receptor associated kinase)
IRF3 factor de respuesta al interferón 3 (del inglés, interferon regulatory factor 3)
K, Lisina
KO del inglés, knock out
LB Linfocitos B
LBP proteína de unión al LPS (del inglés, LPS binding protein)
LES Lupus Eritematoso Sistémico
LPS Lipopolisacárido de pared de bacterias Gramnegativas
LT Linfocitos T
MD2 proteína homóloga a MD1 de Drosophila (del inglés, myeloid differentiation protein 2)
MEF Fibroblastos embrionarios de ratón (del inglés, Mouse Embryonic Fibroblast)

MHC complejo de histocompatibilidad mayor (del inglés, Major Histocompatibility Complex)
MyD88 proteína de respuesta mieloide (del inglés, myeloid differentiation primary-response protein 88)
ND dieta estándar (del inglés, Normal Diet)
NEMO modificador esencial de NFkB o también llamado IKK γ (del inglés NFkB esencial modifier)
NFkB factor nuclear kB
NHEJ mecanismo de reparación del DNA por unión de extremos no homólogos (del inglés, nonhomologous joining)
NK células inmunes llamadas Natural Killer
OE objetivos específicos
ON toda la noche (del inglés, over night)
PAMPs patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés, Pathogen Associated Molecular Patterns)
PFA Paraformaldehído
PRRs receptores de reconocimiento de patrón (del inglés, Pattern Recognition Receptors)
qPCR reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RE Reticulo Endoplasmático
RI Respuesta Inflamatoria
RIP-1 proteína de interacción con el receptor 1 (del inglés, receptor interacting protein 1)
SARM proteína de soporte (del inglés, sterile α -and armadillo-motif containing protein)
SASP fenotipo secretor asociado a senescencia (del inglés, Secretory Associated Senescent Phenotype)
SBF suero fetal bovino
SBN sobrenadante
SEM error estándar de la media
SI Sistema Inmune
SMOC centro organizador supramolecular (del inglés, Supramolecular Organizing Center)
SUMO modificación post-traducciona (del inglés, small ubiquitin -like modifier)
TA Tejido Adiposo
TAB1 y TAB2 proteínas de unión (del inglés, TAK1 binding proteins 1 y 2)
TACE enzima que cliva el TNF α (del inglés, Tumor Necrosis factor α converting enzyme)
TAK1 quinasa activada por TGF β (del inglés, TGF β activated kinase 1)
TBK1 quinasa de unión a NFkB miembro de la familia de receptores asociados al TNF (del inglés, TRAF family member-associated NFkB activator binding kinase 1)
TIR receptores de IL-1 (del inglés, Toll/IL1 Receptor Domain)
TIRAP o MAL proteína adaptadora (del inglés, TIR domain-containing adaptor protein)
TLR receptores del tipo Toll (del inglés, Toll Like Receptors)
TLR4 receptor de tipo Toll 4 (del inglés, Toll Like Receptor 4)
TNF α Factor de Necrosis Tumoral α (del inglés, Tumor Necrosis Factor α)
TRAF6 miembro de la familia de receptores asociados al TNF (del inglés, TNF associated receptor)
TRAM proteína adaptadora (del inglés, TRIF related adaptor molecule)
TRIF proteína adaptadora (del inglés, TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN β)
UBAL Unidad de Biotecnología en Animales de Laboratorio del IPMON
WB Western blot
WD dieta rica en grasa y azúcares (del inglés, Western Diet)

Figuras

Figura 1. Funciones y características de células involucradas en la Inmunidad Innata.

Figura 2. Ejemplos de PAMPs y DAMPs y los TLRs que los reconocen.

Figura 3. Estructura de los TLRs.

Figura 4: Transducción de señales por las vías MYD88 dependiente o independiente.

Figura 5. Genes blanco de NFkB involucrados en el inicio y progresión de la inflamación.

Figura 6. Rondas de Hematopoyesis y surgimiento de macrófagos.

Figura 7. Modalidades de señalización y consecuencias biológicas de la activación de los receptores de TNF α .

Figura 8. Rutas inflamatorias implicadas en el desarrollo de la resistencia a la insulina.

Figura 9. Resumen de las características estructurales, enzimáticas, localización, blancos moleculares y función de las Sirtuinas.

Figura 10. Estructura de SIRT6 Humana.

Tabla I. Anticuerpos, origen y diluciones utilizadas para WB o IF.

Tabla II. Parámetros medidos para determinar la eutanasia del animal.

Tabla III. Secuencia de cebadores o primers humanos y murinos utilizados en esta tesis.

Figura 11. SIRT6 se estabiliza rápidamente en respuesta a LPS en macrófagos Raw 264.7.

Figura 12. Los fibroblastos MEF se comportan como en los macrófagos en respuesta a LPS.

Figura 13. LPS y MG132 no tienen un efecto sinérgico en macrófagos Raw 264.7 ni en fibroblastos MEF.

Figura 14. SIRT6 en respuesta a LPS aparece en el citoplasma y se enriquece en el RE en macrófagos Raw 264.7.

Figura 15. La actividad de SIRT6 a nivel nuclear disminuye en macrófagos Raw 264.7 en respuesta a LPS.

Figura 16. La inhibición temprana de SIRT6 en macrófagos Raw 264.7 disminuye la secreción de TNF α en respuesta a LPS.

Figura 17. Las células del peritoneo post inyección de LPS recapitulan los experimentos in vitro.

Figura 18. Los macrófagos residentes del peritoneo en un modelo de inflamación aguda recapitulan los experimentos in vitro.

Figura 19. La inhibición de SIRT6 in vivo disminuye la secreción de TNF α y aumenta la sobrevida frente a una inyección letal de LPS.

Figura 20. El incremento de SIRT6 en los fibroblastos IMR90 con sobreexpresión de RAS acompaña la mayor expresión y presencia de NF κ B en el núcleo.

Figura 21. El análisis del promotor de SIRT6 presenta secuencias consenso reconocidas por NF κ B y las mismas están enriquecidas en análisis de Chip-Seq para p65.

Figura 22. Los parámetros metabólicos e inflamatorios de ratones sometidos a dietas ND y WD se acompañan de incrementos de expresión de SIRT6 en la FEV.

Figura 23. La población de macrófagos del tejido adiposo presenta una mayor intensidad de SIRT6 en los ratones que fueron sometidos a WD.

Figura 24. Los macrófagos diferenciados de Médula Ósea escinden SIRT6 en respuesta al 4-OH-Tamoxifeno.

Figura 25. Los macrófagos CD19⁺CD11b⁺F4/80^{hi} del peritoneo de ratones Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁺ tratados con Tamoxifeno presenta una menor intensidad de SIRT6.

Figura 26. Los parámetros fisiológicos de leucocitos en sangre, glucosa y peso son iguales en ratones Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁺ y sus controles Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁻ alimentados con ND.

Figura 27. Los parámetros metabólicos e inflamatorios de ratones Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁺ en WD revierten los efectos de la dieta.

Agradecimientos

En primer lugar, a Carlos Escande, orientador de este trabajo, por su confianza en mí para realizar el mismo y que pese a sus mil altibajos y vicisitudes, terminó confluyendo en lo que a continuación presentaré. A Carlos le agradezco profundamente su paciencia y trabajo para hacerme comprender conceptos y técnicas que estaban muy alejadas de mis capacidades cuando recién arranque, sin experiencia en muchas de las metodologías desarrolladas a lo largo de este trabajo. Agradezco además las oportunidades de crecimiento, las colaboraciones y las responsabilidades, que me forjaron como científica, como persona y me obligaron a desafiarme constantemente. Gracias por acompañarme en este largo trecho.

También agradezco a la CAS y al tribunal de la tesis, que con su visión externa realizaron aportes valiosos para consolidar y darle cierre al trabajo, así como para realizar mejoras en la tesis escrita.

A mis compañeros de laboratorio: Natalia, Pia, Paola, Jonathan, Leonardo, Laura, Alejandro, Rodrigo, Lucia, Adriana, Maria, Aldo, Karina, Cecilia, Jorge, Rosina, Valentina, Santiago, Andres y algunos itinerantes, de los que he aprendido mucho y que hicieron que la ciencia se disfrute más. En especial al escuadrón de rescate, que surgió enmarcado en “Mariana tiene que terminar su tesis”, y me dieron mucho más que el impulso que necesitaba para este último tirón. Laura con su ayuda en todos los experimentos de cultivo, Karina con su ayuda en todo lo concerniente al manejo de animales, Aldo con su colaboración con los fraccionamientos, Paola y Cecilia con su ayuda con los experimentos con el Inhibidor, Valentina con la maratónica inclusión de la citometría, Jorge con los Elis y Leonardo con blots. Gracias!

Al resto de los compañeros del Instituto, que hacen de este último un lindo lugar para trabajar y están en diferentes espacios para compartir los buenos y los malos resultados. A los que con sus consejos calman y ayudan, mis agradecimientos. A los miembros de la salita, con los que casi somos un laboratorio solo y siempre tienen eso que te falta. A todo el personal del Instituto que con su trabajo nos hacen la vida más fácil.

Un agradecimiento especial a los compañeros de Cienfuegos, que me llenaron la “panza” y me cuidaron durante todo este tiempo. Agradezco sobre todo los momentos en que funcionaron como un desahogo y un escape.

Agradecimiento especial para Pia y Lucia, las cuales tuve el placer de co-tutorear y me enseñaron mucho más de lo que yo les enseñé a ellas.

A mi familia, que están siempre para apoyarme, en todas y cada una de las aventuras en las que me embarco. Gracias por escucharme cuando preparo cosas y por traerme una comidita calentita o darme ese abrazo que necesito.

A mis amigos, que me impulsan y se creen que soy eso que ellos consideran “científico”, que me escuchan y me cuidan. A los de siempre y a los ocasionales, a los que veo mucho y a los que veo poco, a los científicos y los no, todos me escucharon en algún trance del doctorado. Gracias por estar ahí.

A los que colaboraron de alguna forma con el trabajo: grupo de Bioquímica de Facultad de Medicina dirigido por Dra. Celia Quijano, en especial a Inés Marmisolle, grupo de Fisiología de Facultad de Medicina, Dras. Paola Contreras y Cecilia Villaseca, grupo de Fisicoquímica Biológica dirigido por la Dra. Ana Denicola, en especial a Mara Carreño, Dra. Luisa Berna, GMH, LIRI, UBAL, BVDF, muchas gracias!

A Mati, gracias por ser mi bastón y por hacer todo lo que soñamos sea posible. Por escucharme, aconsejarme, ser el mejor dos del mundo.

Finalmente, también agradecer a las agencias financiadoras. En primer lugar, a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y a la Comisión Académica de Posgrados (CAP) por apoyarme económicamente durante el desarrollo de este trabajo mediante la Beca de Doctorado y la Beca de Finalización de Posgrados, respectivamente. También agradecer a EOLO PHARMA que me apoyó económicamente en este último tramo.

Al Instituto por toda la infraestructura y las facilidades, la contención, apoyo y cuidado.

A todos ustedes, y a mí también, muchas gracias.

Introducción

Antecedentes Generales

El objeto de estudio de este trabajo se centra en el análisis de una Sirtuina particular, la Sirtuina 6, en la respuesta inflamatoria. Hemos estudiado su comportamiento en la respuesta inflamatoria aguda y en contextos de inflamación crónica, como lo es la obesidad inducida por dieta. En ambas situaciones evaluamos la relación de esta sirtuina con los niveles de una citoquina crucial en la respuesta inmune, el TNF α . En la introducción de este trabajo de doctorado, primero abordaremos al Sistema Inmune, y algunos de sus componentes relevantes para nuestros estudios, para luego ahondar en las Sirtuinas, haciendo énfasis en SIRT6 y sus vínculos con la inmunidad y obesidad.

Sistema Inmune

El ambiente que nos rodea en términos biológicos, está compuesto por una amplia variedad de microorganismos patogénicos y no patogénicos, los cuales desafían constantemente al **Sistema Inmune (SI)** de los organismos vivos¹. Este último, está constituido por una red de células, tejidos, órganos y proteínas dispersas por el organismo y es el encargado de protegernos de agentes patógenos tales como virus, bacterias, parásitos, etc. A su vez, participa activamente de la remoción de células muertas y dañadas de nuestro organismo. Este sistema nos permite mantenernos sanos y su generación temprana en términos evolutivos, ha sido crucial para la sobrevivencia de múltiples organismos pluricelulares².

Su funcionamiento permite que una vez que un agente infeccioso es detectado, se arme rápidamente una **Respuesta Inflamatoria (RI)**, cuyo objetivo será destruir al agente patógeno. Para ello, el sistema cuenta con mecanismos de detección que se especializan en el reconocimiento de agentes foráneos, tóxicos o estructuras alergénicas y que se clasifican de la siguiente forma: *i) mecanismos genéricos programados y codificados por genes de la línea germinal del hospedero*, capaces de reconocer patrones moleculares compartidos por toxinas y microorganismos patógenos, y por otro lado, *ii) respuestas codificadas por reordenamientos de elementos genéticos somáticos* que generan moléculas antigénicas específicas capaces de reconocer estructuras únicas de agentes foráneos¹.

El primer set de respuestas frente al agente foráneo es montado por **Inmunidad Innata (II)**, este sistema actúa rápidamente luego de que el patógeno o toxina es encontrada y constituye la respuesta inicial del hospedero. El segundo set de respuestas, se le atribuye a la **Inmunidad Adaptativa (IA)**, compuesta por un pequeño grupo de células con especificidad por determinado patógeno, toxina o

alergénico. Estas, deben proliferar luego del encuentro con el antígeno, de forma de alcanzar un número suficiente para montar una respuesta efectiva contra el agente foráneo. Si bien estos dos sistemas de defensa del hospedero siempre se presentan como independientes, en general actúan juntos, siendo la **II** la primera línea de defensa, para luego dar lugar a la **IA**, que se vuelve predominante días después. Ambos sistemas son capaces de complementarse con las acciones del otro, así el sistema innato contribuye a la activación de las células antígeno específicas, mientras que el sistema adaptativo amplifica su respuesta reclutando mecanismos efectores innatos. A pesar de que sus mecanismos de acción son diferentes, su sinergia, cooperación y complementación son esenciales para una respuesta inmune completamente efectiva¹. A continuación, profundizaremos en las características generales de cada uno de estos sistemas.

Generalidades de la Inmunidad Innata

La **inmunidad innata** ha surgido más tempranamente (con los metazoos) y ha sido más conservada evolutivamente con el objetivo biológico de generar una rápida respuesta al agente foráneo². Su principal rol ejerciendo el control de la infección ocurre de inmediato o dentro de las primeras horas posteriores al encuentro con el patógeno y el mecanismo efector utilizado dependerá del tipo de patógeno que haya iniciado la respuesta inmune^{3,4}. A pesar de la variabilidad en la respuesta, todos los mecanismos de defensa incluidos en ella son codificados por genes de la línea germinal, como ya hemos mencionado. La expresión de sus mecanismos efectores está restringida a algunos tipos celulares y todos los individuos dentro de una misma especie comparten un mismo repertorio de inmunidad innata⁵.

Este sistema cuenta con **4 tipos de barreras defensivas no específicas** que incluyen: las **barreras físicas**, formadas por capas de células epiteliales, capas de mucosa que recubren los epitelios respiratorios, gastrointestinales y genitourinarios, y epitelios ciliados, que barren la capa mucosa permitiendo su renovación. Las **barreras fisiológicas**, incluyen la temperatura corporal, el bajo pH del estómago, proteínas solubles y pequeñas moléculas bioactivas de los fluidos biológicos o producidas por células activadas (ejemplos; proteínas del complemento, defensinas, ficolinas, citoquinas, quimioquinas, mediadores lipídicos, radicales libres, aminos bioactivos y enzimas). Las **barreras fagocíticas o endocíticas**, cuyos componentes son varios tipos celulares que internalizan y rompen macromoléculas foráneas, así como células especializadas en esta función (monocitos, neutrófilos, macrófagos). La última barrera defensiva, es la **barrera inflamatoria**, o la respuesta llamada **Respuesta Inflamatoria Aguda**, en la cual profundizaremos más adelante⁴.

La inmunidad innata tiene una **respuesta patógeno-dependiente**, y basa su capacidad de clasificación en la presencia de diferentes receptores de membrana y proteínas citoplasmáticas que reconocen **patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)**, por su sigla en inglés). Estos incluyen componentes exclusivos

de los microorganismos patógenos no presentes en mamíferos que pueden ser reconocidos intra y extracelularmente. Ejemplos de PAMPs que permiten detectar la presencia de un patógeno son: el ARN bicatenario de virus, las secuencias de ADN CpG no metiladas de bacterias, la flagelina de las bacterias, *LPS*, el ácido lipoteicoico de bacterias gram+, los oligosacáridos ricos en manosa, entre otros. Por otro lado, la inmunidad innata es también capaz de reconocer las sustancias endógenas producidas como consecuencia del daño celular y a estos se los conoce como **patrones moleculares asociados a la lesión (DAMPs)**, por su sigla en inglés). Estos últimos, pueden producirse como resultado del daño celular causado por infecciones y surgen como la consecuencia metabólica de la infección o inflamación, pero también pueden indicar una lesión estéril. Ejemplos de DAMPs son las alarminas, las chaperonas o proteínas de choque térmico (HSP, del inglés Heat shock protein), ácido úrico, entre otras⁶. Para finalizar, existe una tercera estrategia de reconocimiento de los receptores de la II, mediante el cual, las células saludables pueden enviar señales inhibitorias que evitan la activación de la respuesta inmune. Este tipo de mensajes son muy importantes para evitar y limitar el daño generado por las células efectoras del SI⁷.

El sistema inmunitario innato es capaz de reconocer PAMPs y DAMPs en una gran variedad de células, mediante receptores celulares que se denominan **receptores para el reconocimiento del patrón (PRRs)**, por su sigla en inglés). Estos receptores son codificados por la línea germinal en un número limitado, algunos son constitutivamente activos y otros se expresan en respuesta a interacciones con los patógenos. Cuando estos PRRs se unen a PAMPs o DAMPs, activan la transducción de señales que promueven las funciones antimicrobianas y pro-inflamatorias. La expresión de los PRRs en diferentes compartimentos celulares y la presencia de moléculas solubles en el espacio extracelular aseguran que el sistema inmunitario innato pueda responder a patógenos, donde sea que estos se encuentren.

Las **células que participan en la II** tienen diferentes orígenes. Aquellas cuyo origen es hematopoyético incluyen: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (fagocitos), mastocitos, basófilos, eosinófilos, entre otras. Los fagocitos no solo fagocitan los patógenos, sino que además logran matarlos por diferentes vías y producen las citoquinas para señalizar la respuesta. Este grupo es el que expresa la mayor cantidad y variedad de PRRs y presentan una función crítica para el desarrollo de la respuesta inflamatoria completa, ya que mediante su interacción o presentación de antígenos a los linfocitos T, activan la inmunidad adaptativa. También participan de la II algunos linfocitos, como los *linfocitos T*, las células *Natural Killer (NK)* y células de origen no hematopoyético, como células de la piel y células epiteliales de los tractos respiratorio, gastrointestinal y genito-urinario³. En la Figura 1, se presentan las características y funciones de algunas células de la Inmunidad Innata.

Acompañando a todos estos participantes, el sistema innato también cuenta con **componentes humorales** que incluyen a las proteínas del complemento, proteínas de unión a LPS, proteína C-reactiva, pentaxiales, colectinas, péptidos antimicrobianos

y defensinas, entre otras. Estas proteínas circulantes están involucradas tanto en detectar los microorganismos patógenos, así como en los mecanismos efectores que facilitan la limpieza del proceso inflamatorio⁸. El sistema de complemento funciona para identificar y marcar (u opsonizar) bacterias y otros patógenos, haciéndolos susceptibles a la fagocitosis. La función fagocítica de la **II** promueve la limpieza de células muertas, complejos de anticuerpos, así como sustancias foráneas presentes en órganos, tejidos, sangre y linfa. Esto además, colabora con la comunicación con la **IA** mediante la movilización y activación de las **células presentadoras de antígenos (APCs, del inglés Antigen Presenting Cells)**.

Cell	Image	% in adults	Nucleus	Functions	Lifetime	Main targets
Macrophage*		Varies	Varies	- Phagocytosis - Antigen presentation to T cells	Months – years	Various
Neutrophil		40-75%	Multi-lobed	- Phagocytosis - Degranulation (discharge of contents of a cell)	6 hours – few days	- Bacteria - Fungi
Eosinophil		1-6%	Bi-lobed	- Degranulation - Release of enzymes, growth factors, cytokines	8-12 days (circulate for 4-5 hours)	- Parasites - Various allergic tissues
Basophil		< 1%	Bi- or tri-lobed	- Degranulation - Release of histamine, enzymes, cytokines	Lifetime uncertain; likely a few hours – few days	Various allergic tissues
Lymphocytes (T cells)		20-40%	Deeply staining, eccentric	- T helper (Th) cells (CD4+): immune response mediators - Cytotoxic T cells (CD8+): cell destruction	Weeks to years	- Th cells: intracellular bacteria - Cytotoxic T cells: virus infected and tumour cells - Natural killer cells: virus-infected and tumour cells
Monocyte		2-6%	Kidney shaped	Differentiate into macrophages and dendritic cells to elicit an immune response	Hours – days	Various

Figura 1. Funciones y características de células involucradas en la Inmunidad Innata. En el cuadro se muestra la morfología de cada célula innata, así como su porcentaje en la sangre de individuos adultos, morfología nuclear, funciones, tiempo de vida y cuáles son los principales agentes foráneos que las activan⁴. Figura tomada de Marshall *et al.*, 2018.

Generalidades de la Inmunidad Adaptativa

La **inmunidad adaptativa** surgió evolutivamente más tarde que la innata, permitiendo a los vertebrados sobrevivir a la continua reexposición de patógenos a lo largo de la vida². Muestra una gran especificidad en el reconocimiento de antígenos y es capaz de generar efectores inmunológicos patógeno-específicos que viven durante mucho tiempo y persisten en un estado latente, siendo capaces de expresar su función efectora frente a un nuevo encuentro con su antígeno específico. Este reconocimiento se conoce como **memoria inmunológica** y permite responder con mayor efectividad frente a exposiciones repetidas del mismo agente externo. La **IA** no es inmediata, existiendo un periodo de tiempo entre la presencia del antígeno y su respuesta máxima, la cual llegará días después del encuentro con el antígeno, e implica la expansión clonal de aquellas células que son específicas para su destrucción y reconocimiento^{4,8}.

Su mecanismo de acción se basa en la especificidad receptor-antígeno y los receptores son expresados en las superficies de unas células muy importantes en esta respuesta: los **linfocitos B y T (LT y LB)**. Las especies que presentan **IA**, tienen **LT y LB** con un gran repertorio de receptores de antígenos y anticuerpos. Esta diversidad se genera somáticamente a través de recombinación de sitio específica, generando diferentes clones de linfocitos con distintas especificidades⁵. Los receptores de las células B y T difieren en su mecanismo para reconocer los antígenos, a grandes rasgos los LT antígeno específicos son activados para su proliferación por las células APC y los LB, se diferencian en células plasmáticas para producir anticuerpos. Cada linfocito expresa un receptor con una especificidad antigénica única⁵.

Presentados los LB y LT, los cuales tienen un rol importante en la inmunidad adaptativa y permiten el desarrollo de una correcta respuesta inflamatoria, nos enfocaremos en la comprensión más profunda de algunos aspectos y células de la inmunidad innata, que ya hemos abordado y consideramos importantes profundizar en el marco de este trabajo.

Componentes específicos del sistema inmune Innato:

Receptores del tipo Toll

El sistema inmune innato es mediado por un grupo de PRRs, los cuales inducen la activación de vías intracelulares de transducción de señales que confluyen en la expresión de genes inflamatorios de la respuesta inmediata y a largo plazo. Dentro de los PRRs, los **receptores del tipo Toll (TLRs)** se expresan en muchos tipos celulares y reconocen productos de una amplia variedad de microorganismos patógenos, así como moléculas secretadas o liberadas por células estresadas o en proceso de muerte^{9,10}. El receptor Toll, fue inicialmente identificado como una proteína codificada por el gen “*toll*” de *Drosophila*, el cual es esencial para la defensa innata contra las infecciones de hongos en moscas adultas¹⁰. Actualmente, se conocen 10 TLRs en humanos y 13 TLRs en ratones, siendo los TLR del 1 al 9 conservados entre ambas especies. El TLR 10 murino no es funcional por una inserción retroviral y los TLR 11,12 y 13 no están presentes en el genoma humano¹²⁻¹⁴.

Los TLR pueden encontrarse principalmente en macrófagos y células dendríticas, pero también se expresan en neutrófilos, eosinófilos, células NK, mastocitos, células epiteliales, queratinocitos, así como en algunas células T y B del sistema inmune adaptativo¹⁴⁻¹⁶. Su ubicación subcelular puede ser en la membrana citoplasmática como en membranas intracelulares endosomales, lo cual lleva a categorizarlos en dos subgrupos. Los **TLR 1, 2, 4, 5, 6 y 11** se expresan en la **superficie celular**, donde reconocen moléculas encontradas en el exterior del patógeno. Por su parte, los **TLR 3, 7, 8 y 9** se expresan en compartimentos intracelulares, como el RE, lisosomas y endosomas (**TLR endosomales**), donde generalmente se unen a estructuras

únicamente accesibles luego de la captura y destrucción del patógeno¹³. En la parte superior de la Figura 2, se esquematizan los diferentes PAMPs y DAMPs reconocidos por los distintos TLRs.

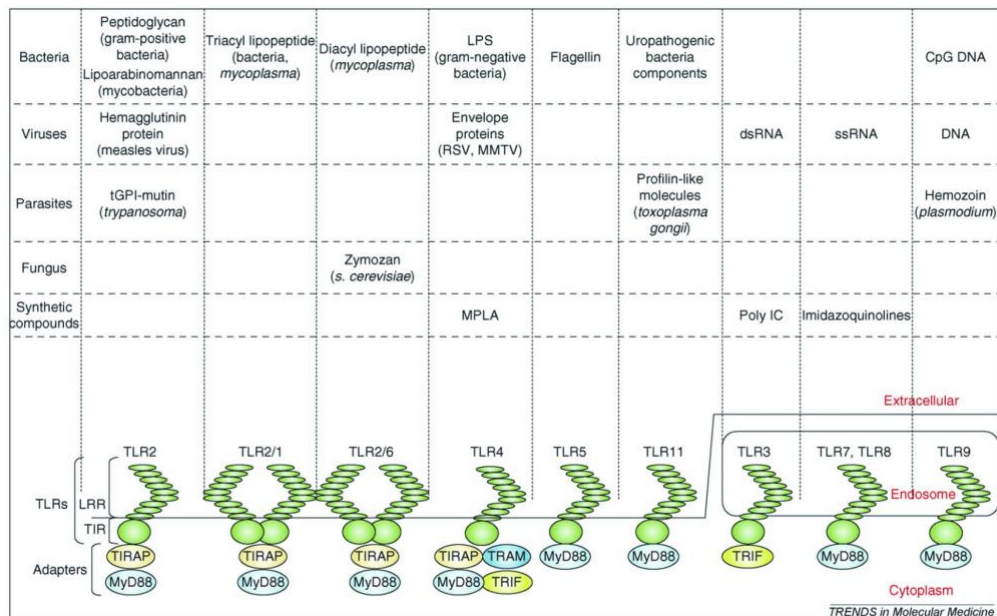


Figura 2. Ejemplos de PAMPs y DAMPs y los TLRs que los reconocen. Los diferentes TLR presentes en mamíferos tienen especificidad por los PRR. Por ejemplo, TLR2 es capaz de reconocer varios PAMPs tanto de bacterias, como Virus y Parásitos, sin embargo, el dímero TLR2/1 exclusivamente reconoce el Triacil Lipopeptido de Bacterias. En la parte inferior de la figura, se puede observar cómo cada TLR puede iniciar la cascada de señalizaciones posteriores a su unión con el ligando, mediante la unión con diferentes proteínas adaptadoras¹². Figura tomada de Kawai y Akira, 2007.

En cuanto a su síntesis, todos los TLR son sintetizados en el RE, transportados hacia el Golgi y reclutados hacia la superficie o compartimento celular donde tienen su ubicación final. Los TLR son proteínas transmembrana de tipo I y existen como proteínas diméricas (heterodímeros o homodímeros), que atraviesan la membrana y presentan: un **dominio de unión al ligando extracelular (ectodominio)**, compuesto por de 20-27 motivos repetidos ricos en leucina (LRR) flanqueadas por estructuras ricas en cisteína, un **dominio transmembrana** con estructura α -hélice, y un **dominio intracelular citoplasmático homólogo al receptor Toll para la IL-1 (TIR)**, el cual es esencial para la transducción de señales^{9,14}. En la Figura 3, se muestra un esquema de la estructura genérica de estos receptores.

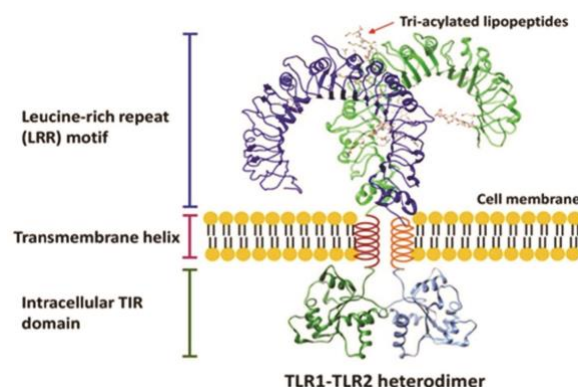


Figura 3. Estructura de los TLRs. Como se mencionó en el texto, los TLR son proteínas transmembrana de tipo I con un dominio de unión al ligando extracelular (ectodominio), compuesto por de 20-27 motivos repetidos ricos en leucina (LRR), un dominio transmembrana con estructura α-hélice y un dominio intracelular citoplasmático TIR⁹. Figura tomada de El-Zayat et al., 2019.

Uno de los receptores más estudiados es el **TLR de tipo 4 (TLR4)**, el cual reconoce específicamente el LPS¹⁷⁻¹⁹. Este receptor fue el primer receptor homólogo a los receptores *Toll* de *Drosophila* descubierto en mamíferos²⁰, siendo crítico para el desarrollo de la respuesta inmune a las infecciones generadas por bacterias Gram negativas. Se expresa en varios tipos celulares y órganos, sin embargo, son las células dendríticas y los macrófagos los que más lo expresan²¹. TLR4 forma pocos contactos directos con las moléculas de LPS y para que ocurra una alta afinidad entre ellos, son necesarias las interacciones con varias proteínas de unión a LPS. Estas incluyen: la proteína de unión a LPS, **LBP** (del inglés LPS binding protein), el marcador mieloide **CD14** y la proteína homóloga a MD1 de *Drosophila*, **MD-2** (del inglés, myeloid differentiation protein 2). En humanos, la cantidad de LBP en el plasma se estima en 3-10µg/ml y luego de una fase de respuesta aguda estos niveles se incrementan drásticamente²². LBP se une en la sangre o en fluidos extracelulares a micelas de LPS y este proceso facilita la captura de monómeros de LPS por CD14, principalmente expresada en macrófagos y monocitos²³. CD14 luego transfiere el LPS a un heterodímero de MD-2 y TLR4, los cuales se encargan de encender la señalización. Estas **proteínas co-receptoras o accesorias**, son importantes para que ocurra la correcta señalización y existen para varios TLRs. Tanto CD14 como MD2 pueden asociarse con otros TLR y formar diferentes complejos para generar una gran variedad de respuestas inmunes²¹⁻²⁴.

La unión de un determinado ligando a un TLR ocasiona la formación de homo o heterodímeros, lo cual acerca los dominios TIR, permitiendo que comience la señalización celular. A esto le sigue el reclutamiento de **proteínas adaptadoras al dominio TIR**, lo que facilita el reclutamiento y activación de varias quinasas, las cuales, mediante una cascada de fosforilaciones, activan factores de transcripción que inducen la expresión de genes inflamatorios y antivíricos. Como recién mencionamos, los diferentes TLRs reclutan distintas combinaciones de adaptadores e intermediarios a su dominio TIR y mediante el uso selectivo de estas moléculas adaptadoras, es que ocurren las respuestas diferenciales de cada TLR.

Las moléculas adaptadoras actúan en las proximidades de los TLRs, uniéndose

directamente al dominio TIR. En mamíferos existen 4 tipos de proteínas adaptadoras canónicas: **MyD88** (del inglés, myeloid differentiation primary-response protein 88), **TIRAP o MAL** (del inglés, TIR domain-containing adaptor protein), **TRIF** (del inglés, TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN β), y **TRAM** (del inglés, TRIF related adaptor molecule). Todos los TLRs, excepto TLR3, envían señales a través de **MyD88**, siendo capaces de activar NF κ B y MAPKs para la inducción de la respuesta inflamatoria. La activación de **MAL** o **TIRAP** es dependiente de **MyD88** y se asocia a TLR2 y 4. Por su parte, TLR3 envía señales a través de **TRIF**, lo cual genera la activación de IRF3. Por último, TLR4, es capaz de enviar señales a través de **MyD88** y **TRIF**, y es la vía **TRAM** la que media la señalización **MyD88** independiente, como veremos más adelante. Los TLR7 y 9 endosómicos (de células dendríticas plasmocitoides), envían señales a través de una vía dependiente de **MyD88** e independiente de **TRIF** que activa NF κ B e IRF4, por lo cual inducen una respuesta inflamatoria y antivírica. Existen además otro grupo de moléculas adaptadoras, como es el caso de **SARM** (del inglés, sterile α -and armadillo-motif containing protein), que son reclutadas en adición a otra molécula adaptadora canónica y presentan roles específicos como proveer de andamiaje para la unión con quinasas o funcionar como reguladores negativos. Estas se clasifican como **adaptadores regulatorios**, y **SARM** en particular es un regulador negativo de **TRIF** que colabora con la regulación de la señalización mediada por TLR3 y TLR4^{10,25}.

Colectivamente, dependiendo del adaptador que se utilice, la señalización mediada por TLR se divide en dos rutas: la ruta **MyD88 dependiente**, utilizada por todos los TLR con excepción de TLR3, la cual finaliza con la producción de citoquinas inflamatorias y la ruta **TRIF dependiente**, utilizada por TLR3 y 4, asociada a la estimulación de la expresión de genes de IFN de tipo I (INF1)²⁶.

MyD88, es un adaptador citoplasmático con un rol fundamental en la señalización de los TLR. Modelos murinos que carecen de este adaptador no son capaces de responder al LPS inyectado en el peritoneo, es decir, no generan shock séptico y además sus macrófagos peritoneales en cultivo son incapaces de producir TNF α y otras citoquinas, en respuesta a LPS. La señalización dependiente de **MyD88**, recluta mediante su dominio TIR a las Serin-Treonin quinasas **IRAK1 e IRAK4** (del inglés, *IL1 receptor associated kinase*), con las cuales forma el complejo conocido como *Centro Organizador Supramolecular* (SMOC) o *Mydosoma*. Durante la formación de este complejo, IRAK4, la cual es inicialmente activada, se encarga de activar a IRAK1 y se libera del *Mysodoma*. De esta forma, IRAK1 se asocia y activa a **TRAF6** (miembro de la familia de receptores asociados al TNF, del inglés TNF receptor associated factor 6)²⁷⁻²⁹. **TRAF6** es una E3 ubiquitina ligasa de tipo “RING-finger”, y junto a **E2**, **Ubc13** y **Uev1A**, promueven la poliubiquitinación de otras proteínas en sus residuos Lys63. El complejo **IRAK1-TRAF6** se une con **TAK1** (del inglés, TGF β activated kinase 1), con la que forman un complejo mayor que incluye además a **TAB1** y **TAB2** (del inglés, TAK1 binding proteins 1 y 2). El complejo se mueve al citoplasma, por la degradación de IRAK1 y allí las ligasas unen cadenas de

poliubiquitina a **TRAF6**, mediando la activación de **TAK1**, la cual al ser activada activa dos vías, las **MAP quinasas** (tales como ERK1/2, p38 y JNK) y las **IKK quinasas**²⁸. Las primeras median la activación de los factores de transcripción de la familia **AP1** y las segundas, fosforilan **IκBα**, la cual es degradada por el proteosoma y permite la translocación de **NFκB** al núcleo y la consecuente inducción de la expresión de distintos genes que codifican citoquinas inflamatorias¹².

La **señalización dependiente de TRIF**, inicia en los endosomas tempranos por TLR3 o TLR4 que han sido endocitados para provocar una respuesta tardía **NFκB** dependiente. Esta respuesta ocurre mediante el reclutamiento de **TRAF6** y **TRAF3**. TRAF6 recluta la kinasa **RIP-1** (del inglés, receptor interacting protein 1), la cual interactúa y activa **TAK1**, que lleva a la activación de **NFκB** y **MAP quinasas**, como vimos anteriormente. Cuando se recluta **TRAF3**, este recluta **TBK1** (del inglés, TRAF family member-associated **NFκB** activator binding kinase 1) e **IKKi** (relacionadas con las IKK quinasas), las cuales fosforilan **IRF3** (del inglés, interferon regulatory factor 3). En consecuencia, IRF3 forma dímeros y se transloca al núcleo donde induce la expresión de genes de IFN1. Recientemente se ha demostrado que la activación del IRF3 también puede ser regulada por el lípido inositol, **PtdIns5P**, el cual se une tanto al IRF3 como a TBK1 facilitando así la formación del complejo entre ambos¹². En la Figura 4, se esquematizan las vías que hemos mencionado previamente.

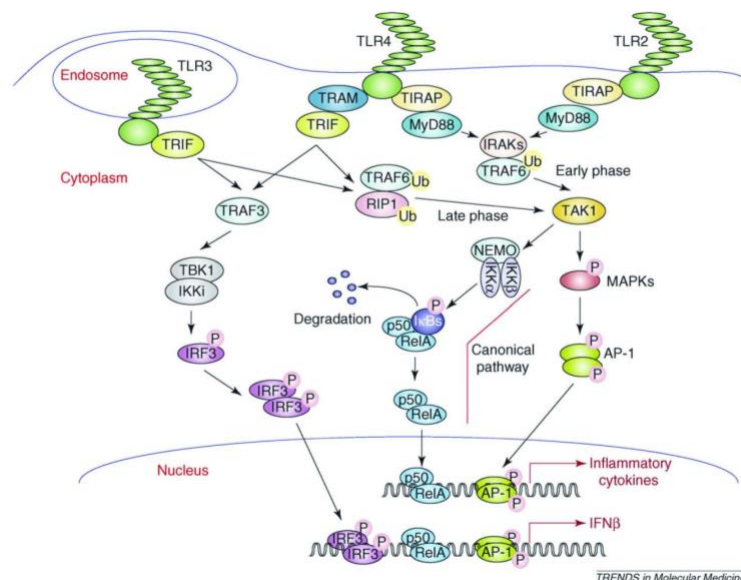


Figura 4. Transducción de señales por las vías MYD88 dependiente o independiente. La activación de los TLRs por su unión al ligando lleva a la dimerización y el reclutamiento de 4 proteínas adaptadoras: MYD88, TIRAP, TRIF y TRAM. Las señales corriente abajo se propagan mediante la activación de IRAKs-TRAF6, los complejos IKK y la señalización culmina con la activación de NFκB y IRF, que regula la producción de citoquinas pro-inflamatorias e interferón tipo 1¹². Figura tomada de Kawai y Akira, 2007.

Como ya se mencionó, los principales factores de transcripción activados en estas vías son el *factor nuclear κB (NFκB)*, la *proteína de activación 1 (AP1)*, y el *factor de respuesta al interferón 3 (IRF3)* y 7 (*IRF7*). NFκB y AP1 estimulan la expresión de

genes que codifican muchas de las moléculas requeridas para las respuestas inflamatorias, como citoquinas pro-inflamatorias (TNF α , IL1 β , IL6), quimiocinas (CCL2, CXCL8 y CXCL10) y moléculas de adhesión endotelial (selectina E). *IRF3* y *7* promueven la expresión de interferones del tipo I (IFN α , IFN β), importantes para las respuestas inmunitarias innatas antivirales¹².

Así como la expresión y funcionamiento de los TLRs es crucial para la supervivencia de los organismos, es igual de importante también que no ocurra una excesiva activación de estos. La sobre-activación de estos sostiene la producción de citoquinas y quimiocinas, rompiendo la homeostasis inmune y de esta forma puede contribuir con la progresión de muchas enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Algunas de ellas se han visto muy relacionadas con alteraciones en los TLRs como el Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Artritis Reumatoidea (AR), Sepsis, Alzheimer y Diabetes tipo II⁹. En particular, la desregulación de TLR4 en la sepsis inducida por bacterias promueve la producción aberrante de citoquinas en el huésped, lo cual puede llevar al shock séptico³¹.

Control transcripcional de la respuesta inflamatoria

Las células del sistema inmune innato están programadas para generar una respuesta transcripcional rápida y robusta frente a diferentes estímulos. La respuesta inmune no sólo implica la cascada de señalización intracelular provocada por la unión al PRR, sino que también implica una cascada transcripcional que llevará a la transcripción de los genes de la respuesta inmune primaria. Algunos de los genes de la **respuesta primaria** codifican citoquinas, quimiocinas y moléculas efectoras, las cuales contribuyen directamente a la protección contra el agente patógeno. Otros genes, serán los encargados de codificar factores de transcripción y moléculas de señalización que activan la segunda cascada transcripcional. Sumado a esto, algunas citoquinas inducidas en la respuesta primaria pueden también contribuir a la **respuesta secundaria**, mediante la unión a receptores de la membrana plasmática y la activación de vías de señalización y factores de transcripción alternativos. Así, la cascada transcripcional progresa por varias horas con olas transcripcionales solapadas de activación o inhibición³².

En el caso del LPS, aunque también ocurre para los diferentes ligandos patógenos, pasadas unas pocas horas o minutos de la estimulación, se induce o reprime la expresión de varios genes LPS dependientes, y serán los factores de transcripción los encargados de coordinar esta secuencia génica. La respuesta transcripcional consiste en múltiples sets de genes que codifican **programas funcionales**, controlando procesos como: la migración celular, reparación y remodelación de tejidos, defensa antimicrobiana, fagocitosis, cambios metabólicos y por último, la regulación de la respuesta inmune adaptativa. Estos grupos de genes están organizados en **módulos transcripcionales**, los cuales son regulados coordinadamente por distintos factores de transcripción. En base a su modo de activación y su función, los factores de

transcripción se clasifican en 3 categorías. Los factores de transcripción de **clase I**, son constitutivamente expresados por muchas células y se activan mediante modificaciones post-traduccionales. En la mayoría de los casos el factor de transcripción es retenido en el citoplasma en el estado basal y la señal activadora involucra su translocación al núcleo. Se incluyen dentro de este grupo a **NFκB**, **IRFs** y **CREB1** (proteína de unión al elemento de respuesta del cAMP 1, del inglés cAMP responsive element binding protein 1). Estos, son los que actúan más rápido en respuesta LPS, induciendo la expresión de los genes de respuesta primaria. Los factores de transcripción de **clase II**, son sintetizados *de novo* luego de la estimulación con LPS y se encargan de regular la segunda ronda de expresión génica. La tercera categoría de factores de transcripción de **clase III**, consiste en reguladores transcripcionales específicos de linaje, los cuales se expresan durante la diferenciación de macrófagos, son constitutivamente expresados y activos³³.

El factor nuclear κB, **NFκB** fue descubierto como un factor de unión al ADN activado en células B maduras, con gran afinidad por el potenciador transcripcional del gen de la inmunoglobulina liviana **κ**³⁴. En mamíferos, NFκB está codificado por 5 genes que dan lugar a 5 proteínas: RelA (p65), cRel, RelB, p105 (NFκB1, precursor de p50) y p100 (NFκB2, precursor de p52); las cuales comparten un dominio homólogo Rel que es responsable de la unión al ADN, dimerización y la asociación con las proteínas **IκB** (del inglés, inhibitory κB proteins). RelA y cRel contienen dominios de activación transcripcional, p50 y p52 derivan del procesamiento proteolítico de las proteínas precursoras p100 y p105. Los 5 polipéptidos pueden formar 15 factores de transcripción diferentes, mediante la combinación de homo y hetero-dímeros, y todos ellos comparten la habilidad de unirse a la secuencia de ADN consenso **κB**, por lo cual se hace referencia a ellos como NFκB. Se conocen 5 proteínas homólogas que juegan un rol inhibitorio sobre la unión al ADN de NFκB, las **IκB**, las cuales son las encargadas en condiciones basales, de secuestrar a NFκB en el citoplasma en su forma inactiva, evitando su translocación al núcleo³⁵.

Se han descrito dos rutas de señalización distintas y evolutivamente conservadas para NFκB, las cuales se distinguen por dos complejos multiproteicos IKK que regulan la degradación de las proteínas **IκB**. El **complejo “canónico”** IKK, contiene la IKKβ y a la proteína de andamiaje **NEMO** (modificador esencial de NFκB o también llamado IKKγ, del inglés **NFκB** esencial **m**odifier), mientras tanto el **complejo “no canónico”** IKK consiste en el homodímero IKK1 (IKKα). Ambas rutas de señalización tienen un rol importante en el funcionamiento del sistema inmune, mientras la vía canónica es la responsable de regular la inflamación durante la respuesta inmune controlando la proliferación y apoptosis de células linfoides, la vía no canónica se asocia con el desarrollo de los órganos linfoides, asegurando efectivo montaje de la respuesta inmune. La ruta canónica actúa rápidamente respondiendo en minutos y es reversible por múltiples mecanismos de regulación negativa. Por su parte, la ruta no canónica

responde lentamente, luego de horas y/o días, mediando una actividad NFkB nuclear a largo plazo³⁵.

Un estímulo pro-inflamatorio, como por ejemplo el LPS, es un fuerte inductor de la actividad NFkB en muchas células. En la *ruta canónica*, la primera isoforma NFkB inducida es mayormente **p50:RelA**. Este complejo, en las células sin estimular es inhibido por su unión al **IκB**. En respuesta al estímulo, las proteínas canónicas **IκB** (IKKβ) se fosforilan por el complejo IKK y son subsecuentemente poliubiquitinadas y degradadas mediante el proteasoma. Esta activación canónica es muy rápida, no requiere síntesis *de novo*, generando el rápido incremento de NFkB en el núcleo y la inducción de citoquinas inflamatorias como IL1, IL6, IL8, IL12 y TNFα, así como quimioquinas; MCP1, IL18, RANTES, MIP-2, CxCI1 y CxCI10^{26,35,36}. En la Figura 5, se muestran los genes activados por la presencia de NFkB nuclear.

La vía de señalización *no canónica* involucra varios estímulos no inflamatorios y se observa en variedad de tipos celulares. Dependiendo del estímulo y del tipo celular, se parte de un complejo dimérico de **RelB o RelA** con **p50 o p52**. Tanto el precursor p105 como el p100 contienen repetidos Ct, los cuales funcionan como proteínas tipo **IκB**, uniendo los dominios homólogos a Rel, e inhibiendo la translocación de **RelB o RelA** al núcleo. La degradación proteolítica de los extremos Ct de p105 y p100 resulta en la generación de p50 o p52. Mientras el procesamiento de p105 es constitutivo, p52 ocurre como consecuencia de una fosforilación Ct de p100 mediada por el homodímero de IKKα. La activación no canónica es significativamente más lenta que canónica y no presenta mecanismos de regulación negativa, ni un control dinámico³⁵. Se cree que es generada por CD40, el receptor βLT (del inglés, lymphotoxin) y el receptor BAFF (del inglés, B-cell activating factor belonging to de TNF family)²⁷.

Por otro lado, existe un segundo nivel de activación de NFkB, el cual involucra la transactivación de p65 y c-Rel. La subunidad p65 presenta múltiples sitios de fosforilación y su activación puede ocurrir por diferentes mecanismos. Se encuentra constitutivamente fosforilada, sin embargo, la fosforilación basal se incrementa en respuesta a gran variedad de estímulos. En particular, en su extremos Ct presenta dos dominios de transactivación TA1 y TA2, que, al ser activados, mediante fosforilación de Serinas, incrementan notablemente los niveles de transcripción³⁷. Adicionalmente, la fosforilación en la Ser276 del dominio Nt, mediada por PKA en respuesta a LPS, incrementa su actividad transcripcional y además promueve la interacción con CBP/p300 (del inglés, CREB binding protein), lo cual también tiene el mismo efecto³⁹. Otra proteína involucrada en transactivación de p65 es Ras, proteína de unión a GTP, la cual potencia la actividad transcripcional mediante quinasas⁴⁰. Sumado a esto, células que carecen de otras quinasas como: PKCξ, NIK, IKKε, TBK/NAK, GSK3β, presentan también baja expresión génica NFkB dependiente³⁷.

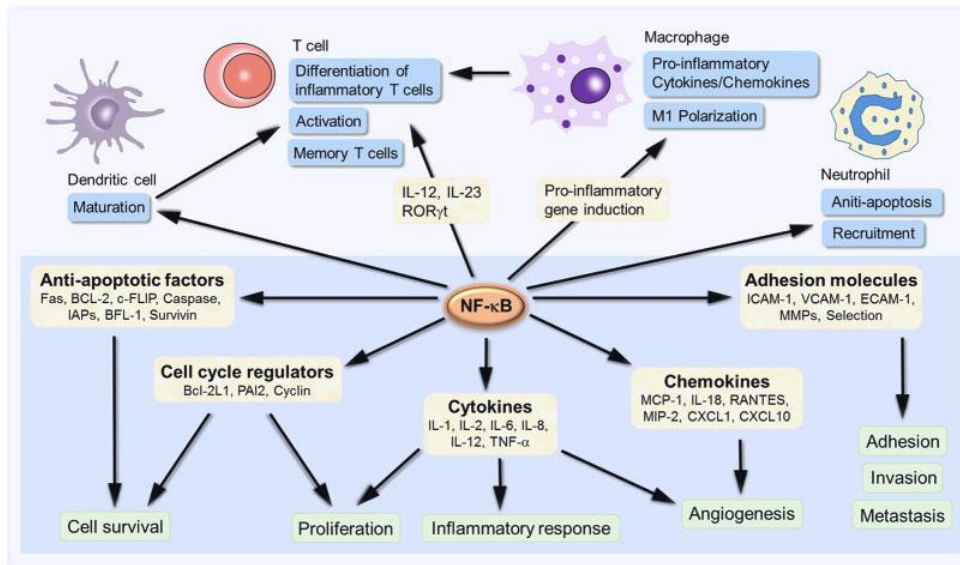


Figura 5. Genes blanco de NFκB involucrados en el inicio y progresión de la inflamación. NFκB es un factor de transcripción inducible, que luego de su activación, activa la transcripción de varios genes y por intermedio de ellos se regula la inflamación. No solo es capaz de incrementar la producción de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión, sino que además regula la proliferación celular, apoptosis, morfogénesis y diferenciación³⁴. Figura tomada de Liu *et al.*, 2017.

Los macrófagos: fagocitos mediadores de la respuesta inmune.

Los macrófagos son células mononucleares capaces de poblar todos los tejidos de nuestro organismo. Su principal rol es asegurar la integridad de los tejidos, poseyendo funciones altamente fagocíticas, así como potencial degradativo, lo que permite la limpieza y remoción de agentes dañinos y tejidos dañados. Son esenciales en el sistema inmune, pudiendo participar tanto la inmunidad innata como en la adaptativa³⁹⁻⁴².

Se han propuesto 3 orígenes diferentes para los macrófagos que existen en nuestro cuerpo: los macrófagos residentes que derivan del **saco vitelino**, los macrófagos residentes que derivan del **hígado fetal** y por último, los macrófagos infiltrantes que derivan de la **médula ósea**. Todos emergen en distintos puntos y participan en el desarrollo, crecimiento, mantenimiento y remodelación de tejidos⁴³. La ontogenia precisa de los macrófagos embrionarios es debatida, sin embargo, se ha establecido que al menos un set de macrófagos surge previo a la aparición de las primeras **células madre hematopoyéticas (HSCs)**, del inglés, Hematopoietic Stem Cells). En la Figura 6, se pueden observar las diferentes rondas de hematopoyesis que ocurren en el embrión de ratón, así como el surgimiento de los diferentes macrófagos residentes.

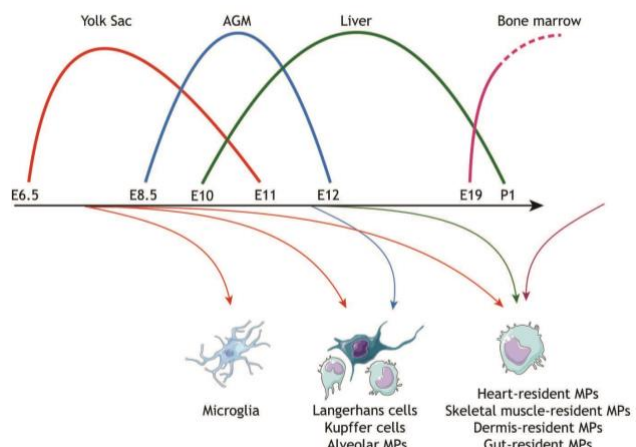


Figura 6. Rondas de Hematopoyesis y surgimiento de macrófagos. La figura muestra cómo desde E6.5 hasta E11, la hematopoyesis primitiva toma lugar en el saco vitelino y algunos macrófagos residentes como la microglia o las células de Langerhans aparecen en sus respectivos tejidos. Más tarde, cerca de E12, las HSC inmaduras aparecen desde un tejido cercano a la aorta (AGM, del inglés aorta-gonad-mesenchymos) para dar lugar a las células de Kupffer y los macrófagos alveolares. Desde E10 hasta el nacimiento, el hígado fetal comienza a generar todas las células inmunes y los macrófagos residentes del sistema cardíaco, músculo esquelético, dermis y grasa que colonizan los tejidos. Finalmente, luego del nacimiento la hematopoyesis se mueve hacia la médula ósea donde dará lugar a los monocitos circulantes de la sangre que reemplazarán a un porcentaje de los macrófagos residentes y funcionarán como uno de los reservorios de macrófagos⁴⁰. Figura tomada de Theret *et al.*, 2019.

Durante la embriogénesis se detectan macrófagos en la mayoría de los órganos y tejidos y la progenie de ese primer macrófago persistirá durante toda la vida del organismo. Los **macrófagos residentes**, viven por semanas o meses en los tejidos periféricos, donde constituyen poblaciones estables y asumen fenotipos especializados dependiendo del órgano y reflejando la influencia ejercida por factores de cada microambiente. Así encontramos macrófagos alveolares en el pulmón, células de Kupffer en el hígado, macrófagos esplénicos en el bazo, osteoclastos en el hueso y microglia en el sistema nervioso central, entre otros macrófagos especializados⁴⁴. Los macrófagos residentes de tejidos son las células inmunes más abundantes dentro de los tejidos y su mantenimiento es crucial para la su propia homeostasis. Si bien está establecido que un porcentaje de los macrófagos residentes se renueva constantemente vía macrófagos derivados de la sangre, la evidencia muestra que también los macrófagos pueden proliferar localmente en su estado basal, así como en respuesta a injurias en el tejido. La contribución de los precursores circulantes versus los precursores locales en el mantenimiento de la homeostasis continúa siendo debatida en la actualidad⁴². La contribución de las HSC a la renovación de los macrófagos residentes difiere entre órganos, siendo reducida ($\leq 5\%$) en el cerebro, hígado y epidermis; pequeña pero incrementada con la edad del individuo en pulmón, riñón y corazón, y a veces predominante en la lámina propia del intestino⁴⁵.

En adición, los macrófagos que derivan de células progenitoras de la médula ósea sufren 3 divisiones sucesivas, la primera de ellas da lugar a los **monoblastos**, después **promonocitos** y finalmente, **monocitos** antes de ser liberados a la circulación. Los monocitos constituyen un grupo heterogéneo compuesto de diferentes subgrupos distinguibles por marcadores de su superficie celular, así como por sus diferentes funciones. Una vez diferenciados a **macrófagos**, dejan la sangre y entran al tejido. En humanos, se han identificado tres poblaciones de monocitos y se clasifican en **clásicos, intermedios y no clásicos** siendo los clásicos la subpoblación predominante, cuya función principal es eliminar los neutrófilos apoptóticos en los lugares de inflamación. Los monocitos clásicos se identifican por la expresión superficial del marcador **CD14**. El grupo de los monocitos no clásicos suponen una minoría con mayor capacidad de expresión de citoquinas pro-inflamatorias, mayor efectividad para la presentación antigénica y mayor capacidad de extravasación, identificados por los marcadores de superficie **CD14** y **CD16**. Existen además poblaciones de monocitos intermedias con **CD14** y **CD16** y con un perfil transcripcional diferente a las dos clases mencionadas³⁹. En ratones, se utiliza el marcador **Ly6C**, indicando monocitos que se originaron de progenitores de la médula ósea y son liberados a la sangre, donde adoptan un fenotipo **Ly6C^{mid}** asociado a la expresión selectiva de **CCR7**, **CCR8** y la retención del marcador **CCR2** (del inglés, CC-chemokine receptor 7, 8, y 2, respectivamente). En condiciones basales estos formarán los monocitos **CCR2⁺Ly6C⁻** que se caracterizan por la expresión de la quimioquina **CX3CR1** (de inglés, CX3C-chemokine receptor 1). Ambos, **Ly6C⁻** y **Ly6C⁺**, responden a estímulos pro-inflamatorios, sin embargo son funcionalmente dos poblaciones diferentes, mientras que los **Ly6C⁺** responden al daño infiltrando el tejido, los **Ly6C⁻** se encargan del patrullaje del sistema vascular, detectando y removiendo células endoteliales dañadas de los vasos. Los monocitos son células muy plásticas, pudiendo adoptar diferentes programas transcripcionales en función de las citoquinas presentes en su microambiente y asumiendo un rango de funciones que van desde promover la respuesta inmune inflamatoria o adaptativa, a inhibir estas últimas, promoviendo la regeneración del tejido⁴⁵⁻⁴⁶.

En esta sección describimos los macrófagos, los cuales han constituido el principal modelo celular de estudio de nuestros experimentos *in vitro*. Más adelante detallaremos su comportamiento en la respuesta inflamatoria aguda y en la inflamación crónica. En los experimentos de citometría de flujo donde seleccionamos macrófagos para su estudio (ver sección resultados) dentro de la población de células presentes en fracción estromal vascular del tejido adiposo, se utilizó el marcador **CD45** para seleccionar la población leucocitaria y posteriormente, los marcadores clásicos de macrófagos **CD11b** y **F4/80**. Así mismo, en la población de células presentes en los lavados peritoneales, los macrófagos fueron seleccionados, excluyendo la población positiva para los marcadores **CD19**, **TCRβ**, **Ly6G**, principalmente linfocitos, y posteriormente, seleccionando células positivas para los marcadores **CD11b** y **F4/80**. Dado que los macrófagos constituyen los mayores productores de citoquinas⁴⁸, a continuación, detallaremos el **TNFα**.

TNF α : una citoquina pro-inflamatoria multifuncional.

El Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α , del inglés Tumor Necrosis Factor) juega un rol crucial en el sistema inmune durante la inflamación, proliferación, diferenciación y apoptosis. Fue reportada en 1975 por Carwell y colaboradores, como una citoquina que mostraba actividad citotóxica luego de la estimulación del sistema inmune, causando necrosis tumoral. Posteriormente, debido a la homología estructural con la **linfotoxina α (LT α)** se la incluyó dentro de la Superfamilia de Ligandos TNF, las cuales son **proteínas transmembrana de tipo II**, que pueden ser expresadas tanto como una proteína de unión a membrana o como una proteína secretada^{49,50}.

El gen de TNF α tiene aproximadamente 3 kb y consiste en 4 exones interrumpidos por 3 intrones. Más del 80% de la citoquina se codifica por el exón 4 y los primeros dos exones contienen las secuencias reconocidas por los factores de transcripción que la regulan. El TNF α es producido en dos formas: una pequeña proteína de 17 kDa soluble (sTNF α) y una de 26 kDa (tmTNF α) unida a la membrana. La forma soluble es generada por la acción proteolítica de la enzima TACE (del inglés, *Tumor Necrosis factor α converting enzyme*) sobre tmTNF α ⁵¹. Su secreción ocurre por la ruta canónica, desde el RE va al Golgi y de allí a la membrana plasmática vía vesículas o endosomas⁵².

Su regulación ocurre a diferentes niveles, incluyendo una regulación transcripcional, traduccional y post-traduccional. El mensajero de TNF α se expresa constitutivamente y se regula principalmente mediante su estabilidad y traducción⁵³. La transcripción del mensajero de TNF α es regulada por un complejo núcleo-proteico que reúne factores de transcripción y coactivadores, con los potenciadores o regiones promotoras. Su composición es específica de cada célula e incluso, de cada estímulo, involucrando diferentes sets de factores de transcripción y coactivadores. Uno de los factores reclutados a los **sitios consenso κB** del promotor de TNF α es el **NF κB** , como ya se ha mencionado varias veces, siendo **$\kappa B3$** , un sitio exclusivo de ratones que exhibe alta afinidad por NF κB ⁵⁴. Como cualquier otro gen, modificaciones de la cromatina y sus niveles de acetilación, influyen su transcripción, más adelante hablaremos de la Sirtuina 6, la cual mediante desacetilación baja sus niveles de expresión. Otro mecanismo regulatorio que opera sobre la biogénesis de esta citoquina es la retroalimentación negativa⁵¹.

Existen, además, diversas modificaciones post-traduccionales que afectan la regulación del TNF α , además de TACE, las proteasas **SPPL2a** y **SPPL2b**, clivan la fracción intramembrana de tmTNF α y promueven su liberación del dominio intracelular para inducir la expresión de la citoquina IL12. TNF α también es modificada por N y O glicosilación, así como mediante la adición de grupos acilo en Cisteínas y Lisinas⁵²⁻⁵⁴. También más adelante, veremos como SIRT6 es capaz de regular su secreción mediante la deacilación de Lisinas del TNF α .

Los efectos biológicos del TNF α son mediados por su unión a dos diferentes receptores, **TNFR1 (CD120a)** y **TNFR2 (CD120b)**. El **TNFR1**, se expresa ubicuamente y es el mediador principal de los efectos del TNF α interactuando fuertemente con sTNF α y tmTNF α , mientras que el **TNFR2** tiene una expresión más restringida y se une con mayor afinidad a tmTNF α . Por otro lado, ambos receptores pueden existir tanto en la membrana como en la forma soluble dentro de la célula y también requieren la acción de TACE⁵⁷. Se ha propuesto que el receptor **TNFR1** promueve la inflamación y la degeneración del tejido, y por su parte **TNFR2** media los efectos homeostáticos locales, como la sobrevivencia celular y la regeneración de tejidos⁵⁸.

Homotrimeros de TNF α se unirán al receptor para inducir la señalización celular, reclutando a la molécula adaptadora **TRADD** (del inglés, TNFR1 associated death domain protein) que ensambla distintos complejos de señalización conocidos como **Complejo I, Ila, I Ib, y I Ic**. Estos generan diferentes respuestas que van desde la expresión de genes inducida por NF κ B y AP1 (**Complejo I**), muerte celular vía apoptosis inducida por TNF α (**Complejo Ila y I Ib**) y necroptosis (**Complejo I Ic**)⁵⁸. En la figura 7, se esquematiza lo recientemente descrito.

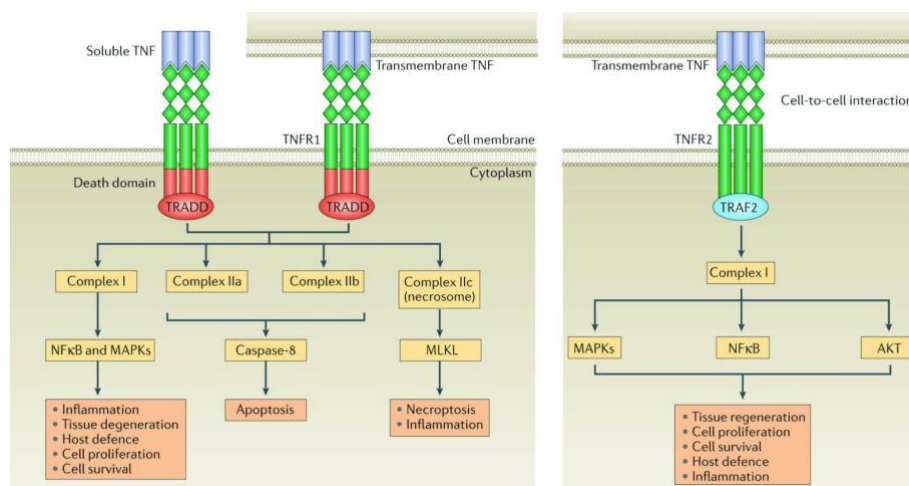


Figura 7. Modalidades de señalización y consecuencias biológicas de la activación de los receptores de TNF α . En el cuadro de la izquierda se muestra como la señalización del receptor TNFR1 se activa tanto por sTNF α y tmTNF α . Este receptor posee un dominio intracelular “dominio de muerte” que une a la proteína TRADD, como molécula adaptadora. La unión de sTNF α o tmTNF α lleva al ensamblaje del Complejo I, que activa NF κ B y MAPKs induciendo los procesos biológicos señalados en el recuadro. Alternativamente, también se pueden activar los Complejo Ila, I Ib y I Ic, los cuales se asocian a muerte celular programada. En el cuadro de la derecha se muestra la señalización del receptor TNFR2, el cual es completamente activado por tmTNF α , en el contexto de interacciones célula-célula. TNFR2 recluta TRAF2, lo que induce el ensamblaje del Complejo I, que activa NF κ B, MAPKs y AKT induciendo los procesos biológicos señalados en el recuadro⁵⁸. Figura tomada de Werner et al., 2005.

TNF α no solo se expresa en respuesta a LPS o estímulos pro-inflamatorios, sino que es capaz por sí misma de mediar las cascadas de señalización previamente mencionadas, las cuales inducen factores de transcripción como NFkB y AP1, induciendo la transcripción de genes inflamatorios como IL1, IL6, e IL8, metaloproteinasas y óxido nítrico, importantes en el proceso de inflamación tanto aguda como crónica^{59,60}. Además, media un mecanismo de retroalimentación positiva en respuesta a LPS, que lleva a la activación de la actividad IKK⁶¹, por lo cual una vez sintetizada en respuesta a LPS, contribuye con la señalización amplificando la respuesta. Es por este motivo que su regulación debe ocurrir de forma estricta para recuperar la homeostasis luego de una estimulación pro-inflamatoria. Su producción descontrolada se ha asociado al desarrollo de enfermedades inflamatorias como Artritis reumatoide, Artritis Juvenil, Psoriasis, Enfermedad inflamatoria intestinal, Lupus eritematoso sistémico y Espondilitis anquilosante, entre otras⁵⁸.

Respuesta inflamatoria: aguda y crónica.

Cuando un hospedero se enfrenta a un agente nocivo, la primera respuesta del sistema inmune innato es la **Inflamación aguda (IA)**. Como ya hemos profundizado en secciones anteriores, el sistema inmune innato responderá inmediatamente reconociendo PAMPs y DAMPs y activando las rutas de señalización intracelular que inducen la expresión de citoquinas, mensajeros lipídicos y otros mediadores de la inflamación. La **IA** consiste en la **respuesta inicial del organismo**, que se desencadena rápidamente y es de corta duración, desde algunos minutos a varios días. En la **IA** cuando los macrófagos, células dendríticas y mastocitos, detectan la señal de daño, producen mediadores inflamatorios que promueven la vasodilatación y el reclutamiento de otras células. El aumento del flujo sanguíneo y de la permeabilidad de los vasos en el tejido afectado permite la extravasación de proteínas plasmáticas y células (principalmente leucocitos) que migran hasta el sitio de la lesión para eliminar el agente causal de la inflamación. En general, inicialmente ocurre una infiltración de neutrófilos y luego de monocitos, los cuales se diferenciarán en macrófagos. Los leucocitos y las proteínas plasmáticas reclutadas realizan sus funciones efectoras, destruyendo y fagocitando los agentes patógenos y los tejidos circundantes, para finalmente iniciar las tareas de reparación de los tejidos dañados⁵⁹⁻⁶⁰.

Varios factores solubles están involucrados en el reclutamiento de leucocitos, estimulando el incremento de expresión de moléculas de adhesión o mediante quimio atracción. Regulan, además, la activación de las células residentes (fibroblastos, células endoteliales, macrófagos residentes y mastocitos) y las células inflamatorias reclutadas (monocitos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos). Finalmente, algunos de estos mediadores solubles inducen la **respuesta sistémica** (fiebre, hipotensión, síntesis de proteínas de fase aguda, leucocitosis y caquexia). Los factores solubles que median las respuestas recién mencionadas se pueden clasificar en cuatro

categorías: (1) metabolitos lipídicos inflamatorios, como el factor de activación de plaquetas (PAF, del inglés platelet activating factor) y numerosos derivados del ácido araquidónico (prostaglandinas, leucotrienos y lipoxinas); (2) cascadas de proteasas solubles que generan numerosos péptidos pro-inflamatorios (proteínas del complemento y quininas); (3) óxido nítrico (NO, del inglés Nitric Oxide), un potente vasodilatador; y por último (4) un grupo de polipéptidos secretados conocidos como **citoquinas**, encargadas de orquestar la RI. Dentro de estas se destacan **TNF α** , **IL1 β** e **IL6**, capaces de generar cambios en la zona inflamatoria, como el aumento del flujo sanguíneo gracias a la vasodilatación arteriolar y el aumento de la adhesividad de los leucocitos circulantes a vénulas favoreciendo el reclutamiento al sitio afectado. En adición a sus efectos locales, las citoquinas tienen efectos de largo alcance que contribuyen a la defensa del hospedero, mediante la respuesta sistémica. La mayoría de las citoquinas son moléculas multifuncionales pleiotrópicas que ejercen sus efectos local y sistémicamente, de forma paracrina y autocrina. Las citoquinas están involucradas en una extensa red de señalización, que incluye interacciones sinérgicas y antagónicas, exhibiendo efectos regulatorios positivos y negativos en varias células blanco⁵⁹⁻⁶⁰.

Retomando la **IA**, en condiciones óptimas se limitará a eliminar el agente causal, aislar el tejido dañado y repararlo, para finalmente activar los mecanismos anti-inflamatorios, o **mecanismo de control**, que minimicen los daños y permitan culminar la respuesta. Una vez que esto ocurre, todo el proceso deja de activarse, pero sin embargo si el agente no es eliminado con rapidez y la IA no logra solucionar el problema, el resultado puede ser una inflamación crónica.

La **inflamación crónica (IC)** se desencadena por persistencia de la inflamación aguda o en casos en que existen enfermedades autoinmunes. Es una respuesta de duración prolongada (semanas o meses) y está asociada a una mayor destrucción tisular, aumento en el reclutamiento de linfocitos y macrófagos y además la proliferación de vasos sanguíneos y depósitos de tejido conjuntivo. La acumulación y activación de macrófagos generan una producción crónica de citoquinas, destacándose el **INF γ** y **TNF α** . El IFN γ es producido en su gran mayoría por linfocitos T y células NK, mientras que el TNF α es sintetizado principalmente por macrófagos activados. Ambas citoquinas actúan sinérgicamente induciendo aumentos en las moléculas de adhesión en el endotelio, lo cual favorece el reclutamiento de un gran número de leucocitos al tejido⁶⁰.

En otros casos, la inflamación crónica puede desarrollarse como un proceso gradual y acumulativo de bajo nivel y sin antecedentes previos de inflamación aguda. A continuación, se desarrollará uno de los ejemplos de este tipo de **inflamación estéril**, la **inflamación asociada a la obesidad**, la cual es producida en respuesta a un estímulo metabólico y se sostiene crónicamente sin una resolución adecuada^{60,61}.

Obesidad e inflamación

En nuestros días, es un hecho que la **obesidad** es una enfermedad con un fuerte componente inflamatorio, fundamentalmente del tejido adiposo visceral, pero que también afecta otros órganos relevantes para la homeostasis metabólica como el hígado, músculo, páncreas y cerebro, entre otros. De forma general, la desregulación inmune en el tejido adiposo (**TA**) involucra la alteración de mecanismos presentes en el tejido saludable, el reclutamiento de células inmunes y la activación de procesos pro-inflamatorios tanto en las poblaciones inmunes residentes e infiltrantes, como en los propios adipocitos.

Antes de profundizar en los mecanismos inmunes que se generan en el TA disfuncional, nos interesa destacar algunas cifras impactantes sobre el sobrepeso y la obesidad. Actualmente, se estima que casi el 40% del total de la población adulta tiene sobrepeso (IMC > 25) u obesidad (IMC > 30) mientras que, según la OMS, más de 340 millones de niños/adolescentes tienen sobrepeso u obesidad. Durante los últimos 50 años, el incremento en los índices de obesidad y sus comorbilidades asociadas ocurre de forma acelerada y sostenida, convirtiéndose en uno de los principales desafíos sanitarios del siglo XXI. Si esta situación no cambia, se estima que al menos la mitad de la población adulta en 2030 será obesa^{62,63}. Uruguay no es ajeno a esta pandemia y posee el mayor índice de crecimiento de la prevalencia de obesidad y sobrepeso entre los países de Sudamérica⁶⁴. Sumados a estos datos, que constituyen en sí una gran alarma sanitaria y económica, recientemente la pandemia de Covid 19, resaltó la importancia de la obesidad como un factor de riesgo para el desarrollo o impacto de otras patologías. En USA, se documentó que los individuos obesos con (IMC > 30) incrementan el riesgo de hospitalización a causa del Covid 19 en un 113%, el riesgo de requerir cuidados intensivos en un 74% y el riesgo de muerte a causa de Covid19 en un 48%. En Inglaterra, se reportaron valores similares, con un incrementado riesgo de muerte a causa de Covid19 que alcanza el 90%, en pacientes con IMC > 40⁶⁶.

Retomando a la obesidad y la generación de resistencia a insulina en el contexto de inflamación crónica, fueron Spigelman y colaboradores, los primeros en identificar al $TNF\alpha$ como un mediador entre la inflamación, obesidad y la resistencia a la insulina. En este reporte, el TA de animales obesos expresaba ***TNF α en grandes cantidades***, lo que promovía la resistencia a la insulina por ser regulador negativo de la señalización de la insulina, mediante la fosforilación de los factores IRS (del inglés, Insulin binding to its Receptor)⁶⁷. Más adelante, se demostró que la obesidad implicaba además la infiltración y acumulación de macrófagos en el TA, lo cual desencadena un estado pro-inflamatorio local, caracterizado por la producción de citoquinas, quimioquinas y proteínas que modifican la matriz extracelular. En consecuencia, otras células inmunes innatas y adaptativas, incluyendo neutrófilos y linfocitos T infiltran el tejido, contribuyendo también al estado inflamatorio⁶⁸⁻⁷⁰.

Estudios realizados en TA de ratones obesos muestran un incremento sustancial en

el porcentaje de macrófagos F4/80+, alcanzando entre el 45-60% en comparación con el 10-15% de ratones con pesos normales⁷¹. Sumado al incremento en la proporción de células inmunes en el TA, ocurre una redistribución de tipos de macrófagos. Mientras que los **macrófagos residentes del tejido de tipo M2 anti-inflamatorios o alternativamente activados** (AAM, del inglés, alternative activated macrophages) predominan dispersos en el tejido en condiciones saludables y promueven la sensibilidad a la glucosa a través de la producción de citoquinas anti-inflamatorias como IL10 que potencian la señalización de la insulina, los **macrófagos de tipo M1 pro-inflamatorios o clásicamente activados** (CAM, del inglés classically activated macrophages) son reclutados durante la obesidad, incrementando su proporción en el tejido y secretando factores pro-inflamatorios como TNF α , IL1 β , IL6, leucotrieno B4 y óxido nítrico^{72,73}. Estos últimos, están bajo el control transcripcional de **AP1 y NF κ B**, los cuales se translocan al núcleo por los mismos mecanismos que inhiben la señalización de la insulina⁷⁴⁻⁷⁵. El esquema de la figura 7, muestra la convergencia de las rutas.

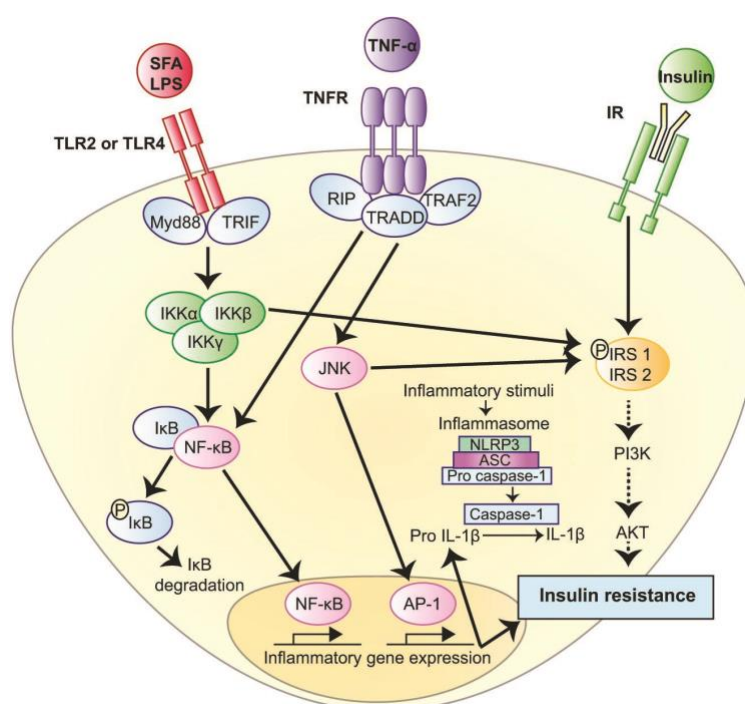


Figura 8. Rutas inflamatorias implicadas en el desarrollo de la resistencia a la insulina. En el esquema se muestra como la activación de TLR2, TLR4 y TNFR, lleva a la activación de la señalización de NF κ B y JNK. La serin-quinasa IKK β y JNK, fosforilan IRS1 e IRS2, inhibiendo la señalización corriente abajo de la insulina. Sumado a esto, la activación de IKK β lleva a la fosforilación y degradación de I κ B, lo cual permite la translocación de NF κ B al núcleo. De forma similar, la activación de JNK lleva a la formación del factor de transcripción AP1. NF κ B y AP1 activan los genes inflamatorios, los cuales contribuyen a la resistencia a insulina de forma paracrina⁶⁷. Figura tomada de Hotamisligil et al.,1996.

La señalización inflamatoria puede interferir con la acción de la insulina a través de varios mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales. Primero, las serin-quinazas activadas por estrés, JNK y IKK β , fosforilan proteínas IRS en sitios

inhibitorios atenuando la señalización de insulina corriente abajo. Segundo, los factores de transcripción AP1 y NFκB regulan la expresión de varios genes metabólicos que influyen en la sensibilidad a la insulina. Tercero, la señalización JNK puede regular la expresión de citoquinas post-transcripcionalmente mediante la estabilización de poblaciones de ARN mensajeros que codifican para citoquinas inflamatorias. Adicionalmente, la inflamación puede afectar la acción de la insulina indirectamente, mediante la modulación de vías metabólicas que producen “segundos mensajeros” como los ácidos grasos, que promueven la resistencia a la insulina. Por ejemplo, el TNFα estimula la lipólisis de adipocitos, contribuyendo a incrementar los niveles de ácidos grasos libres, lo cual provoca la disminución en la sensibilidad a la insulina. Otro ejemplo es la estimulación de la lipogénesis *de novo* en el hígado, generada por mediadores inflamatorios, la cual contribuye a la esteatosis y a los elevados niveles de lípidos en el suero⁷⁴⁻⁷⁷.

Para finalizar, esta convergencia de rutas no solo queda restringida al TA. Si la magnitud de producción de citoquinas excede la señalización de este tejido tornándose sistémica, se potenciará la resistencia a la insulina en los tejidos periféricos como el músculo e hígado. En este sentido, se han detectado elevadas concentraciones de TNFα, IL6, y MCP1 en el suero de individuos diabéticos, por lo que se ha postulado a estos marcadores inflamatorios circulantes, como factor de riesgo para el desarrollo de diabetes⁷⁷.

Si bien está establecido que los macrófagos son los efectores claves en la propagación de la inflamación, también está claro que los adipocitos son importantes en la iniciación de la RI. Los adipocitos no son un simple depósito de grasa, sino que son células endocrinas dinámicas que producen y secretan tanto moléculas pro-inflamatorias como anti-inflamatorias, lo cual depende del microambiente en el que se encuentran. La secreción de estos factores puede regular el reclutamiento y la activación de la población inmune del TA. Durante el desarrollo de la obesidad, los adipocitos se tornan más inflamatorios pudiendo secretar moléculas quimioatrayentes como MCP1 y LTB4. Estas proveen un gradiente quimiotáctico para el reclutamiento de monocitos que madurarán en macrófagos M1. En modelos murinos de obesidad inducida por dieta rica en grasas (HFD, del inglés High Fat Diet), rápidamente se incrementa la expresión de MCP1 en el TA al inicio de la dieta, así como los niveles en el suero luego de 4 semanas de dieta⁷³. Sumado a los macrófagos y adipocitos, otras células del sistema inmune adaptativo también se ven enriquecidas en el TA por la HFD. Por ejemplo, las células T que constituyen aproximadamente el 10% de la fracción estromal vascular en individuos sanos, se incrementan tres veces en respuesta a la HFD. Las células T se pueden categorizar basadas en su perfil funcional, las células T Helper (Th) y Th17 que son pro-inflamatorias, mientras que las Th2 y las T reguladoras (Treg) son anti-inflamatorias, en el contexto de obesidad. El número de células Th17 incrementa, mientras que la abundancia de las Th2 disminuye^{76,77}.

En vista de la relevancia actual que presenta el estado pro-inflamatorio en la disfunción del TA, así como su implicancia en el desarrollo de la resistencia a la insulina, Diabetes Tipo II, Enfermedades Cardiovasculares, arteriosclerosis, esteatosis hepática, creemos importante comprender los mecanismos que determinan el establecimiento de este estado de inflamación crónica. Profundizar en la comprensión de cuál es su origen, desarrollo y alcance es de vital importancia para el diseño de terapias paliativas contra los efectos deletéreos de la obesidad. Esta tesis intentará abordar esta temática, haciendo foco en el estudio del rol de una enzima particular, SIRT6, cuya participación en los procesos antes mencionados creemos puede ser fundamental.

Las Sirtuinas

Las sirtuinas pertenecen a un grupo de enzimas llamadas **Histonas Desacetilasas (HDAC)** y se clasifican dentro de **HDAC de Clase III**, ya que presentan un mecanismo catalítico dependiente de NAD⁺⁷⁸. Las Sirtuinas son una familia de enzimas deacilasas NAD⁺ dependientes que fueron descubiertas hace más de 40 años, como un grupo de genes homólogos al **gen Sir2** (del inglés, silent information regulator), que fue identificado como el gen que codifica para la proteína que mantenía silenciada la cromatina en las levaduras⁷⁹. En mamíferos, la familia de las sirtuinas está constituida por siete miembros involucrados en un amplio rango de procesos y rutas celulares, siendo reguladores claves en enfermedades neurodegenerativas, desórdenes metabólicos, enfermedades cardiovasculares e inflamación⁸⁰⁻⁸⁵. Se han identificado 7 genes homólogos a Sir2 de levaduras en mamíferos, las cuales presentan diferente localización subcelular y blancos moleculares, pudiendo realizar diferentes actividades catalíticas. A continuación, se detalla brevemente la ubicación, función y actividad de cada miembro de la familia, también esquematizado en la Figura 8.

SIRT1 es la sirtuina más emparentada con Sir2 y es también la que ha sido más estudiada. Es una deacetilasa principalmente nuclear, con al menos dos secuencias de localización y exportación nuclear, lo cual le confiere la capacidad de moverse entre núcleo y citoplasma. Su actividad radica en remover grupos acetilos de residuos de Lisina (K) tanto de histonas como de otras proteínas, regulando de esta forma la expresión génica y la actividad de otras proteínas, respectivamente. A través de esta actividad es capaz de controlar varios procesos celulares que incluyen la proliferación y diferenciación celular, apoptosis, metabolismo, respuesta al estrés, estabilidad genómica y sobrevivencia celular⁷⁸.

SIRT2 se localiza principalmente en el citoplasma, pero también puede moverse al núcleo durante la mitosis. En el citoplasma co-localiza con los microtúbulos, ya que desacetila α -tubulina, entre otros sustratos. Actúa regulando varias funciones celulares como la progresión del ciclo celular, muerte celular y respuesta al estrés⁸⁵.

SIRT3, SIRT4 y SIRT5 están mayormente involucradas en la regulación directa de vías metabólicas como lo demuestra su localización mitocondrial. **SIRT3** se encuentra presente en la matriz mitocondrial, pero también ha sido detectada a nivel nuclear. Esta deacilasa juega un rol crucial en el metabolismo energético y en la regulación redox, deacilando proteínas mitocondriales claves^{86,87}. **SIRT4** también posee actividad deacilasa, regulando el metabolismo de la leucina y a través de este la secreción de insulina; posee además actividad ADP ribosil transferasa NAD⁺ dependiente, transfiriendo grupos ADP ribosil a sus blancos moleculares^{88,89}. Su nivel

de expresión se ha visto asociado al estatus metabólico y cambios en sus niveles pueden afectar la viabilidad celular resultando incluso en apoptosis. **SIRT5** se ubica en la matriz mitocondrial donde presenta una actividad desacetilasa, demalonilasa y desuccinilasa NAD⁺-dependiente, participando del ciclo de la urea⁸⁵.

Por último, **SIRT7** se ubica dentro del núcleo, enriquecida en el nucléolo donde interactúa con RNA Pol I y participa en la transcripción del ADN ribosomal así como en la reparación del ADN^{90,91}. **SIRT6** será detallada en profundidad en la siguiente sección.

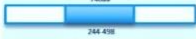
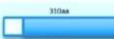
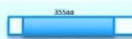
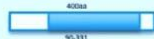
Sirtuin	Catalytic Domains	Enzymatic Function	Localization	Targets	Cellular Functions
SIRT1		Deacetylase	Nuclear, Cytoplasmic	P53, BRCA1, FOXO3a, MyoD, Ku70, PPARγ, PCAF, WRN, NBS1, SUV39H1, TGF-β, PGC-1α, H3K9, H3K14, H4K16	Energy homeostasis, differentiation, neuroprotection, DNA Repair
SIRT2		Deacetylase	Nuclear, Cytoplasmic	α-tubulin, Foxo, H4K16	Cell Cycle Regulation, tubulin deacetylation
SIRT3		Deacetylase	Mitochondrial	Hundreds of mitochondrial proteins, AceCS2, JNK2, MnSOD	ATP-production, regulation of mitochondrial homeostasis, fatty acid oxidation
SIRT4		ADP-ribosyl transferase, lipamidase	Mitochondrial	GDH, ANT	Insulin Secretion
SIRT5		Deacetylase, Desuccinylase, Demalonylase	Mitochondrial	CPS1, hundreds of mitochondrial proteins	Urea Cycle
SIRT6		Deacetylase, ADP-ribosyl transferase, deacetylase	Nuclear	Ribosyltransferase: SIRT6, PARP1, Deacetylase: TNF-α, R-Ras2, H2BK12, H3K17, H3K27, Deacetylase: H3K9, H3K56, H3K18, KAP1, CtIP, PGC-1α, TRF2, GCN5, SIRT6, PKM2	Glucose homeostasis, DNA Repair, Telomeric function, cellular differentiation, mitosis and meiosis, cancer
SIRT7		Deacetylase	Nuclear (nucleolar)	RNA Polymerase I, E1A, Smad6, H3K18	RNA Pol I dependent transcription, DNA Repair

Figura 9. Resumen de las características estructurales, enzimáticas, localización, blancos moleculares y función de las Sirtuinas⁹². Figura tomada de Chang, et al.,2020.

SIRT6: un regulador epigenético con múltiples actividades enzimáticas y un papel esencial en la regulación del metabolismo y la inflamación.

SIRT6, de localización principalmente nuclear, ha sido vinculada al control del envejecimiento, mantenimiento de la estabilidad genómica e integridad telomérica, así como la homeostasis metabólica^{92,93,96}. Participa además como regulador transcripcional y de la estructura de la cromatina, estando también implicada en la reparación del daño en el ADN. Su sobreexpresión prolonga el tiempo de vida en ratones y previene la obesidad inducida por la dieta^{93,94}. En contrapartida, su ausencia causa defectos metabólicos severos y envejecimiento prematuro⁹⁵.

Comenzaremos a profundizar en la actividad enzimática, estructura, regulación de SIRT6, para finalizar con su función en la respuesta inmune y el metabolismo.

Estructura de SIRT6

La mayoría de las Sirtuinas comparten un dominio catalítico central conservado, donde se encuentra una Histidina (**H133** en humanos) importante para su actividad desacetilasa, deacilasa y mono-ADP ribosil transferasa. El dominio catalítico está formado por 2 dominios globulares, uno grande con **plegamiento de Rossmann** típico de enzimas que unen NAD(H)/NADP(H) y uno pequeño que contiene el **sitio de unión a Zn^{2+}** . El dominio grande consiste en **6 hebras β** en hoja β paralela, con **α -hélices** flanqueando al sitio activo. El dominio pequeño está compuesto por 2 módulos: el módulo helicoidal formado por **4 α -hélice** y el **módulo de unión a Zn^{2+}** que contiene un átomo de Zn^{2+} coordinado por **4 cisteínas** (Figura 10). En el caso de hSIRT6, las cisteínas del motivo de unión a Zn^{2+} son C141, C144, C166 y C177, y presentan una estructura diferente a la de la mayoría de las Sirtuinas, lo que hace que su loop sea más flexible^{109,114}.

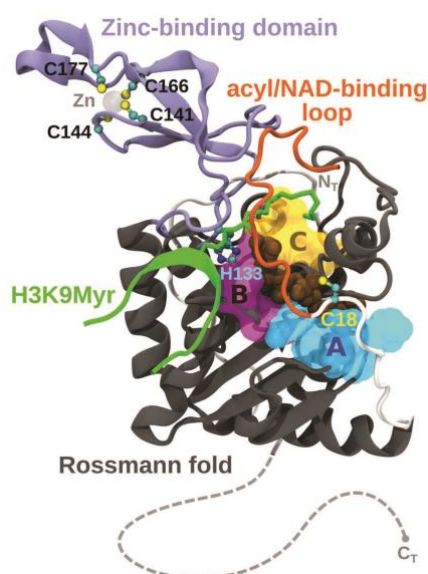


Figura 10. Estructura de SIRT6 Humana. Representación molecular de hSIRT6 con un péptido miristoileado H3K9Myr (PDB 3ZG6). Se indican las características estructurales como los dominios funcionales A, B y C, los residuos relevantes y los extremos Nt y Ct. La continuación de este último es una guía para ayudar a la visualización¹¹⁴. Figura tomada de Carreno-Bresque, et al.,2020.

En la interfase de los dos dominios, conectados por loops flexibles, se forma una hendidura formada por un bolsillo de unión a NAD⁺ y un canal de lisina. Allí se unen los sustratos. El bolsillo de unión a NAD⁺ está a su vez dividido en tres regiones: la **Región A** más expuesta, la **Región B** media y la **Región C**, más hidrofóbica y con mayor cantidad de residuos conservados. En el caso particular de SIRT6, los dos dominios principales ya mencionados, presentan una estructura más abierta y distante que otras sirtuinas, esto ocurre a consecuencia de una delección en su secuencia que genera la falta de un módulo helicoidal que es sustituido por un pequeño loop¹⁰⁹. Esta diferencia estructural sería la razón de la baja actividad desacetilasa de la enzima *in vitro*. Por otro lado, se ha visto que cuando un sustrato con grupo acilo de cadena larga se posiciona en el sitio activo (tal como indica la Figura 10), esto conduce a un

cambio conformacional, que acerca ambos dominios y permite que se incremente la actividad enzimática^{109,115}.

El dominio central de SIRT6 no es suficiente para guiar a la correcta localización y actividad catalítica de la enzima. Esto último, subraya la importancia de las extensiones amino y carboxilo terminal, respectivamente (Nt y Ct), las cuales pueden adquirir diferente conformación y sufren modificaciones post-traduccionales. Su región Nt, es crítica para su asociación a la cromatina y desarrollar su actividad catalítica intrínseca, mientras que su región Ct es esencial y suficiente para su correcta localización nuclear, pero no es necesaria para su actividad enzimática^{96,109}.

Actividades catalíticas y funciones

La primera actividad enzimática descrita es su actividad **mono-ADP-ribosil transferasa**, siendo NAD⁺ el sustrato de esta reacción. SIRT6 utiliza la ADP-ribosilación tanto para regular su propia actividad, así como para catalizar la reacción en **PARP1** (en K521) y promover la reparación del ADN bajo estrés oxidativo. También ADP-ribosila a la proteína co-represora **KAP1**. Adicionalmente, se le atribuye a SIRT6, su actividad como **histona desacetilasa**, la cual se da principalmente en residuos Lisina de la Histona H3 (H3K9 y H3K56), influyendo en el mantenimiento de la estructura cromatínica. **H3K9** es desacetilada por ejemplo en la cromatina telomérica cuando el ADN está dañado, lo cual permite el acceso de la maquinaria de reparación del ADN. Por otro lado, la acetilación de **H3K56** contribuye directamente a la biogénesis de ARN ribosomal y está conectada con la proliferación tumoral y la migración. En adición a lo mencionado, existen evidencias que señalan el reclutamiento activo de SIRT6 a varios promotores para reprimir la transcripción de los mismos, mediante la remoción de la acetilación sobre H3K9 y H3K56⁹⁷⁻¹⁰¹. En este sentido, también se ha visto que puede actuar como co-represor de algunos factores de transcripción, como **NFkB**, **HIF1α** y **c-MYC**¹⁰²⁻¹⁰⁵. Recientemente, se ha descubierto que **H3K18** también es desacetilado por SIRT6 específicamente en loci peri-centroméricos¹⁰⁶. El rol de SIRT6 como desacetilasa, no queda restringido únicamente a la histona H3, se han identificado algunos otros blancos moleculares como la acetiltransferasa **GCN5** (en K549), mediante la cual SIRT6 es capaz de regular la producción hepática de glucosa promoviendo su actividad¹⁰⁷. También puede desacetilar a **PKM2** (en K433), lo cual provoca su exportación nuclear y la supresión de sus funciones oncogénicas¹⁰⁸.

SIRT6 posee una actividad desacetilasa extremadamente baja *in vitro*, en comparación con otros miembros de su familia¹⁰⁹⁻¹¹¹. Estas características llevaron al descubrimiento de la **actividad deacilasa**, preferentemente hidrolizando ácidos grasos de cadena larga sobre lisinas específicas. De esta forma, SIRT6 actúa como deacilasa de múltiples proteínas secretadas como TNFα, entre otras^{110,111,115}. Esta actividad sobre TNFα ha sido ampliamente abordada por nosotros en este trabajo de tesis. La secreción del TNFα es facilitada por SIRT6, ya que la enzima es capaz de

remover los ácidos grasos unidos a K19 y K20, lo cual destina las vesículas con TNF α hacia los lisosomas para su degradación⁵³. Mediante este mismo mecanismo, SIRT6 es capaz de cambiar la localización de **proteínas ribosomales**, lo cual fue demostrado mediante la observación de que células embrionarias de ratón **MEF** (del inglés, *Mouse Embryonic Fibroblasts*) SIRT6 KO, tenían una menor secreción de ribosomas vía exosoma¹¹³. Finalmente, trabajos recientes han demostrado que SIRT6 también deacila a la proteína **R-Ras2**, inhibiendo su capacidad de ubicarse en la membrana plasmática, lo que desencadena corriente abajo, la inhibición de la proliferación celular¹¹².

A pesar de que se han reconocido varias actividades catalíticas de SIRT6, el rol preciso de todas ellas y sus funciones celulares asociadas, aún no se conocen completamente. El descubrimiento de la actividad deacilasa de SIRT6, ha expandido el ya amplio repertorio de roles de esta enzima. Recientemente se ha postulado que SIRT6 activamente remueve grupos acilo de H3K9, H3K56 y H3K27 pudiendo así también regular la accesibilidad de la cromatina y la transcripción génica¹¹³.

SIRT6, principalmente mediante su actividad ADP-ribosil transferasa e histona desacetilasa, participa en la reparación del ADN. Se han detectado varias alteraciones en el ADN en células SIRT6 KO, lo cual pone de manifiesto su importancia para la correcta reparación por escisión de bases y reparación del ADN en general, así como su incidencia en la inestabilidad genómica^{98,131}. Luego de que las células son expuestas al daño, la interacción de SIRT6 con la cromatina se incrementa¹³⁰. En condiciones de estrés oxidativo, JNK fosforila SIRT6 en la Ser 10, facilitando su reclutamiento al sitio de daño del ADN, donde modula la reparación del DNA por el mecanismo de corte de doble hebra **DSBs** (del inglés, *Double Strand Break*) dependiente de PARP⁹⁸. Células deficientes en SIRT6 muestran menor eficiencia en la reparación, y por el contrario, su sobreexpresión la mejora, tanto en la reparación por unión de extremos no homólogos (**NHEJ** del inglés, *nonhomologous joining*) como en la reparación por recombinación homóloga (**HR** del inglés *homologous recombination*). Además, se ha visto que SIRT6 participa en la reparación por escisión de base **BER** (del inglés, *base excision repair*), modulando los factores o regulando la accesibilidad de la cromatina. De esta forma SIRT6 es capaz de influenciar diferentes vías de reparación del ADN mediante su habilidad para modular la accesibilidad de la cromatina y su función sobre diferentes factores de reparación⁹⁷⁻¹⁰².

Adicionalmente a su rol en la reparación del ADN, SIRT6 también se puede unir a la cromatina telomérica y mediante desacetilación de H3K9 y H3K56, modular su accesibilidad⁹⁹. La ausencia de SIRT6 recapitula el Síndrome de Werner, un desorden de envejecimiento prematuro causado por mutaciones en la helicasa de WRN que repara los telómeros¹⁰⁰. SIRT6 también es importante durante la fase S del ciclo celular, donde es necesario un cambio en los niveles de acetilación de los telómeros para una correcta replicación de estos. Su depleción en células humanas resulta en

estructuras teloméricas anormales y replicación estocástica de sus secuencias, lo cual produce inestabilidad genómica, fusiones entre cromosomas y senescencia celular prematura. Así mismo, la enzima es importante en el silenciamiento de los transgenes y genes teloméricos proximales^{100,105,108}.

Finalmente, su actividad deacetilasa es importante para la represión de la expresión génica en múltiples contextos relacionados con el envejecimiento, el metabolismo y la respuesta inmune^{101,103-106, 118,136}. En particular, más adelante hablaremos sobre su represión sobre genes pro-inflamatorios regulados por **NFκB**, así como su represión sobre genes metabólicos regulados por **HIF1α**.

SIRT6 en la respuesta inmune:

En relación con las funciones inmunes de SIRT6, esta sirtuina ha sido involucrada en la **modulación de la respuesta inflamatoria**. La primera Sirtuina que se vinculó con esta respuesta fue SIRT1 con un potente rol anti-inflamatorio. Mediante desacetilación de p65/RelA en el complejo **NFκB**, SIRT1 logra inhibir la transcripción NFκB dependiente, silenciando citoquinas pro-inflamatorias¹³⁴. SIRT6 participa también de la respuesta inflamatoria, *Kawahara et al.*, (2009) plantean que durante la activación de **NFκB** por TNFα, SIRT6 es reclutada hacia los promotores de sus genes blanco e interactúa con el complejo p65/RelA. Allí, funciona como un **co-represor de NFκB**, silenciando mediante la desacetilación de H3K9, la transcripción de genes pro-inflamatorios¹⁰³. En concordancia con este trabajo y rol de SIRT6, *Xiao et al.*, (2012), en un modelo murino SIRT6 KO genérico observa inflamación crónica y fibrosis temprana a nivel del hígado, la cual se explica por falta de SIRT6 en las células T y células mieloides. Así mismo, los macrófagos SIRT6 KO derivados de médula ósea, presentan altos niveles de MCP1, IL6 y TNFα. Concluyen que SIRT6 interactúa con c-JUN, desacetilando H3K9 en sus promotores, así como lo hace con los promotores de NFκB, y de esta forma también inhibe su señalización¹³³. Ambos trabajos proponen que SIRT6 desempeña una **función anti-inflamatoria**, apagando o silenciando la respuesta inflamatoria.

Por otro lado, otras evidencias científicas relacionan a una de las citoquinas pro-inflamatorias más abundantes, el TNFα, con SIRT6 a diferentes niveles. Se ha propuesto que SIRT6 desempeña una **función pro-inflamatoria** regulando la síntesis y secreción de TNFα^{110,135}. Inicialmente *Van Gool et al.*, (2009) observaron que el NAD⁺ era necesaria para la correcta secreción de TNFα durante estímulos pro-inflamatorios. Determinaron así, que SIRT6 es la única sirtuina capaz de regular positivamente la síntesis de TNFα, ejerciendo una regulación a nivel post-transcripcional¹³⁵. Posteriormente, *Jiang et al.*, (2013) mostraron que SIRT6 cataliza la hidrólisis de grupos miristoil unidos a lisinas específicas (K19 y 20) del pro-TNFα y mediante esta actividad enzimática es capaz regular su secreción. Esta modificación post-traducciona del pro-TNFα ocurre a nivel del RE, por lo cual los autores adjudicaron por primera vez, una ubicación no nuclear para esta sirtuina¹¹⁰. Tres años después, este mismo grupo comprueba que en ausencia de SIRT6, gran parte del

TNF α es destinado hacia la degradación proteosomal por el lisosoma, siendo SIRT6 la única enzima conocida que realiza esta actividad sobre el TNF α ⁵³.

SIRT6 y la homeostasis de glucosa.

Uno de los trabajos que abre el campo del rol de SIRT6 en el metabolismo de la glucosa es el de *Mostoslavsky et al.*, (2006), donde se desarrolla un ratón KO genérico para SIRT6 que presenta una severa hipoglucemia asociada con alto consumo de glucosa del hígado, tejido adiposo marrón y músculo esquelético. Esto lleva a la muerte prematura del ratón que no alcanza las 4 semanas de vida. Estos ratones además desarrollan una serie de condiciones degenerativas que incluyen: pérdida de grasa subcutánea, linfopenia, osteopenia y cifolordosis⁹⁵. Acompañando este trabajo, *Zhong et al.*, (2010) muestra que la depleción de SIRT6 en células genera un cambio metabólico, favoreciendo la glicólisis de lactato, a expensas de un menor rendimiento de ATP y consumo de O₂. Este switch metabólico estaría dado por el incremento en los niveles de acetilación H3K9 de los promotores de genes regulados por el factor transcripcional inducible por hipoxia 1 α (**HIF1 α** , del inglés, Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha). Este factor interacciona con SIRT6 y una vez más SIRT6 funciona como un **co-represor**¹⁰⁴.

Hasta ese momento, la falta de SIRT6 tanto *in vivo* como *in vitro* generaba un consumo mayor de glucosa y los efectos de su ausencia eran nocivos. En concordancia, *Kanfi et al.*, (2010) observan que la sobreexpresión de SIRT6 en un modelo de obesidad inducida por dieta provoca una menor incidencia en el desarrollo de patologías metabólicas asociadas a obesidad, mejorando la tolerancia a la glucosa e incrementando la secreción de insulina⁹⁴.

Con el advenimiento de los modelos tejido-específico, se pudo determinar que la depleción de SIRT6 en las células B del páncreas afecta la tolerancia a la glucosa y la secreción de insulina¹³⁷. Por otro lado, la deleción de SIRT6 en el hígado agrava la esteatosis hepática, inflamación, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina^{129,138}. Para finalizar, los modelos con adipocitos SIRT6 KO también presentaban mayor sensibilidad a la dieta rica en grasas tornándose resistentes a la insulina, lo cual se atribuía a una mayor hipertrofia de los adipocitos y una mayor inflamación del tejido adiposo¹³⁹. A pesar de los avances que han significado la comprensión de la relevancia de SIRT6 en cada tejido, aún quedan varias interrogantes sobre el rol de esta enzima, algunas de las cuales intentaremos abordar en este trabajo.

Estos dos últimos apartados sobre las funciones de SIRT6 en la respuesta inmune y el metabolismo, son los puntos principales que han guiado las preguntas planteadas en este trabajo de tesis.

Regulación de SIRT6

Como ya se mencionó, SIRT6 posee una actividad desacetilasa muy baja *in vitro*, sin embargo, se incrementa cuando la enzima se asocia a **nucleosomas** nativos, lo cual sugiere que la estructura de estos puede modular la actividad de la enzima. En adición a esto, se ha observado que en presencia de **ácidos grasos** como: el **miristoilo**, **oleico y linoleico**, la afinidad de SIRT6 por sustratos acetilados se ve incrementada hasta 35 veces. Los investigadores han especulado que la unión de los ácidos grasos al bolsillo hidrofóbico de SIRT6, inhibe competitivamente la unión de los grupos acil de péptidos. Sin embargo, pequeñas moléculas como los ácidos grasos libres (FFAs del inglés, *Free Fatty Acids*) pueden estimular la eficiencia catalítica de SIRT6 e incluso activarla endógenamente¹¹³⁻¹¹⁵.

En adición a FFAs, un estudio reciente muestra que la proteína **SUMO** (del inglés, *small ubiquitin -like modifier*) puede depositar modificaciones post-traduccionales en SIRT6 y modular su actividad desacetilasa. En particular, la sumoilación regula la desacetilación sobre H3K56 y no H3K9¹¹⁷.

Por otro lado, la transcripción y traducción de SIRT6 también están reguladas. Varios factores regulan la expresión del gen *Sirt6*, por ejemplo, **c-FOS** se une a **AP1**, unida a la secuencia TAAGTCA en el promotor de *Sirt6* y activa así la expresión de este, en la vía de supresión tumoral¹¹⁸. También se ha visto que SIRT6 es regulado a la baja por varios factores cromatínicos, **PARP1** podría inhibir la expresión del gen ya que su inhibición, resulta en mayores niveles de ARN mensajero de *Sirt6*¹¹⁹. Otro factor que inhibe su expresión es el factor de transcripción **E2F1**. Este factor se une al promotor de *Sirt6* y suprime la expresión de la enzima bajo condiciones de normoxia o hipoxia en cultivos celulares¹²⁰. También la expresión de SIRT6 se ha visto alterada *in vivo* en embriones o células madre neurales a consecuencia de diabetes materna, e *in vitro* por altos niveles de glucosa¹²¹. Para finalizar, los niveles de ARNm de *Sirt6*, también son modulados mediante ARN de interferencia, lo que afecta la estabilidad del mensajero. Específicamente, la expresión de varios microARNs, **miR-34a**, **miR-34b**, **miR-122** y **miR-766**, se han correlacionado negativamente con la expresión de SIRT6^{92,122-124}.

A nivel proteico, la estabilidad de la proteína es también regulada, mayormente a través de la degradación vía proteasoma. Para marcar a SIRT6 para su degradación proteosomal, la quinasa **AKT1** fosforila SIRT6 en la Ser 338, lo cual induce su ubiquitinación por **MDM2**¹²⁵. Por otro lado, la ubiquitina ligasa **CHIP** presenta un rol protector de la estabilidad de SIRT6. En células KO para CHIP, la vida media de SIRT6 se reduce sustancialmente ya que se incrementa su degradación proteosomal¹²⁶. Una peptidasa ubiquitina específica, **USP10**, también se ha visto involucrada en la protección de SIRT6 contra la degradación proteosomal^{92,127}.

Terminando esta sección, se ha visto que tanto la privación de nutrientes en cultivo, como la restricción calórica *in vivo* en ratas y ratones, son capaces de incrementar los

niveles de SIRT6, al parecer mediante la supresión de las rutas de degradación proteosomal¹²⁸. Acompañando, SIRT1 también es capaz de regular la expresión de SIRT6 mediante la formación de un complejo con FOXO3a y NRF1 en el promotor de SIRT6⁹².

Hipótesis y Objetivos

La sirtuina 6 tiene un rol en la respuesta inflamatoria que aún no ha sido completamente dilucidado, **nuestra hipótesis** propone que la enzima frente a estímulos inflamatorios agudos tiene un rol pro-inflamatorio activo y estrictamente regulado en macrófagos, que no ha sido abordado exhaustivamente en la literatura científica y requiere una comprensión más profunda. Este rol pro-inflamatorio podría también ser parte de los efectos pro-inflamatorios crónicos que ocurren durante la obesidad. En el transcurso de este trabajo de doctorado intentaremos contrastar nuestra hipótesis y para ello nos hemos propuesto un objetivo general que engloba 4 objetivos específicos que detallaremos a continuación.

Objetivo general

En este trabajo de tesis nos propusimos profundizar el conocimiento de la biología de SIRT6 en el contexto inflamatorio, intentando comprender su rol en los procesos inflamatorios agudos y crónicos. Así mismo, analizamos su potencialidad como posible blanco terapéutico para el tratamiento de inflamación crónica que ocurre durante la obesidad.

Objetivos específicos

Para cumplir con el objetivo general, nos propusimos desarrollar los siguientes objetivos específicos (OE):

- 1.** Estudiar el efecto de un estímulo pro-inflamatorio, LPS, en la expresión, localización sub-celular y actividad enzimática de SIRT6 *in vitro* e *in vivo*. Determinar cómo es regulada en este contexto.
- 2.** Investigar el papel de SIRT6 en la inflamación crónica en un modelo *in vitro* e *in vivo* en la inflamación crónica en ratones obesos.
- 3.** Generar un modelo animal transgénico tejido-específico KO para SIRT6 en macrófagos y realizar una caracterización del mismo en el contexto de inflamación inducida por obesidad.

Estos tres primeros objetivos se enmarcan y presentan en el **Capítulo I** de la tesis. (Posterior a la defensa de la tesis se agregó a este documento el manuscrito donde se publicaron estos resultados).

- 4.** Estudiar la potencialidad de los ácidos grasos nitrados como moduladores de la actividad de SIRT6. Los resultados de este objetivo específico se presentan en el **Capítulo II** de la tesis junto al artículo publicado con dichos resultados.

Materiales y Métodos

Comenzaremos esta sección haciendo una breve descripción de los abordajes metodológicos generales, para luego pasar a las actividades y protocolos particulares dentro de cada objetivo específico. Las técnicas utilizadas junto a los compuestos y equipos que permitieron el desarrollo de este trabajo se detallan al final.

Aspectos Generales

Para cumplir con los diferentes objetivos propuestos utilizamos abordajes experimentales *in vitro* e *in vivo* de forma de afrontar las preguntas planteadas a diferentes niveles de complejidad.

Para los estudios *in vitro* se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), macrófagos de médula ósea (BMDM), así como la línea celular de macrófagos murinos Raw 264.7. En estos, se estudió la expresión de SIRT6 en respuesta al LPS. La selección de estas líneas estuvo dada por la disponibilidad de estas, así como por contar con controles SIRT6 KO en cada uno de los casos. También se utilizó la línea HEK293FT para los estudios de sobreexpresión de SIRT6 y análisis de la modulación de su actividad por los NO₂OA. En estos experimentos la selección de la línea HEK293FT fue determinada debido a sus facilidades para la sobreexpresión de plásmidos.

Para los estudios *in vivo* se utilizaron ratones C57BL/6J, los cuales fueron sometidos a una dieta rica en grasas y azúcares, llevándolos a un contexto pro-inflamatorio crónico. En este grupo de animales se midieron parámetros metabólicos e inflamatorios, que se correlacionaron con el análisis de la expresión de SIRT6. Adicionalmente generamos un modelo murino transgénico KO para SIRT6 en macrófagos e inducible por Tamoxifeno. Este modelo se caracterizó y evaluó en el contexto previamente mencionado. Los ratones utilizados en esta tesis fueron desarrollados, mantenidos y monitoreados en la Unidad de Biotecnología en Animales de Laboratorio (UBAL) del Institut Pasteur de Montevideo.

Todos los procedimientos experimentales realizados fueron aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Institut Pasteur Montevideo enmarcados en los protocolos 006-19 y 003-19.

Actividades específicas

Objetivo específico 1 (OE1): Estudiar el efecto de un estímulo pro-inflamatorio en la expresión, localización sub-celular y actividad enzimática de SIRT6. Determinar cómo es regulada en este contexto.

1.1 Evaluación de los cambios en la expresión de SIRT6 en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio.

El estímulo pro-inflamatorio utilizado en todos los casos fue el LPS (E Coli 0127 B8, Sigma L3129). Tanto para los MEF, cuya obtención se detalla más adelante, como para los macrófagos Raw 264.7 (TIB-71™, ATCC) se estudiaron diferentes tiempos de respuesta a LPS, evaluando niveles de expresión de SIRT6 mediante WB (Western blot) y qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa), y relacionándolos con la expresión de TNF α a nivel celular por WB e Inmunofluorescencia (IF) y extracelular en los medios de cultivo mediante ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas).

Aislamiento de MEF. Se siguieron los protocolos estándar para la obtención de MEF¹⁴⁰, los fibroblastos fueron aislados de una hembra preñada de entre 13.5-14.5 días de gestación. Se abrió el saco gestacional y se aislaron los embriones, a los que se les saca la cabeza, hígado y corazón. Se disgregaron los tejidos y se incubó toda la noche (ON) con Tripsina 0.25%. Al día siguiente, se removió la tripsina hasta dejar 2 volúmenes de esta en relación con el sedimento y se incubó este último a 37°C durante 1h. Luego de la incubación, se centrifugó la suspensión y se cultivó el pellet en medio DMEM alto en glucosa, suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), 2mmol/L glutamina, 100U/mL penicilina-estreptomicina y 10mM de Hepes, a una razón de 5 placas 10cm por embrión. A este medio lo llamamos DMEM completo. Se dejan las placas en DMEM completo hasta el otro día en estufa de cultivo humidificada y con 5% CO₂. 24h después, las células se encuentran cerca de la confluencia y se considera el pasaje 0, se congelan los viales en SFB conteniendo 10% Dimetilsulfóxido (DMSO).

Tanto las células MEF como los macrófagos murinos Raw 264.7 se descongelaron del Nitrógeno líquido y crecieron en medio DMEM Completo en estufa de cultivo humidificada y con 5%CO₂. Todos los experimentos en MEF se realizaron en pasajes 2-5 y en macrófagos Raw 264.7 pasajes entre 15-22.

En los ensayos con LPS, las células se plaquearon 2 días previos en DMEM Completo y 24h antes del experimento se cambió por medio DMEM conteniendo 0.1% SBF. Los estímulos de LPS se realizaron a una dosis de 200ng/ml en medio DMEM 0.1% SBF y se levantaron las células a los tiempos deseados: 1, 6 y 24h, dependiendo del interés de cada experimento. Estos ensayos fueron repetidos al menos 3 veces en cada línea celular.

Al finalizar el experimento, se realizaron dos lavados con PBS frío, se levantan las células con rastrillo, se centrifugan 5 min 1500 rpm y se congela el pellet a -80°C para su posterior procesamiento. Este procedimiento se repitió en todos los ensayos que se continuaron con la lisis, cuantificación y tratamiento de muestras para WB, que detallaremos más adelante. En el caso de los ELISA para diferentes citoquinas, se congelaron los sobrenadantes (SBN) para su posterior análisis. Para los ensayos realizados por qPCR, luego de los lavados con PBS se levantaron las células en TRIzol (Invitrogen, 15596026) y se congelaron las muestras a -80°C para su posterior procesamiento.

1.2 Estudio de la localización sub-celular de SIRT6 y su potencial re-localización en la respuesta inflamatoria.

Se evaluó la localización sub-celular de SIRT6 en respuesta a LPS (200ng/ml) mediante IF y microscopía confocal, para su posterior análisis y cuantificación de intensidad de fluorescencia en diferentes compartimentos celulares con el software ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018). Se utilizó un marcador de Retículo Endoplasmático (RE)(Invitrogen, E34250, 1μM) para evaluar co-localización con SIRT6, también se utilizó DAPI (Sigma, D9542) y la proteína vegetal que se asocia a filamentos de actina, Falloidina, unida a Alexa546 (Invitrogen, A22283) para identificar dominios nucleares y citoplasmáticos, respectivamente. Estos ensayos se llevaron adelante principalmente en macrófagos Raw 264.7.

En los ensayos de LPS, las células fueron plaqueadas sobre cubreobjetos en placas de cultivo de 24 pocillos. Tal como se detalló, el día previo al experimento se cambiaba el medio a 0.1% SBF, realizando los estímulos de LPS a las dosis ya mencionadas. Una vez finalizado el experimento, los cubreobjetos se fijaron con Paraformaldehído (PFA, AppliChem, A3813) al 4% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. En los casos en que se utilizó el marcador de RE, este se pre incubó 30 min antes de la finalización del estímulo. La fijación para estas células se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante, durante 5 min a 37°C. Una vez fijadas las células, se realizaron lavados consecutivos con PBS previo a guardar las muestras para su posterior marcación a 4°C.

Para los análisis de cuantificación de las señales de SIRT6 y TNFα en ImageJ se realizaron las cuantificaciones en 10 planos sumados en el eje Z (proyección sumatoria). La señal a nivel nuclear fue medida utilizando una máscara binaria con la señal de DAPI que permitió la selección semi-automática de las regiones de interés (ROI) nucleares. Posteriormente, también se analizó la señal de SIRT6 en dominios citoplasmáticos en la proyección sumatoria. En este caso se seleccionaron los ROIs de forma manual evitando dominios nucleares y corroborando estar dentro del citoplasma de la célula. Los gráficos muestran Intensidad Media de Fluorescencia. Para los análisis del coeficiente de colocalización de Manders se utilizó el plug in Coloc

2 (<https://imagej.net/plugins/coloc-2>). Estos análisis se realizaron en planos únicos, que fueron seleccionados en base a la presencia de una señal clara de RE. En ellos se aplicó un umbral automático generado por el plug in Coloc 2 en cada célula analizada. Los gráficos expresan el coeficiente de Manders M1, ajustado con el threshold automático (tM1).

Complementariamente, se realizaron ensayos de fraccionamiento sub-celular en macrófagos Raw 264.7 para obtener fracciones enriquecidas en núcleo y citoplasma, en las que se evaluó la presencia y respuesta al LPS mediante WB. A continuación, se detalla el protocolo para la realización del fraccionamiento luego de 1h de incubación con LPS.

Fraccionamiento Núcleo-Citoplasma. Luego de la incubación con LPS, se levantaron las células con rastrillo en 1 ml de PBS. Se centrifugaron 3 min a 500 g para resuspender el pellet en con un buffer hipotónico (Hepes 10 mM, 1mM EDTA, 0.1mM EGTA con 3%Tritón X-100). Una vez resuspendido el pellet, se transfirió el sobrenadante al homogeneizador mecánico y se realizaron 10 golpes. Luego, el SBN se agitó en vortex durante 10 sec. Se corroboró que las membranas celulares estuvieran rotas observando al microscopio. Posterior a esto, se centrifugó la suspensión durante 10 min a 13000g, obteniendo así la *fracción nuclear* (FN). El SBN contenía la *fracción citosólica* (FC). Más adelante, la FN se suspendió en buffer RIPA más inhibidores, que fue sonificado durante 1 min con pulsos de 10 y descansos de 5 segundos a baja potencia. Finalmente, se centrifugó durante 10 min a 10000g, obteniendo en el SBN la fracción nuclear final.

1.3 Estudio de la estabilidad de SIRT6 y comparación con LPS.

Se evaluó el tiempo de vida de SIRT6 utilizando el inhibidor del proteasoma MG132 (abcam, ab141003) a una dosis de 10 μ M y el inhibidor de la síntesis proteica, CHX (Sigma, C6255) a una dosis de 1 μ g/ml. Se estudiaron las dinámicas de degradación y acumulación de SIRT6 en respuesta a tratamientos con MG132 y CHX a diferentes tiempos midiendo sus niveles por WB. Estos experimentos se realizaron tanto en células MEF y macrófagos Raw 264.7. Para la realización de estos se plaquearon las células en DMEM Completo y se realizaron los tratamientos con los compuestos en DMEM 0.1% SBF. Dado que ambos compuestos se disuelven en DMSO (Sigma, D6418), los controles se realizaron con medio DMEM conteniendo DMSO a la misma dilución en la que se pone con el compuesto. En la evaluación de los tratamientos mediante WB, se utilizaron como controles proteínas de vida media corta como P27 y Ciclina B1 que permitieron la constatación del tratamiento de CHX. En el caso del tratamiento con MG132 se utilizó el marcador de Ubiquitina para confirmar su correcto funcionamiento (en la Tabla 1, se muestran los números de catálogo y las diluciones de los anticuerpos mencionados). Posteriormente a estos experimentos, se realizó una comparación de los efectos generados por el MG132 y

el LPS por separado y juntos en cultivo, midiendo los niveles de SIRT6 mediante WB. En este caso también se utilizaron los controles previamente mencionados.

Anticuerpos	Código	WB	IF
SIRT6 (D8D12)	CS#12486	1:1000	1:50-1:100
SIRT6 (EPR18463)	ab191385	1:1000	1:200
TNF α (EPR19147)	ab183218	1:1000	1:800
H3 (D2B12)	CS#4620	1:2000	
H3K9 (C5B11)	CS#9649	1:1000	1:200
H3K56	ab76307		1:200
USP10	CS#5553	1:1000	
SQSTM1/p62	CS#23214	1:1000	
STUB1/CHIP	ab2917	1:1000	1:200
B1 Cyclin	CS#41385	1:1000	
P27	CS#36885	1:1000	
Ubiquitin	CS#29785	1:1000	
Tubulin	T6074	1:5000	
Actin	A5441	1:5000	

Tabla I. Anticuerpos, origen y diluciones utilizadas para WB e IF. Dentro del código se encuentra también la compañía que lo produjo, CS para anticuerpos comprados a Cell Signaling, ab comprados en abcam y los últimos dos anticuerpos fueron obtenidos de la empresa Sigma.

1.4 Estudio de la inhibición de la actividad enzimática de SIRT6 y sus consecuencias en la respuesta inflamatoria.

Se evaluaron los niveles de actividad deacilasa de la enzima a nivel nuclear en respuesta a LPS utilizando como medida indirecta de su actividad la acetilación en H3K56 (blanco reconocido de SIRT6). La cuantificación se realizó de la misma forma en que se cuantificó la señal de SIRT6 nuclear ya explicado previamente.

Se realizaron los ensayos en macrófagos Raw 264.7 utilizando el Inhibidor específico de SIRT6: 2,4-dioxo-N-[4-(pyridin-3-yloxy)phenyl]-1,2,3,4-tetrahydroquinazoline-6-sulfonamide (Chemspace, CSC000732205)¹⁴⁴. Para ello se plaquearon las células dos días previos al experimento en DMEM Completo y el día anterior se cambió por medio con 0.1% SBF. El día del experimento se incubó el Inhibidor de SIRT6 (200 μ M) 1h previa al estímulo de LPS 1h. En el SBN se evaluó TNF α mediante ELISA. Adicionalmente, se analizaron los niveles intracelulares de TNF α mediante WB y su distribución intracelular mediante IF. La concentración y el anticuerpo utilizado para estos experimentos se encuentran en la Tabla I.

1.5 Estudio del comportamiento de SIRT6 in vivo en respuesta a estímulos pro-inflamatorios en el peritoneo y consecuencias de su inhibición.

Se evaluó la respuesta a LPS en células del peritoneo de ratones C57BL/6J adultos machos, sometidos a inyecciones intraperitoneales de LPS (10mg/kg). Se realizaron IF y microscopía confocal en las células peritoneales, donde se cuantificó la señal de SIRT6. Así mismo, se realizaron qPCR y se midieron los niveles de TNF α mediante ELISA en el lavado del peritoneo. Adicionalmente, con la población de células obtenidas del peritoneo se realizó citometría de flujo.

Se utilizó el mismo protocolo experimental con ratones C57BL/6J adultos machos, pero administrando previamente el inhibidor de SIRT6 (30mg/Kg) con el fin de evaluar los niveles de TNF α secretado al peritoneo mediante ELISA.

Para finalizar, se realizó una curva de sobrevida en ratones C57BL/6J adultos machos, sometidos a una inyección letal de LPS (20mg/Kg), administrados o no con el inhibidor de SIRT6 (30mg/Kg). Estos análisis fueron realizados en colaboración con la Dra. Paola Contreras y Cecilia Villaseca de Facultad de Medicina, Dpto. de Fisiología, UdelAR (protocolo n° 70153-000839-17). Los ratones fueron trasladados al bioterio de Facultad de Medicina, donde luego de unos días de aclimatación, fueron pesados e identificados a través de marcas en las orejas. Una vez realizada la inyección de LPS, se evaluó el tiempo de vida posterior a la misma, monitoreando cada 12 h supervivencia, peso, apariencia y movimiento de los animales. Con estos parámetros se obtiene un valor numérico que permite determinar el estado del animal y tomar la decisión de eutanasia en casos de puntaje elevado (Tabla II).

Disminución del peso	0%	< 10%	10-20 %	>20%
	0	1	2	3
Apariencia física	normal	secreción ocular y/o pelo erizado y/o dorso encorvado		
	0	1		
Movimiento	normal	reducido	inmovilidad	inmovilidad c/posición anormal
	0	1	2	3
Si la suma de los 3 parámetros evaluados da > 5 se procederá a la eutanasia del animal.				

Tabla II. Parámetros medidos para determinar la eutanasia del animal.

Objetivo específico 2 (OE2): Investigar el papel de SIRT6 en la inflamación crónica en un modelo *in vitro*, así como en la inflamación crónica en ratones obesos.

2.1 Estudio de SIRT6 en células con fenotipo senescente.

Estos análisis se realizaron en cultivos *in vitro* de fibroblastos humanos IMR90 con sobreexpresión RAS, obtenidas de la colaboración con el grupo de la Dra. Celia Quijano, Dpto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR. En ellos se evaluó la expresión y localización SIRT6 mediante WB, qPCR e IF.

2.2 Análisis *in silico* del promotor de SIRT6 y uno de sus posibles reguladores.

Con el objetivo de estudiar la posible regulación de SIRT6 mediante factores de transcripción conocidos, se realizaron análisis *in silico* de las secuencias promotoras de SIRT6 presentes en *Homo sapiens* y *Mus musculus* (NG_047153.1 y NC_000076.7, respectivamente). Dichos promotores fueron alineados y sobre una región homóloga se estudió la presencia de secuencias consenso de unión a Factores de Transcripción mediante la herramienta PROMO (<http://algggen.lsi.upc.es>)¹⁴². PROMO es un laboratorio virtual para la identificación de Sitios de Unión de Factores de Transcripción (TFBS) sobre secuencias de ADN. Los TFBS se encuentran definidos en la base de datos TRANSFAC, la cual contiene datos publicados demostrados experimentalmente, sobre factores de transcripción eucariotas, sus sitios de unión al ADN y sus genes regulados¹⁴³. Para corroborar la predicción que arrojó PROMO, se analizaron experimentos de ChIP-Seq para NFκB (p65) previamente publicados por otros investigadores, realizando sobre las secuencias identificadas un análisis mediante HOMER (<http://homer.ucsd.edu/homer/>). Estos últimos análisis se realizaron en colaboración con la Dra. Luisa Berná, de la Unidad de Biología Molecular del IPMON.

2.3 Estudio de SIRT6 en un modelo de inflamación crónica inducida por obesidad.

Se evaluó un grupo de ratones C57BL/6J adultos que fueron alimentados con una dieta rica en grasas y azúcares *ad libitum* (que llamamos Western Diet), en comparación con un grupo control con dieta estándar (Lab Diet, dieta 5K76). La dieta utilizada en el grupo Western Diet (WD) (Test Diet, 5TJN, <http://www.youngli.com.tw/ezfiles/youngli/img/img/101191/5TJN.pdf>) presenta un perfil nutricional compuesto por: 18.3% de proteína, 19.9% de grasa, 7% de fibra y 49.5% de carbohidratos. Sumado a esta, se le agregó agua azucarada compuesta por 18.9g/L de glucosa (Droguería Industrial Uruguaya) y 23.1g/L de fructosa (El Naranja).

Hasta el comienzo de la dieta WD, los ratones recibieron agua y ración estándar estériles *ad libitum*. A las 12 semanas de vida se comenzó la administración de WD la cual se continuó durante 10 semanas. En el transcurso del tratamiento se evaluaron semanalmente los pesos y la glucemia basal en sangre (como indicador del manejo

de la glucosa) usando un glucómetro manual (AccuChek, Roche). También se realizaron análisis de sangre mediante Hemograma (Hemato Contador Mindray BC-5000 Vet). Al finalizar los tratamientos, los ratones fueron sacrificados por sobredosis de anestésicos con una combinación de Ketamina (Unimedical) y Xilacina (Richmond Vet Pharma) en dosis de 120mg/Kg y 16mg/Kg, respectivamente. En el tejido adiposo abdominal se evaluó la expresión de SIRT6, así como en la fracción estromal vascular (FEV). Se realizó además un análisis de esta misma fracción por citometría de flujo, separando los macrófagos para en ellos evaluar la expresión de SIRT6. A continuación se detalla brevemente como es el protocolo de aislamiento de FEV.

Aislamiento de Fracción Estromal Vascular. Una vez que el ratón fue sacrificado, se abrió el peritoneo y se aisló tejido adiposo visceral inguinal en un tubo que permite la disgregación del tejido. Se calculó 3mg de Colagenasa de Tipo II (Gibco, 17101-015) por g de tejido adiposo. La colagenasa fue diluida en medio HBSS a una solución 1mg/ml. El tejido aislado se sumergió en colagenasa y se disgregó con tijeras. Una vez disgregado, se digiere con la colagenasa en baño húmedo a 37°C durante 30 min, realizando vortexeos cada 10 min. Luego de esta incubación, se realizó una centrifugación durante 10 min a 1200 rpm. Terminada la misma, se aspiró la fracción con los adipocitos que quedaron en la parte superior del tubo, así como solución de colagenasa. La FEV se re-suspendió en PBS, se volvió a centrifugar 5 min a 1200 rpm, se retiró el SBN y se congeló para su posterior tratamiento. En el caso de los experimentos que se continúan con citometría de flujo, las células fueron contadas para su posterior marcaje.

Objetivo específico 3 (OE3): *Generar un modelo animal transgénico KO para SIRT6 en macrófagos y caracterizarlo en el contexto de inflamación crónica.*

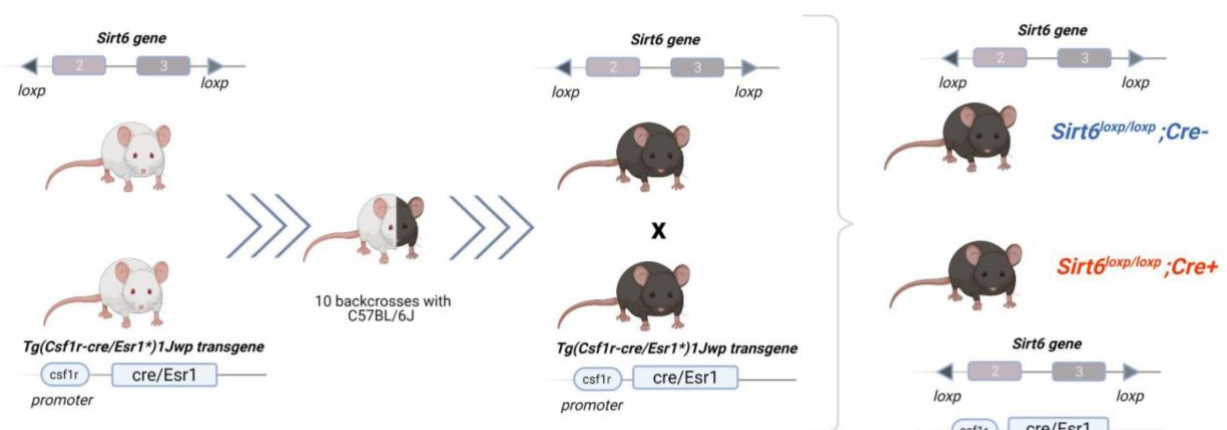
3.1 Desarrollo de un modelo animal transgénico con macrófagos KO para SIRT6.

Se obtuvieron los ratones FLOX-SIRT6 (17334, <https://www.jax.org/strain/017334>) y los ratones transgénicos Tg(Csf1r-Mer-iCre-Mer)1Jwp (019098, <https://www.jax.org/strain/019098>) ambos de Jackson Laboratories. Previamente a cruzar los ratones entre sí, se llevó a cada ratón a fondo genético C57BL/6J mediante 10 retro cruza sucesivas con animales C57BL/6J brindados por la UBAL del IPMON. Fueron necesarias realizar las retro cruza ya que el fondo genético de ambos ratones era diferente a los fondos con que veníamos trabajando y al mismo tiempo, no eran adecuados para realizar estudios metabólicos. La obtención de los ratones en el fondo deseado llevó 3 años. Cada retro-cruza implicaba la selección de ratones heterocigotas para Sirt6^{loxp/+} y hemicigotas para Csf1r-iCre (Cre+). A continuación, detallaremos el protocolo de aislamiento de ADN desde la biopsia de cola de ratón, así como los cebadores y los ajustes para el genotipado de los animales mediante PCR. Junto a la biopsia de cola de ratón se realizaba la marcación del animal para luego poder correlacionar el genotipo y el número individuo. El código de marcación utilizado fue el recomendado por la “Guía para el manejo de roedores” proporcionada por la UBAL, IPMON.

Aislamiento de ADN y PCR. Las biopsias de cola de ratón se realizaron entre la semana 3-4 de vida. Las muestras fueron digeridas en buffer de lisis (Tris ph 8 10mM, NaCl 100mM, EDTA ph 8 10mM, 0.5% SDS y Proteinasa K 500µg/ml) ON a 37°C. Al otro día, se agregaron 300 µl NaCl 5M y se incubaron las muestras 10 min en hielo. Posteriormente se centrifugaron 10 min a 10000 g y se traspasó el SBN a un nuevo tubo que contiene ETOH 95%. Luego de la precipitación del ADN, se centrifugó a 14000 g durante 10 min. Se realizaron lavados del pellet con ETOH 70%, previo a suspenderlo en H₂O mq. Se cuantificó la cantidad de ADN obtenida y se dejaron las muestras a una concentración de 25 ng/µl.

Las PCR se realizaron siguiendo los protocolos y cebadores recomendados por Jackson Laboratories, siguiendo el programa de PCR recomendado para genotipar a los ratones *Sirt6*^{loxP/loxP}, en ambos casos. Las secuencias de los cebadores utilizados se detallan a continuación. Para *SIRT6*, F: 5' AGTGAGGGGCTAATGGGAAC 3', R: 5' AACCACCTCTCTCCCCTAA 3'. Para *Csf1R-iCre*, Transgene F: 5' AGATGCCAGGACATCAGGAACCTG 3', Transgene R: 5' ATCAGCCACACCAGACACAGAGATC 3'. La Taq Polimerasa utilizada fue de Invitrogen (10342-020) y el termociclador Labnet MultiGene OptiMAX.

Para iniciar el diseño del ratón transgénico KO para *SIRT6* se seleccionaron los dos ratones que ya mencionamos al inicio de esta sección, y que se muestran a continuación.



Esquema representativo de la creación de ratón Transgénico *SIRT6* KO en macrófagos.

Representación de los pasos que llevaron a la obtención del modelo murino. Ambos ratones fueron llevados a fondo genético C57BL/6J y luego de las 10 retro cruza se cruzaron ambos ratones entre sí para la obtención de dos ratones: *Sirt6*^{loxP/loxP};Cre⁻ y *Sirt6*^{loxP/loxP};Cre⁺.

El ratón FLOX-*SIRT6* presenta los exones 2-3 del gen de *Sirt6* en el cromosoma 10 flanqueados por sitios *loxP* (*Sirt6*^{loxP/loxP}). Los ratones disponibles comercialmente son homocigotas y luego de las retro cruza, se volvieron a obtener en homocigosis para los posteriores cruzamientos. Por otro lado, los ratones transgénicos *Tg(Csf1r-Mer-iCre-Mer)1Jwp*, expresan *iCre* bajo el promotor del receptor *Csf1r* (del inglés, Colony

Stimulating Factor 1 Receptor) inducible por Tamoxifeno. La expresión de este receptor *Csf1r* ocurre en macrófagos derivados de médula ósea y del saco vitelino. Los ratones disponibles comercialmente son hemicigotas y se mantuvieron en hemicigosis durante las retro cruza y para los posteriores cruzamientos. Del cruce de ambos ratones, obtuvimos ratones cuyos macrófagos derivados de médula ósea y saco vitelino, en respuesta a Tamoxifeno, indujeron la translocación de la iCre al núcleo y escindieron un fragmento del gen de *Sirt6* (exones 2-3), dando como resultado macrófagos KO para SIRT6. Para ello realizamos los siguientes cruces:

1. Cruzamiento de parentales:

$Sirt6^{loxP/loxP}$ (salvajes para el Transgén icre) $\times$ $Sirt6^{+/+};Cre^{+}$ (salvajes para el gen loxP)

F1: 100% heterocigotas para el locus loxP ($Sirt6^{loxP/+}$) y 50% hemicigotas para el Tg Cre(Cre^{+}). Seleccionamos ratones: $Sirt6^{loxP/+};Cre^{+}$.

2. Retrocruza:

$Sirt6^{loxP/loxP}$ (salvajes para el Transgén icre) $\times$ $Sirt6^{loxP/+};Cre^{+}$ (producto de la F1)

F2: 50% de descendencia homocigota para loxP ($Sirt6^{loxP/loxP}$) y dentro de este grupo el 50% serán hemicigotas para el Tg Cre $^{+}$. Seleccionamos ratones: $Sirt6^{loxP/loxP};Cre^{+}$

3. Cruce de fundadores:

$Sirt6^{loxP/loxP}$ (salvajes para el Transgén icre) $\times$ $Sirt6^{loxP/loxP};Cre^{+}$ (producto de la F2)

F3: 100% de descendencia homocigota para loxP ($Sirt6^{loxP/loxP}$) y dentro de este grupo el 50% serán hemicigotas para el Tg Cre $^{+}$.

Una vez obtenidos los parentales, se fundó la colonia y se inició el análisis del modelo, que veremos a continuación. Ambos ratones obtenidos del cruce 3 se utilizaron para realizar los experimentos.

3.2 Confirmación del modelo animal transgénico con macrófagos KO para SIRT6.

Se realizaron cultivos de macrófagos derivados de médula ósea BMDM para constatar la ausencia de SIRT6 mediante la adición al cultivo de 4-OH-Tamoxifeno ((Z)-Hidroxytamoxifen-TAM, Sigma, H7904).

Cultivo de macrófagos de Médula Ósea (BMDM). Se sacrificó un ratón de 8 semanas *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* mediante dislocación cervical. Se diseccionan miembros superiores y posteriores para recuperar tibia y fémur, los cuales se limpiaron con ETOH 70% y se llevaron a la cabina de flujo laminar de cultivos primarios. Para extraer la médula ósea se cortaron las epífisis de los huesos, y se perfunde el canal medular con 3 ml de DMEM completo utilizando una jeringa estéril. Se re-suspendió varias veces el volumen de medio de forma de romper los agregados celulares, se centrifugó la suspensión de células obtenidas y se plaquearon en 12 placas de Petri en un medio que contenía 30% de L-Cell (generado previamente de Fibroblastos L929), 20% de SBF, 50% DMEM, 100U/mL penicilina-estreptomicina y 10mM de Hepes. Se dejaron crecer y diferenciar durante 7 días.

Para verificar que los macrófagos fueran efectivamente *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* se agregó 4-OH-Tamoxifeno el día 6 (2μM) y luego se midieron las concentraciones de SIRT6 mediante WB y qPCR. Para los estudios en ratones, se utilizó una dosis de Tamoxifeno (Sigma, T5648) empleada previamente en nuestro laboratorio para otro modelo animal y recomendada por la literatura. El tamoxifeno se diluye en aceite de trigo (Sigma, C8267) ON en agitación a 37°C. Se utilizó una dosis de 50mg/Kg subcutánea, la cual fue inyectada sucesivamente durante 7 días. Al día 8, se corroboró el silenciamiento de SIRT6 en los macrófagos obtenidos del lavado del peritoneo mediante citometría de flujo (el esquema de administración se encuentra en la Figura 25A).

3.3 Estudio de la prevención del desarrollo de la inflamación crónica en el modelo *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* bajo Western Diet.

Los ratones *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* y sus controles *Sirt6^{loxP/loxP};Cre-* (*Sirt6^{loxP/loxP}* que no posee el Tg) fueron sometidos a WD, detallada previamente en la sección 2.3. Durante 10 semanas se monitoreo el estado general de los animales midiendo peso y glucemia. En la semana 8 comenzaron las inyecciones i.p de Tamoxifeno (50 mg/Kg) a ambos grupos de ratones. Se registró el peso y glucemia, así como la composición de la sangre periférica mediante Hemograma. Se realizaron las inyecciones 3 días consecutivos, se dejaron 4 días de descanso, y se repitió el esquema de las inyecciones una semana más.

En la semana 10 se realizó el sacrificio de los animales, mediante exceso de anestésicos y se preservó: Hígado, Grasa Abdominal, Riñón, Páncreas y Músculo

esquelético, a -80°C para su posterior análisis. También se obtuvo sangre para la realización de ELISA y análisis de función hepática y renal (MNCHIP, Analizador de bioquímica sanguínea PointcareV3). Del tejido adiposo abdominal de estos animales, se aisló la FEV, la cual fue evaluada mediante citometría de flujo. Adicionalmente, se realizó un lavado del peritoneo en el cual se evaluó la cantidad de $\text{TNF}\alpha$ mediante ELISA.

Protocolos generales:

Western Blot. Las células fueron lisadas en buffer RIPA (25mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS) suplementado con NaF 5mM, Nicotinamida 5mM, β -glicerofosfato 50mM, 1 μ M Tricostatina A e inhibidor de proteasas (Sigma, S6776, N0632, G9422 y S8830, respectivamente). Para la obtención de proteínas, el pellet celular fue re-suspendido en RIPA y sonificado a baja potencia con 1 ronda de 6 pulsos en 1 min. Luego se incubó durante 20-30 min a 4°C en agitación. Se centrifugaron las muestras a 10000 g 10 min a 4°C , conservando el SBN, para la cuantificación de proteínas. La concentración de proteínas se determinó usando el reactivo de Bradford (Applichem, A6932). Posteriormente, las proteínas eran suspendidas en buffer Laemmli 5X. Para su análisis, las muestras eran separadas por electroforesis desnaturante SDS-PAGE y transferidas a membranas de PVDF. Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche descremada, previo a su incubación con anticuerpos específicos ON. En la Tabla I se encuentran los diferentes anticuerpos específicos utilizados y sus concentraciones. Luego, se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 h y se reveló utilizando el kit de quimioluminiscencia SuperSignal West Pico (Pierce, 34080) en Imagequant 800 (Amersham). La densitometría de las bandas fue realizada usando el software ImageJ (Rasband, W.S., Bethesda, Maryland, USA).

Aislamiento de ARN y qPCR. Se homogeneizaron células y tejidos en TRizol (Invitrogen, Cat. N° 15596026) siguiendo las recomendaciones e instrucciones del fabricante. Se realizó un tratamiento con DNAsa para eliminar la posible contaminación con DNA genómico (Roche, Cat. N° 04716728001). En el caso de los tejidos se separaban aproximadamente 100 mg de tejido en 1ml de TRizol y se agregó 0.5 mm de beads de Zirconium para disgregar el tejido en Bullet Blender (Next Advance, #BBY24M). El aislamiento de ARN de tejido se realizó con el Kit de extracción de Direct-zol™ RNA Miniprep (Zymo, R2050). Luego, usando la enzima Superscript II (Invitrogen, Cat. N° 18064-014) se realizó la transcripción reversa. Seguidamente se corrió la qPCR, con el mix de Sybr Green (Roche, Cat N° 04913850001). Los cambios relativos en la expresión de genes fueron expresados con respecto al control con el método de $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$. Las secuencias de los cebadores fueron sintetizadas por Integrated DNA Technology (IDT) y se detallan en la Tabla III. El termociclador utilizado fue el QuantStudio3 (Appliedbiosystems).

<i>Primers Mouse</i>	<i>Secuencia 5'---3'</i>
Mm_SIRT6_vo_F	ATGTCGGTGAATTATGCAGCA
Mm_SIRT6_vo_R	GCTGGAGGACTGCCACATTA
Mm_SIRT6_v1_F	ATCTTCGACCCACCAGAGG
Mm_SIRT6_v1_R	GCATTCTCGAAGGTGGTGTC
Mm_Actina_F	AGCCATGTACGTAGCCATCC
Mm_Actina_R	GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA
Mm_Fibronectina_F	AGACCATACCTGCCGAATGTAG
Mm_Fibronectina_R	GAGAGCTTCCTGCTGTAGAG
Mm_αSMA_F	AGAGGCACCACTGAACCCTA
Mm_αSMA_R	CCAGCACAATACCAGTTGTACG
Mm_IL8_F	CAAGGCTGGTCCATGCTCC
Mm_IL8_R	TGCTATCACTTCCTTTCTGTTGC
Mm_TNFα_F	CCAGACCCTCACACTCAGATC
Mm_TNFα_R	CACTGGTGGTTTGCTACGAC
Mm_IL6_F	CCACAGATACAAAGAAATGAT
Mm_IL6_R	ACTCCAGAAGACCAGAGGAAT

<i>Primers Human</i>	<i>Secuencia 5'---3'</i>
Hs_SIRT6_vo_F	CCCACGGAGTCTGGACCAT
Hs_SIRT6_vo_R	CTCTGCCAGTTTGTCCCTG
Hs_SIRT6_v1_F	ACTGGCGAGGCTGGTCTG
Hs_SIRT6_v1_R	GCTCTCAAAGGTGGTGTCG
Hs_B-Actin_F	GGACTTCGAGCAAGAGATGG
Hs_B-Actin_R	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
Hs_IL8_F	GCAGAGGGTTGTGGAGAAGT
Hs_IL8_R	GAGGTAAGATGGTGGCTAAT
Hs_TNFα_F	CTGCACTTTGGAGTGATCGG
Hs_TNFα_R	TCAGCTTGAGGGTTTGCTAC
Hs_IL6_F	CCTGAACCTTCCAAAGATGGC
Hs_IL6_R	CACCAGGCAAGTCTCCTCATT

Tabla III. Secuencia de cebadores o primers humanos y murinos utilizados.

Inmunofluorescencia. Los macrófagos Raw 264.7 y MEF, fueron fijadas como se detalló previamente y luego de sucesivos lavados fueron permeabilizadas y bloqueadas (1% BSA, 0.1% Saponina, Glicina 150mM y SBF 5% en PBS) durante 1 h. Posteriormente fueron incubadas a 4°C ON para realizar la inmunomarcación indirecta con anticuerpos específicos (ver diluciones y anticuerpos en Tabla I). A continuación, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario y luego de lavados, se montaron con el medio de montaje ProLong™ Gold Antifade (Invitrogen™, P36930). Las muestras fueron analizadas usando el microscopio Zeiss 880 de la Unidad de Microscopía del IPMON.

ELISA. Para el análisis de citoquinas IL6 y TNFα en macrófagos Raw 264.7 así como en los lavados del peritoneo y en el plasma, se siguieron las recomendaciones del fabricante (BD550950, BD 555268, BD OptEIA, respectivamente). La lectura de la placa se realizó en el equipo VarioskanLUX (Thermo Scientific).

Citometría de Flujo. Análisis de poblaciones infiltrantes en el tejido adiposo y de poblaciones de células inmunes del peritoneo.

Se realizó citometría de flujo para evaluar la expresión de SIRT6 en la FEV del tejido adiposo y en células de lavados peritoneales. La FEV del tejido adiposo se obtuvo como se detalló previamente, fue filtrada (filtro de 100µM) y posteriormente se incubó 2 min con solución de lisis de glóbulos rojos (SLGR; 0.15M NH₄Cl, 0.01M KHCO₃ y 100µM Na₂EDTA; pH 7.4), luego de lo cual se realizó un lavado con PBS conteniendo SBF y EDTA. Los lavados peritoneales fueron realizados inyectando 3 ml de medio RPMI + 0.2% SBF y recuperando posteriormente este volumen, para obtener las células a analizar. En ambos casos las células se suspendieron en 1 ml de RPMI + 0.2% SBF y se contaron en cámara de Neubauer utilizando la tinción de Azul de Tripán, para discriminar a las células muertas.

El análisis de la expresión de SIRT6 en estas muestras fue realizado sobre diferentes poblaciones de macrófagos. En la FEV, los macrófagos se definieron como las células CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺, mientras que en los lavados peritoneales estos fueron identificados como las células CD19⁻TCRβ⁻Ly6G⁻CD11b⁺F4/80⁺ o CD19⁻CD11b⁺F4/80⁺, según si se había realizado o no un estímulo inflamatorio a nivel peritoneal, respectivamente. En los lavados peritoneales se distinguieron a su vez, dentro de las células F4/80⁺, a las poblaciones F4/80^{lo} y F4/80^{hi}, según el nivel de expresión de dicho marcador. Para realizar las marcaciones mencionadas se sembraron 200000 células por pocillo en placas de 96 pocillos con fondo en V. Todas las incubaciones llevadas a cabo sobre estas células se realizaron protegidas de la luz y manteniéndose en frío, a no ser que se indique lo contrario. En primer lugar, las células fueron incubadas con un marcador de viabilidad celular apto para permeabilización durante 10 min a TA; utilizando de forma intercambiada marcadores Live/Dead (Invitrogen) o ZOMBIE (BioLegend) (1:500). Seguidamente se realizó el bloqueo de las muestras con suero normal de rata 10% durante 20 min. Posteriormente las células se marcaron con el mix de tinción de superficie celular durante 30 min. Para la FEV el mix de superficie celular consistió en los anticuerpos anti-CD45-APCCy7 (1:200), anti-CD11b-BV510 (1:300) y anti-F4/80-PE (1:200), mientras que para los lavados peritoneales se utilizaron los anticuerpos anti-CD19-APCCy7 (1:400), anti-CD11b-BV510 (1:300) y anti-F4/80-PE (1:200); en los casos donde la cavidad peritoneal fue tratada con estímulos inflamatorios, se agregaron también los marcadores anti-TCRβ-APCCy7 y anti-Ly6G-APCCy7, para poder discriminar mejor a las poblaciones de macrófagos. Para el marcado intracelular con SIRT6, se fijaron las células con el kit de permeabilización para factores de transcripción (Invitrogen) ON a 4°C. Luego de la permeabilización se incubaron las muestras con el anticuerpo anti-SIRT6 (1:200) 30 min. Por último, se agregó el anticuerpo secundario Goat Anti Rabbit-Alexa Fluor-488 (1:200) y se incubó durante 1h. Para el marcado SIRT6 se agregaron los controles FMO (del inglés, Fluorescence minus one), correspondientes tanto al anti-SIRT6 como al anticuerpo secundario.

En todos los experimentos la adquisición de las muestras se realizó utilizando el citómetro Attune Nxt (Thermo Fisher Scientific) y se grabaron al menos 50000 eventos. El análisis posterior se llevó a cabo con el software FlowJo™ v.X (BD Life Sciences) diseñando estrategias de selección específicas para cada tipo de muestra. En todos los ensayos, la expresión de SIRT6 se informó relativa a su FMO con el cual se fijó el umbral de fluorescencia a partir del cual la señal de la muestra se consideró positiva. Los resultados se informaron como el porcentaje de células positivas para el marcador en estudio, o nivel de expresión del marcador en estudio, representado como la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (GMFI).

Para la obtención y marcación de las células, selección de método de análisis, pasaje de las muestras por el citómetro y análisis de resultados se contó con la ayuda de la **Mag. Valentina Perez**, que cuenta con una amplia experiencia en la Citometría de Flujo. Ella fue además quien puso a punto la utilización del anticuerpo de SIRT6 de abcam (detallado en la Tabla I) para realizar análisis por citometría, ya que no hay descritos anticuerpos anti-SIRT6 de ratón recomendados para esta técnica.

Análisis Estadísticos. Todos los resultados fueron analizados utilizando el software GaphPad Prism 7.0. Los experimentos *in vitro* fueron realizados con duplicados biológicos en al menos tres experimentos independientes. Los experimentos *in vivo* incluyeron un tamaño de población de al menos 5 animales por grupo. Los resultados fueron expresados como la media $\pm$ error estándar de la media (SEM). Para confirmar que las muestras siguieran una distribución normal, se aplicó el análisis de normalidad de D'Agostino-Pearson. También se realizó el test de outliers de ROUT, recomendado por GaphPad Prism 7.0, previo a la comparación de grupos. El test de Student no pareado fue usado para comparar dos grupos independientes con distribución normal. El test de Mann-Whitney U fue usado para comparar dos muestras independientes en casos donde no se pudo demostrar una distribución normal. Para comparaciones múltiples, se realizó el análisis de varianza (ANOVA), seguido por el test *posthoc* Turkey. Para las comparaciones de proporciones se usó el test exacto de Fisher. En todos los casos, los valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos y se nombraron de la siguiente forma * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

CAPÍTULO I: Resultados OE1-3

Comenzaremos analizando los resultados obtenidos en el estudio del **OE1**, donde nos propusimos *estudiar el efecto del LPS en la expresión, localización sub-celular y actividad enzimática de SIRT6 e intentamos comprender cómo era regulada esta respuesta*.

Para ello utilizamos la línea de macrófagos Raw 264.7 y los fibroblastos MEF, estos últimos han sido muy utilizados para estudios de SIRT6 y en ellos se ha descrito la actividad pro-inflamatoria de la enzima^{113,56}. Comenzaremos analizando la respuesta de SIRT6 al estímulo pro-inflamatorio de LPS (200ng/ml). Como se puede observar en la **Fig. 11A**, ocurre un rápido incremento en la expresión de SIRT6 que continúa incrementándose con el tiempo de exposición al LPS. Esta respuesta, se refleja en la cuantificación por densitometría de SIRT6 (**Fig.11B**), sin embargo, no se ve acompañada del mismo comportamiento a nivel del ARNm de *Sirt6*, el cual permanece sin cambios en respuesta al LPS (**Fig.11C**). Esta discrepancia entre mensajero y proteína sugiere una posible estabilización de la proteína como respuesta al estímulo. En concordancia con estos datos, las células MEF desarrollan un comportamiento similar al observado en macrófagos, pero en estas últimas, encontramos diferencias significativas en los niveles del ARNm de *Sirt6* en respuesta a 24h LPS (**Fig.12 A-C**). Los cambios tempranos de SIRT6 a nivel proteico observados en respuesta a LPS en macrófagos Raw 264.7, se ven acompañados de aumento en la expresión del ARNm de TNF α , así como de su concentración intra y extracelular (**Fig.11D-F**), tal como se espera y corroborando la efectiva respuesta al estímulo.

A continuación, estudiamos la estabilidad de SIRT6, utilizando dos compuestos que alteran la vida media de todas las proteínas y nos permiten obtener información acerca de la vida media de SIRT6 en nuestros modelos celulares. Se realizaron incubaciones con MG132 para evaluar qué tan rápido se produce la estabilización de la proteína, encontrándose que a la hora de inhibición del proteasoma, se incrementan los niveles de SIRT6 medidos por WB y cuantificados por densitometría (**Fig.11K y Fig.12D y F**). Si analizamos la dinámica de acumulación y degradación de SIRT6 a través del tiempo, recién se observan diferencias a las 6h (**Fig.11G-I**), pero si comparamos los datos obtenidos a la hora con los datos control, se puede observar que ambos grupos difieren significativamente (**Fig.11K-L**). En adición a estos resultados, las MEF repitieron el comportamiento frente a MG132 y CHX a la hora del tratamiento (**Fig.12D-F**).

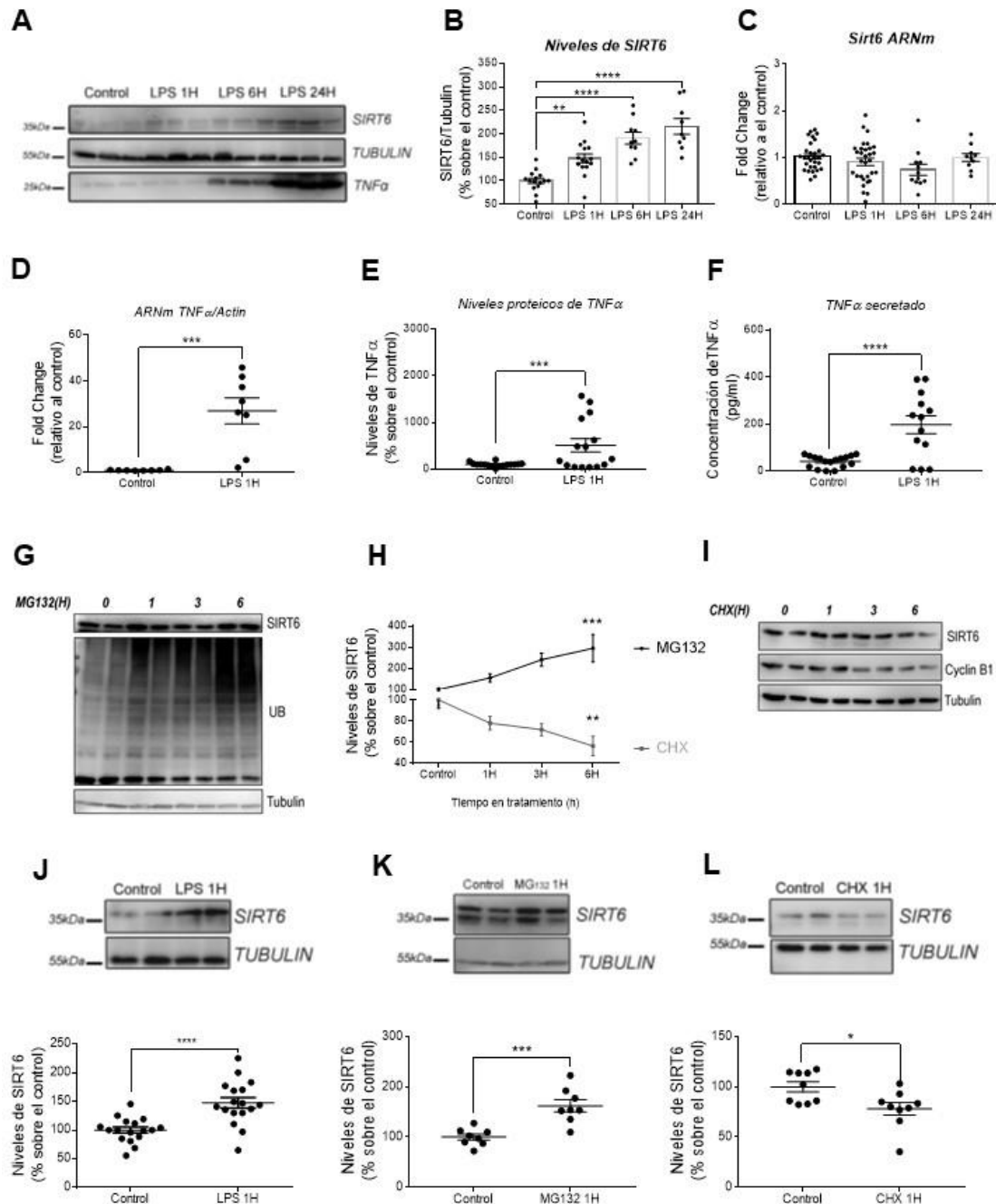


Figura 11. SIRT6 se estabiliza rápidamente en respuesta a LPS en macrófagos Raw 264.7. **A.** WB representativo de SIRT6 y TNFα donde se muestra la respuesta de macrófagos a LPS (200ng/ml) durante 1, 6 y 24h. **B.** Densitometría del WB de SIRT6 previo y todas las réplicas experimentales que se realizaron, expresada como incrementos sobre el control (en porcentaje). **C.** Niveles de ARNm de SIRT6 en estas mismas células y condiciones experimentales, expresado como Fold Change sobre el control. **D-F.** Niveles del ARNm de TNFα (**D**), niveles proteicos de TNFα medido por densitometría del WB anterior y todas sus réplicas (**E**), y niveles de TNFα secretado en el medio de cultivo (**F**) comparando macrófagos control versus LPS 1h. **G.** WB representativo donde se muestran los niveles de SIRT6 en macrófagos bajo tratamiento con MG132 (10μM) durante 1, 3 y 6h. Se utilizó la ubiquitina como control para verificar si el tratamiento funcionó correctamente. **H.** Densitometría de los WB de SIRT6 bajo el tratamiento con MG132 (gris) y CHX (negro) incluyendo todas las réplicas experimentales que se realizaron y expresada como incrementos o decrementos sobre el control (en porcentaje). **I.** WB representativo donde se muestran los niveles de SIRT6 en macrófagos bajo tratamiento con CHX (1μg/ml) durante 1, 3 y 6h. Se utilizó la Ciclina B1 como control para verificar que el tratamiento funcionó correctamente. **J-L.** WB representativo de los niveles de SIRT6 en macrófagos expuestos a LPS (200ng/ml) (**J**), MG132 (10μM) (**K**), y CHX (1μg/ml) (**L**) durante 1h y la correspondiente densitometría, expresada como incrementos o decrementos sobre el control (en porcentaje). En los gráficos se representan las medias ± SEM. Todos los experimentos en cultivo se repitieron al menos 3-4 veces. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

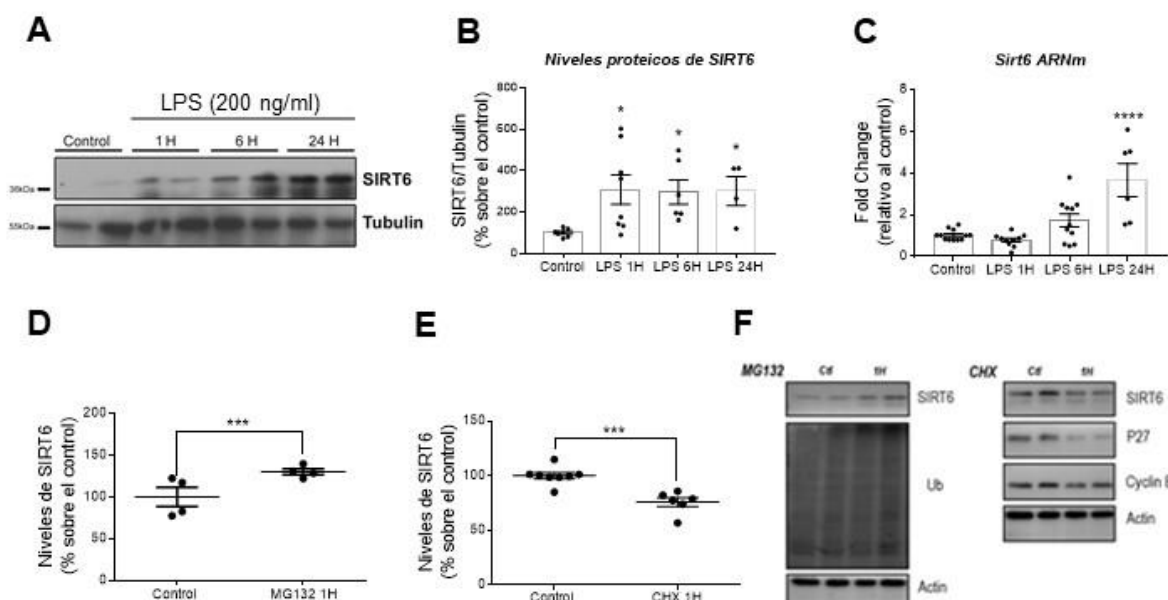


Figura 12. Los fibroblastos MEF se comportan como en los macrófagos en respuesta a LPS. **A.** WB representativo de SIRT6 donde se muestra la respuesta de los fibroblastos MEF a LPS (200ng/ml) durante 1, 6 y 24h. **B.** Densitometría del WB de SIRT6 previo y todas las réplicas experimentales que se realizaron, expresada como incrementos sobre el control (en porcentaje). **C.** Niveles de ARNm de SIRT6 en estas mismas células y condiciones experimentales, expresado como Fold Change sobre el control. **D-E.** Densitometría de WB de los niveles de SIRT6 en MEF expuestos a MG132 (10 μ M) (**D**) y CHX (1 μ g/ml) (**E**) expresada como incrementos o decrementos sobre el control (en porcentaje). **F.** WB representativo donde se muestran los niveles de SIRT6 en MEF bajo el tratamiento con MG132 y CHX durante 1h. Se utilizó la ubiquitina, P27 y Ciclina B1 como control para verificar que el tratamiento funcionó correctamente. En los gráficos se representan las medias $\pm$ SEM. Todos los experimentos en cultivo se han repetido al menos 3-4 veces. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Con el fin de confirmar si los efectos del LPS y MG132 sobre las células eran independientes, decidimos unir ambos tratamientos: LPS y MG132. Tanto en macrófagos como en MEF, observamos respuestas a ambos tratamientos, tal como se mostró previamente (**Fig.11 y 12**). No observamos un efecto aditivo o sinérgico cuando tratamos a las células con ambos compuestos a la vez, por el contrario, los tres grupos LPS, MG132 y LPS+MG132 no presentan diferencias significativas entre sí, pero sí se diferencian del control (**Fig. 13**), lo cual sugiere que lo que ocurre frente al LPS es una estabilización de SIRT6.

Continuando con nuestros estudios, evaluamos cómo se comporta SIRT6 frente al estímulo en términos de localización subcelular en macrófagos Raw 264.7. Para ello, realizamos un fraccionamiento subcelular y analizamos la distribución de SIRT6 tanto en el núcleo como en el citoplasma. Observamos que en respuesta a la exposición al LPS durante 1 h, hay un incremento de la expresión de SIRT6 en ambos compartimentos celulares (**Fig. 14A**). Los marcadores de Tubulina y H3 nos permiten corroborar la pureza de cada fracción y las diferentes exposiciones que se muestran brindan información acerca de la abundancia relativa de la enzima en cada uno de los compartimentos. Si bien el núcleo presenta una mayor cantidad de SIRT6, también se logró detectar una señal clara a nivel citoplasmático, y que además parece responder al estímulo pro-inflamatorio. Esta detección citoplasmática, constituye un resultado muy relevante a los efectos de esta tesis y más aún, a los efectos de comprender la

naturaleza pro-inflamatoria de SIRT6. Para confirmar estos resultados, se realizaron inmunofluorescencias que nos permitieron confirmar y profundizar en el análisis de la distribución de SIRT6 dentro de los macrófagos.

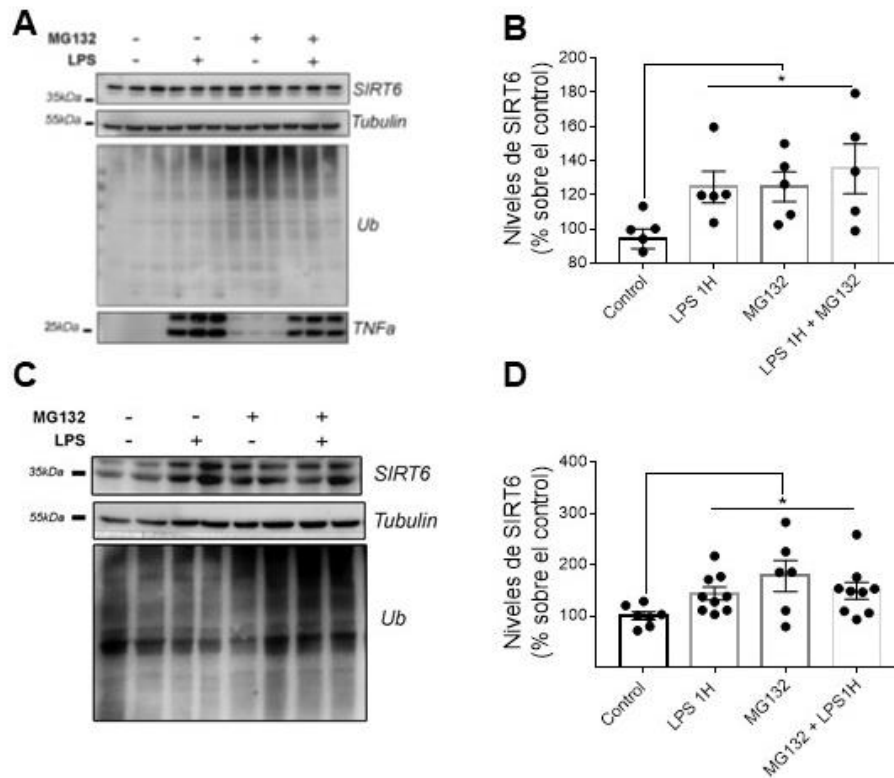


Figura 13. LPS y MG132 no tienen un efecto sinérgico en macrófagos Raw 264.7 ni en fibroblastos MEF. **A.** WB representativo de SIRT6 en macrófagos sometidos a tratamientos de LPS (200ng/ml), MG132 (10μM) y LPS + MG132 durante 1h. Se utilizaron tanto la Ubiquitina como el TNFα como controles para confirmar que ambos tratamientos hayan funcionado. Se muestran triplicados por condición. **B.** Densitometría de los WB de SIRT6 bajo los tratamientos mencionados en A, expresado como incrementos sobre el control (en porcentaje). **C.** WB representativo de los niveles de SIRT6 en MEF expuestos a LPS (200ng/ml), MG132 (10μM) y LPS + MG132 durante 1h. Se utilizó la Ubiquitina como control del tratamiento de MG132. Se muestran duplicados por condición. **D.** Densitometría de los WB de SIRT6 bajo los tratamientos mencionados en C, expresado como incrementos sobre el control (en porcentaje). En los gráficos se representan las medias ± SEM. Todos los experimentos en cultivo se han repetido al menos 3-4 veces. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

En concordancia con los resultados del fraccionamiento, las IF muestran una marcación de SIRT6 nuclear y perinuclear en los controles, cuya intensidad aumenta en respuesta a LPS, tanto en los dominios nucleares como en los citoplasmáticos (**Fig. 14B**). La cuantificación de las IF confirma el incremento sostenido de la intensidad media de SIRT6 en el núcleo, que alcanza un máximo 24h post LPS (**Fig. 14C**). A diferencia de lo que ocurre en el núcleo, el incremento citoplasmático se da a la hora y se mantiene a las 24h (**Fig. 14D**). Acompañando el incremento de intensidad de SIRT6, se ve una marcación de TNFα inicialmente restringida a dominios perinucleares que se expande a todo el citoplasma celular a las 24h post LPS. En acuerdo con lo mencionado, la cuantificación intracelular muestra un incremento que se correlaciona con el tiempo de exposición al LPS (**Fig. 14E**).

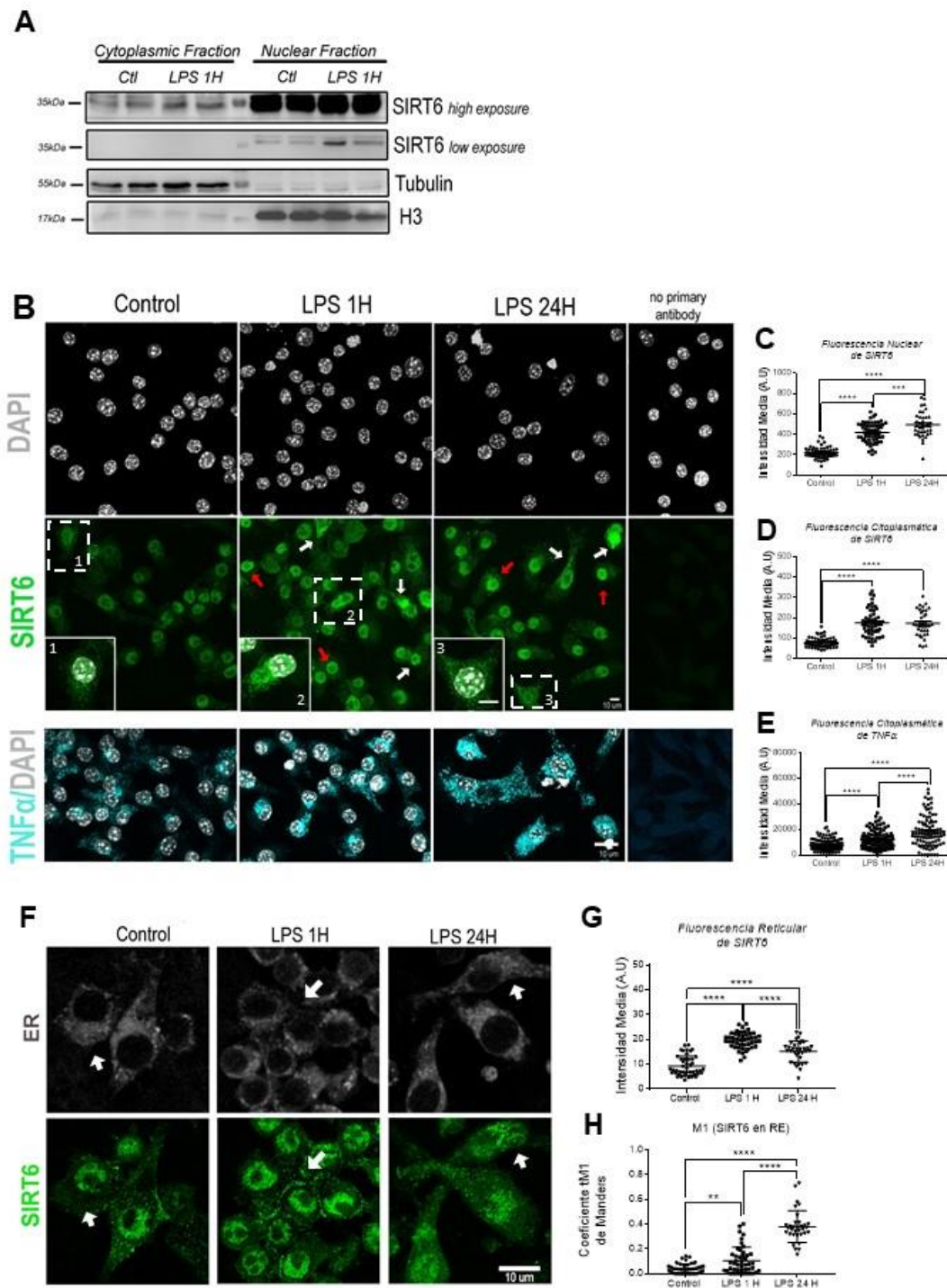


Figura 14. SIRT6 en respuesta a LPS aparece en el citoplasma y se enriquece en el RE en macrófagos Raw 264.7. **A.** WB representativo de SIRT6 en las fracciones nucleares y citoplasmáticas de macrófagos expuestos a LPS (200ng/ml) durante 1h. Se muestra una exposición corta y una exposición larga. Tubulina y H3 fueron utilizadas como controles de la pureza de las fracciones. **B.** Imágenes confocales de IF de macrófagos expuestos a LPS 1 y 24h. Se utilizaron los siguientes marcadores: DAPI (gris), SIRT6 (verde), TNFα (celeste). El panel derecho corresponde al control de la IF, sin la utilización del anticuerpo primario. Se señalaron con cuadrados numerados las células que se encuentran magnificadas en el recuadro inferior izquierdo. Las flechas blancas indican acumulaciones citoplasmáticas de SIRT6 mientras que las rojas indican núcleos muy intensos. La barra inferior blanca representa 10 μm. **C-D.** Cuantificación de la fluorescencia media de SIRT6 en regiones nucleares (**C**) y citoplasmáticas (**D**). **E.** Cuantificación de la fluorescencia media de TNFα en regiones citoplasmáticas. **F.** Imágenes confocales de IF de macrófagos expuestos a LPS 1 y 24h donde se marcó SIRT6 (verde) y RE (gris). Las flechas blancas indican acumulaciones de SIRT6 en dominios reticulares. La barra inferior blanca representa 10 μm. **G.** Cuantificación de la fluorescencia media de SIRT6 en regiones del RE. **H.** Coeficiente de Manders m1. En los gráficos se representan las medias ± SEM. Todos los experimentos en cultivo se han repetido al menos 3-4 veces. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Continuando el análisis, para identificar en qué dominios citoplasmáticos específicos se encontraba la enzima, realizamos una co-marcación de SIRT6 con un marcador de RE (**Fig. 14F**). Luego cuantificamos la señal de SIRT6 en el RE encontrando un incremento en la intensidad de la señal que ocurre tempranamente y se mantiene hasta a las 24h con LPS, similar a lo observado en la cuantificación citoplasmática (**Fig. 14G**). Complementando estos resultados, se utilizó el coeficiente de solapamiento de Manders para evaluar la fracción de SIRT6 dentro del RE o la fracción de solapamiento entre ambos marcadores. El índice de Manders se incrementó en respuesta a LPS, teniendo su máximo solapamiento a las 24h post estímulo, lo cual coincide con el pico de señal para TNF α (**Fig. 14H**) (ver sección materiales y métodos por detalles de cómo se realizó la cuantificación).

En vista del incremento temprano de SIRT6 en respuesta a LPS, que surge producto de su estabilización y que permite incrementar su presencia en el citoplasma y más aún, en el RE, nos preguntamos si este mecanismo era el encargado de generar la disminución de las funciones nucleares de la sirtuina (desacetilación de H3) y favorecer sus funciones sobre la secreción de TNF α . Para confirmar esta hipótesis primero realizamos un análisis de la marcación nuclear de un sustrato clásicamente definido como sustrato de la enzima, el H3K56. Tal como se muestra en la **Fig.15A-B**, en respuesta a LPS, los núcleos incrementan sus niveles de acetilación sobre la H3, presentando un pico de acetilación a la hora post estímulo, que se asemeja a los niveles de acetilación presentes en células depletadas de SIRT6 (Raw siSIRT6). A las 24h los niveles de acetilación permanecen por encima de los niveles de acetilación control. La línea celular donde se realizaron estos análisis fue una línea celular generada en el marco de la tesis de Licenciatura en Biotecnología de Maria Pia Garat.

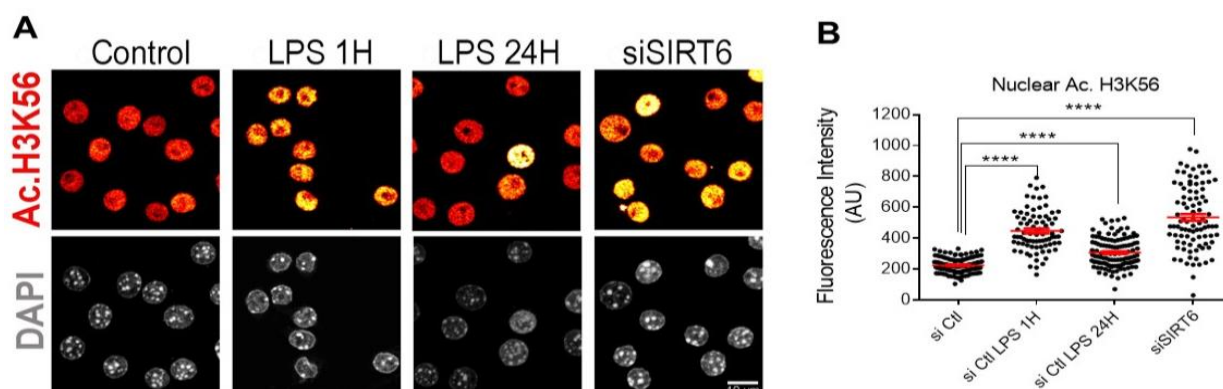


Figura 15. La actividad de SIRT6 a nivel nuclear disminuye en macrófagos Raw 264.7 en respuesta a LPS. A. Imágenes confocales de IF de macrófagos expuestos a LPS (200ng/ml) marcados con Ac.H3K56 (rojo fuego) y DAPI (gris). B. Cuantificación de la fluorescencia media de Ac.H3K56 en regiones nucleares. En los gráficos se representan las medias $\pm$ SEM. Todos los experimentos en cultivo se han repetido al menos 3-4 veces. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Luego procedimos a utilizar un inhibidor específico de la enzima, caracterizado *in vitro* por Parenti *et al.*, donde se demostró la capacidad del compuesto de inhibir la desacetilación sobre H3K9 luego de 18h de exposición al compuesto. En este trabajo también se muestra el incremento en la expresión de GLUT1, que ocurre a

consecuencia de la actividad co-represora de SIRT6 sobre HIF1 α a nivel nuclear y finalmente también se observa una inhibición de la actividad desmiristoilasa de SIRT6 sobre las lisinas K19 y K20 del pro-TNF α ¹⁴⁴.

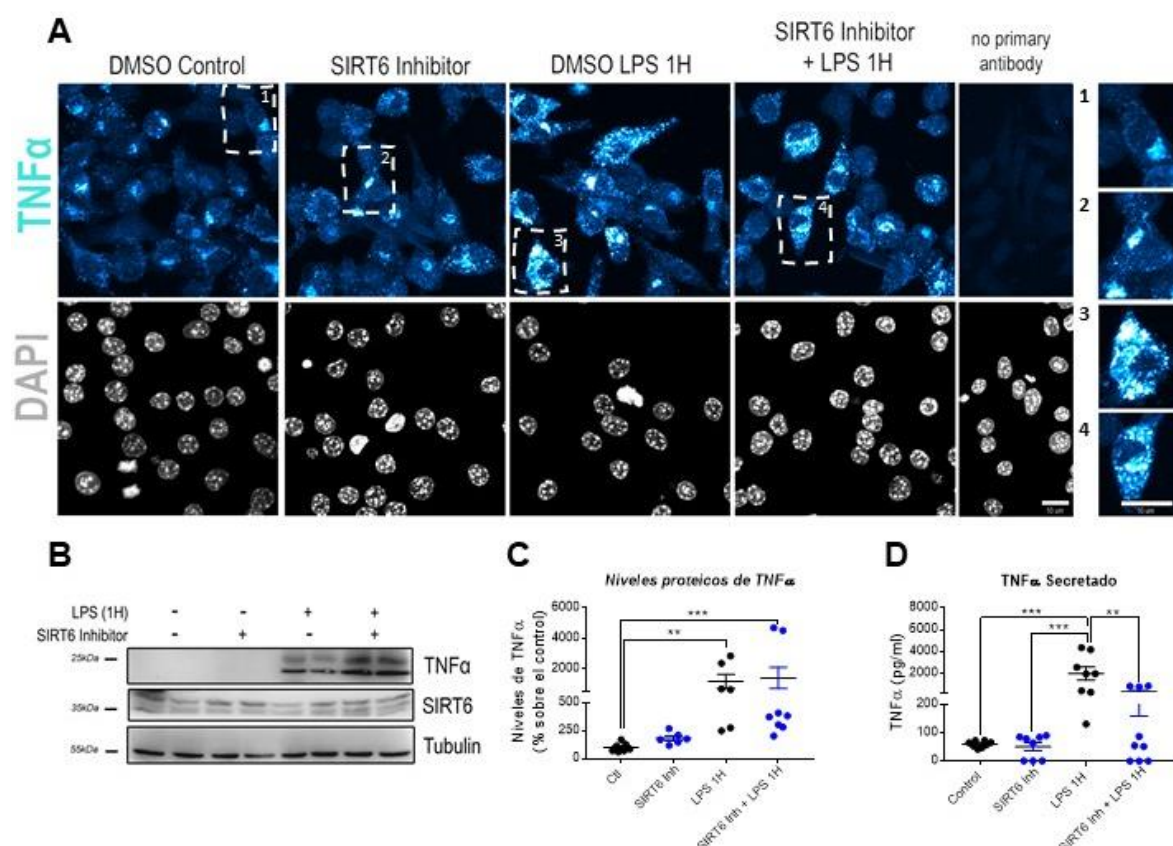


Figura 16. La inhibición temprana de SIRT6 en macrófagos Raw 264.7 disminuye la secreción de TNF α en respuesta a LPS. **A.** Imágenes confocales de IF de macrófagos expuestos a LPS (200ng/ml) y al inhibidor de SIRT6 (200uM) durante 1h. Se utilizaron los marcadores DAPI (gris) y TNF α (celeste). El panel de la derecha corresponde al control de la IF sin la utilización del anticuerpo primario. Los cuadrados numerados indicados en las imágenes de TNF α , se magnificaron en el panel de la derecha. La barra inferior blanca representa 10 μ m. **B.** WB representativo de TNF α donde se muestra la respuesta de macrófagos expuestos a LPS y el inhibidor de SIRT6 durante 1h. **C.** Densitometría del WB de TNF α previo y todas las réplicas experimentales que se realizaron, expresada como incrementos sobre el control (en porcentaje). **D.** Concentración de TNF α secretado obtenido del sobrenadante de macrófagos Raw 264.7 expuestos a LPS y el inhibidor de SIRT6 durante 1h. En los gráficos se representan las medias $\pm$ SEM. Todos los experimentos en cultivo se han repetido al menos 3-4 veces. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Con este compuesto, evaluamos qué ocurriría con los macrófagos en respuesta LPS y el inhibidor, evaluando distribución y cantidad de TNF α intracelular, así como su secreción. Al observar las IF de TNF α , no observamos diferencias en cuanto a la distribución del marcador intra-celularmente (**Fig. 16A**). Tanto la condición control, como las células incubadas con el inhibidor, mostraron una marcación para TNF α perinuclear que podría corresponderse con el Golgi o RE, donde sabemos se sintetiza y almacena. Sin embargo, en respuesta al estímulo de LPS, la señal de TNF α se expande en el citoplasma, como ya observamos previamente, mostrando acúmulos intensos en regiones alejadas del núcleo. En los recuadros de la derecha de la **Fig. 16A** se observa con mayor claridad lo mencionado. Al analizar las células mediante WB, se observa un incremento de TNF α en respuesta a LPS, pero no hay diferencias

entre la condición LPS y LPS + inhibidor de SIRT6 (**Fig. 16B**). Corroborando lo previamente mencionado, la cuantificación por densitometría de los WB muestra diferencias significativas sólo del control con las células expuestas a LPS, con y sin el inhibidor de SIRT6 (**Fig.16C**). Finalmente, cuando analizamos la cantidad de TNF α secretado al medio en respuesta a la activación inflamatoria, observamos un efecto del Inhibidor de SIRT6 sobre la secreción de TNF α , secretando las células tratadas con LPS+inhibidor una menor cantidad de TNF α que las células tratadas exclusivamente con LPS (**Fig.16D**). Estos resultados nos permiten concluir que la inhibición de SIRT6 temprana, tiene un efecto en la respuesta inflamatoria que lleva a una disminución en la secreción de TNF α .

Para culminar este primer OE, realizamos una serie de experimentos *in vivo*, evaluando la respuesta a LPS en las células inmunes del peritoneo de ratones C57BL/6J adultos machos sometidos a inyecciones i.p de LPS (10mg/kg). En estos ratones, se evaluó inicialmente la población de células obtenidas del peritoneo mediante qPCR. Como se muestra en la **Fig.17A-C**, a nivel del ARNm de estas células no se observan diferencias en la expresión del mensajero de *Sirt6*, pero si se incrementa significativamente la expresión del mensajero de *Tnfa* e *Il6* cuando el peritoneo es estimulado con LPS. Acompañando estos datos, se observa mayor cantidad de ambas citoquinas en el lavado del peritoneo en respuesta a LPS (**Fig.17D-E**). Analizamos también las células del peritoneo mediante IF, realizando marcaciones con DAPI donde se observan varios tipos nucleares, distinguiendo células con núcleos polimorfos PMN (que son típicamente los neutrófilos) y células con núcleo redondo como los macrófagos o monocitos. Centrándonos en la marcación para SIRT6 en células cuyo núcleo tiene una morfología oval, pudimos detectar también *in vivo* un incremento de la señal de la sirtuina 6 en respuesta a LPS (**Fig.17F**). Nótese que los neutrófilos también tienen una marcación fuerte y citoplasmática. La cuantificación de la intensidad de SIRT6 a nivel nuclear y citoplasmático, muestra un incremento en respuesta a LPS en células con núcleos redondeados (**Fig.17G-H**). La figura **17I** caracteriza a grandes rasgos el infiltrado de peritoneo en ambas condiciones. Dada la heterogeneidad de la población obtenida del peritoneo, decidimos analizarla mediante citometría de flujo para confirmar si el incremento ocurre específicamente en macrófagos.

El análisis por citometría de las células de peritoneo estimuladas con LPS, confirmó el incremento en la señal de la enzima medida por la Intensidad de Fluorescencia en la población de células identificadas por **CD11b⁺F4/80^{hi}** como macrófagos residentes del peritoneo (**Fig.18C**). En esta población específica, el porcentaje de células SIRT6⁺ también se vio incrementado en respuesta a LPS (**Fig.18B-C**). Mediante este abordaje *in vivo*, pudimos determinar que los macrófagos del peritoneo responden al LPS de forma similar a los macrófagos en cultivo.

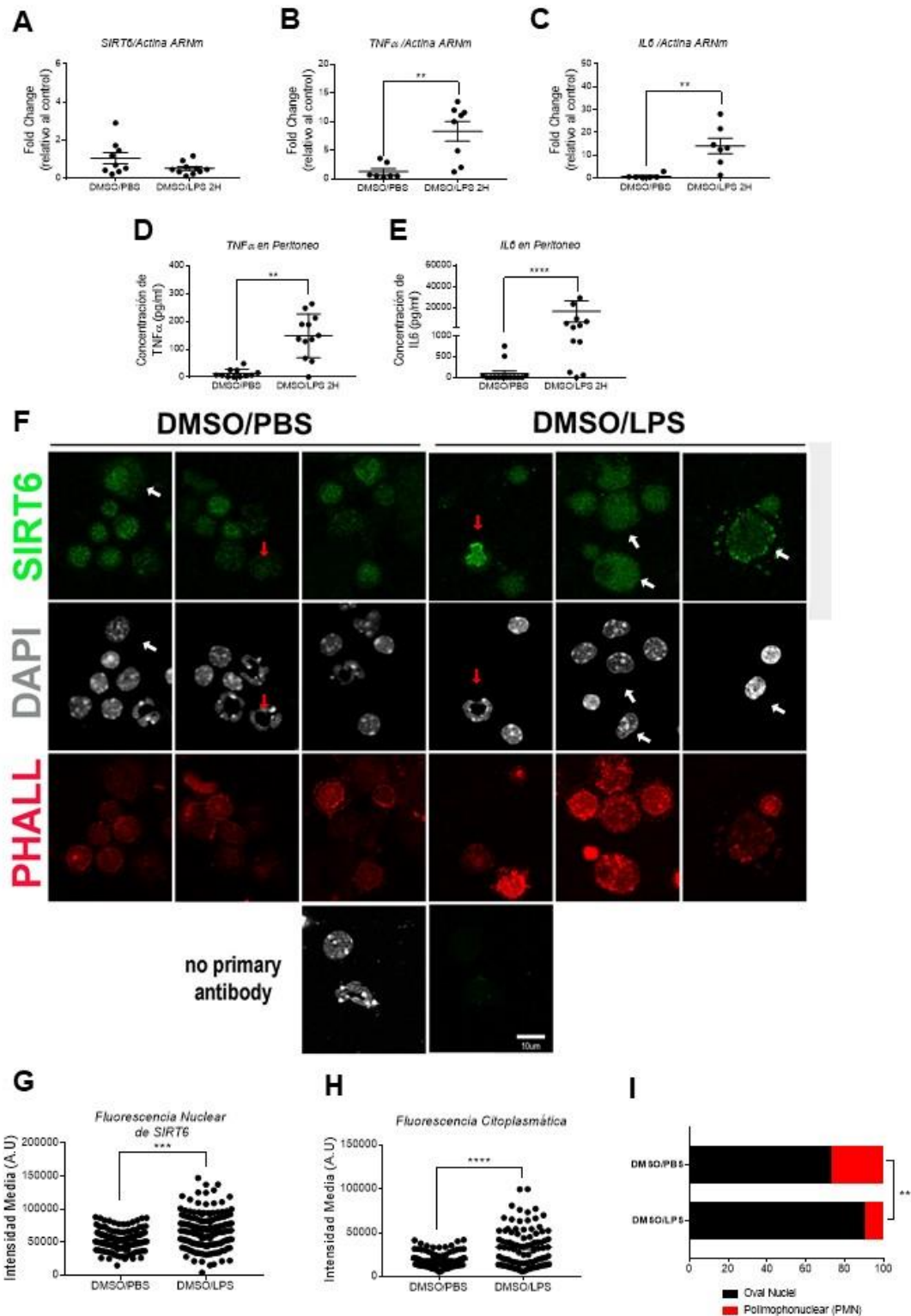


Figura 17. Las células del peritoneo post inyección de LPS recapitulan los experimentos in vitro. A-C. Niveles del ARNm de *Sirt6*, *Tnfα* e *Il6* en células del peritoneo obtenidas luego de 2h de una inyección i.p de LPS (10mg/Kg). D-E. Concentración de TNFα e IL6 secretado en el lavado del peritoneo de ratones luego de 2h de una inyección i.p de LPS. F. Imágenes confocales de IF de células obtenidas del peritoneo luego de 2h de una inyección i.p de LPS (10mg/Kg). Se utilizaron los marcadores DAPI (gris), SIRT6 (verde) y Falloidina (rojo). Las flechas blancas señalan acumulaciones de SIRT6 a nivel citoplasmático y las rojas indican células polimorfonucleares con una señal intensa de SIRT6. La barra inferior blanca representa 10 μm. G-H. Cuantificación de la fluorescencia media de SIRT6 en regiones nucleares (G) y citoplasmáticas (H) de células con núcleo redondeado del peritoneo obtenidas luego de 2h de una inyección i.p de LPS. En los gráficos se representan las medias ± SEM. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

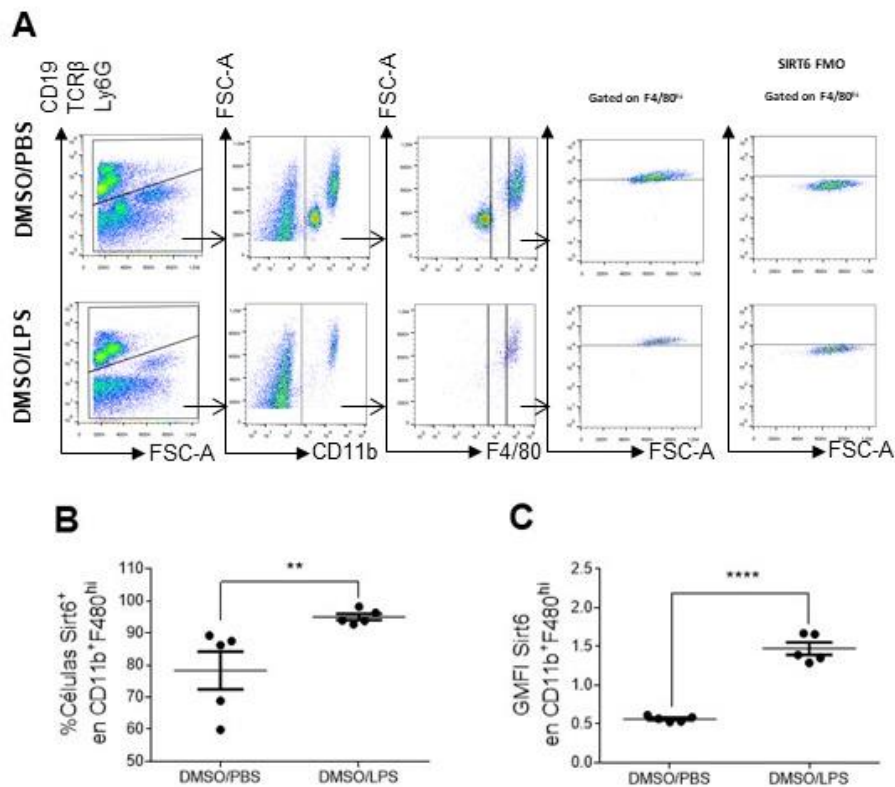


Figura 18. Los macrófagos residentes del peritoneo en un modelo de inflamación aguda recapitulan los experimentos *in vitro*. **A.** Estrategia de selección empleada para definir las poblaciones de macrófagos de la cavidad peritoneal y evaluar en ellos la expresión de SIRT6. **B.** Porcentajes de células SIRT6⁺ dentro de la población de macrófagos definida como CD11b⁺F4/80^{hi}. **C.** Media Geométrica de la Intensidad de Fluorescencia (GMFI) para SIRT6 dentro de la población de macrófagos definida como CD11b⁺F4/80^{hi}. En los gráficos se representan las medias $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. (n=5)

Por último, nos interesó recapitular la inhibición de SIRT6 *in vivo*, administrando el Inhibidor de SIRT6 (30mg/Kg) a ratones C57BL/6J previo a la inyección de LPS. Al igual que en las células en cultivo, la administración del inhibidor de SIRT6 a ratones sometidos a LPS, generó a una disminución de la cantidad de TNF α secretado (**Fig.19A**). En concordancia con una menor secreción de esta citoquina, también se observó una menor inflamación medida por la disminución en los niveles de IL6 secretados al peritoneo (**Fig.19B**). Continuando el análisis de la administración del inhibidor *in vivo*, se realizó una curva de supervivencia en ratones C57BL/6J los cuales fueron sometidos a una inyección letal de LPS (20mg/Kg), tratados o no con el inhibidor de SIRT6 (30mg/Kg). Este constituye un modelo de shock séptico¹⁴⁸ y nos permite evaluar la importancia de la enzima en el contexto de sepsis. No encontramos diferencias significativas en la supervivencia entre los ratones tratados con o sin el inhibidor de SIRT6, sin embargo, se observó una mayor supervivencia en aquellos ratones que fueron administrados con el inhibidor, la cual se aprecia en los gráficos de contingencia que muestran la sobrevida máxima a las 96h (**Fig.19C-D**).

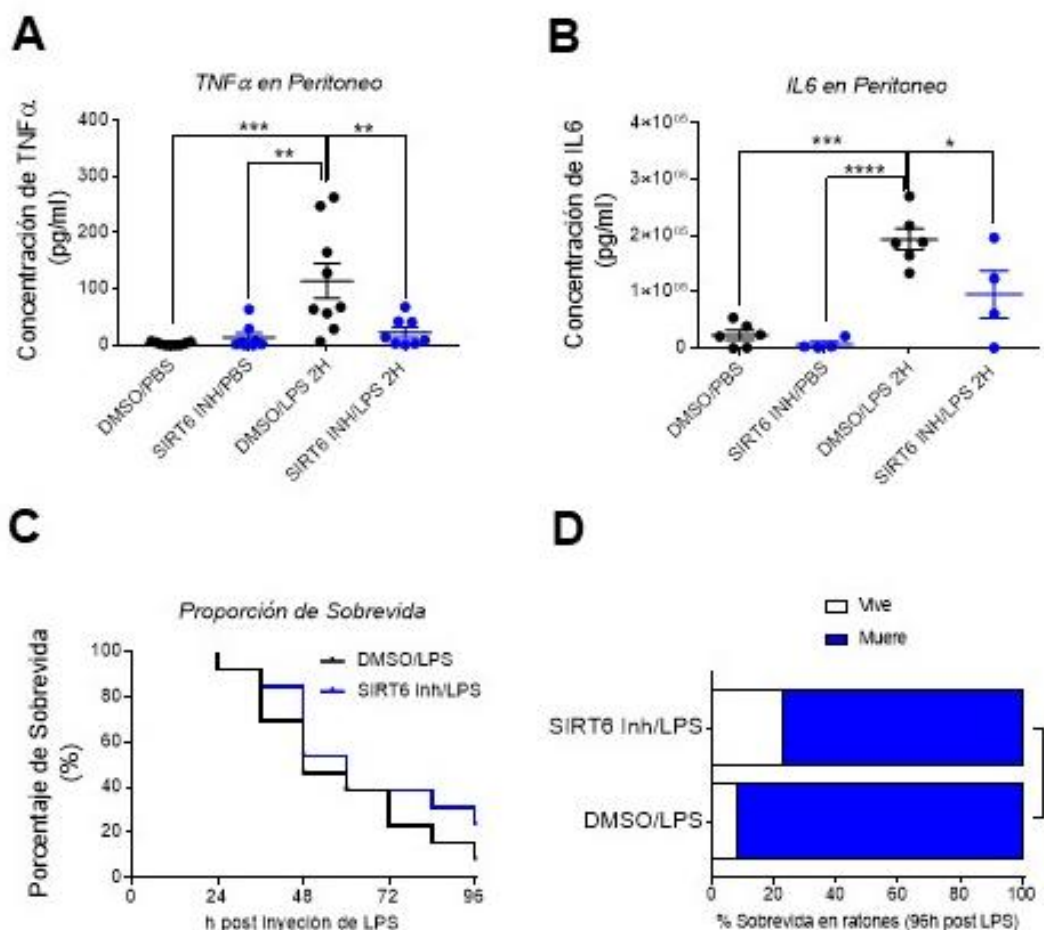


Figura 19. La inhibición de SIRT6 in vivo disminuye la secreción de TNFα y aumenta la supervivencia frente a una inyección letal de LPS. A-B. Concentración de TNFα e IL6 secretado obtenido del lavado del peritoneo de ratones pre-incubados con el Inhibidor de SIRT6 y posteriormente tratados con LPS (10mg/Kg) (n=7). C. Análisis de supervivencia Kaplan Meier en el que se muestra la supervivencia de ratones cada 24 horas luego de una inyección letal de LPS (20mg/Kg) tratados o no previamente con el inhibidor de SIRT6 (30mg/kg) (n=14). D. Gráfico de contingencia en el que se muestra la supervivencia de ratones luego de una inyección letal de LPS (20mg/Kg) tratados o no previamente con el inhibidor de SIRT6 (30mg/kg) (n=14).

A partir de ahora comenzaremos a analizar los resultados obtenidos en el estudio del **OE2**, donde nos propusimos *investigar el papel de SIRT6 en la inflamación crónica en un modelo in vitro e in vivo en ratones obesos*.

Iniciaremos esta sección con el análisis del modelo de inflamación crónica de fibroblastos IMR90 con sobreexpresión de RAS, que como ya se mencionó previamente fueron brindadas por el grupo de la **Dra. Celia Quijano** de la Facultad de Medicina, Udelar. Este modelo presenta un fenotipo secretor característico denominado **SASP** (del inglés, *Secretory Associated Senescent Phenotype*), el cual presenta incrementados los niveles de secreción de citoquinas pro-inflamatorias^{149,150}. Acompañando este fenotipo, pudimos determinar que junto a una mayor expresión de la subunidad p65/RelA de NFκB, las células que sobre-expresan RAS, también tienen mayores niveles de SIRT6 observados mediante WB y su cuantificación por densitometría (**Fig.20A-B**). En este modelo, además, los mayores niveles proteicos de SIRT6 coinciden con mayores niveles de expresión del mensajero de *Sirt6*

(Fig.20C). Las imágenes de la Fig.20D muestran IF con marcación para SIRT6 en los fibroblastos control y RAS, donde se puede observar el incremento en el tamaño nuclear de estas últimas, así como una aparente mayor intensidad de la enzima. La marcación de NFkB permite observar que p65/RelA en los fibroblastos RAS tiene una distribución nuclear, que no ocurre en los controles y que genera la sobreexpresión de las citoquinas pro-inflamatorias que responden a este factor de transcripción. Ejemplo de ARN mensajeros regulados por NFkB-p65 son *Tnfa* e *Il8*, cuya expresión se encuentra incrementada en los fibroblastos RAS (Fig.20E).

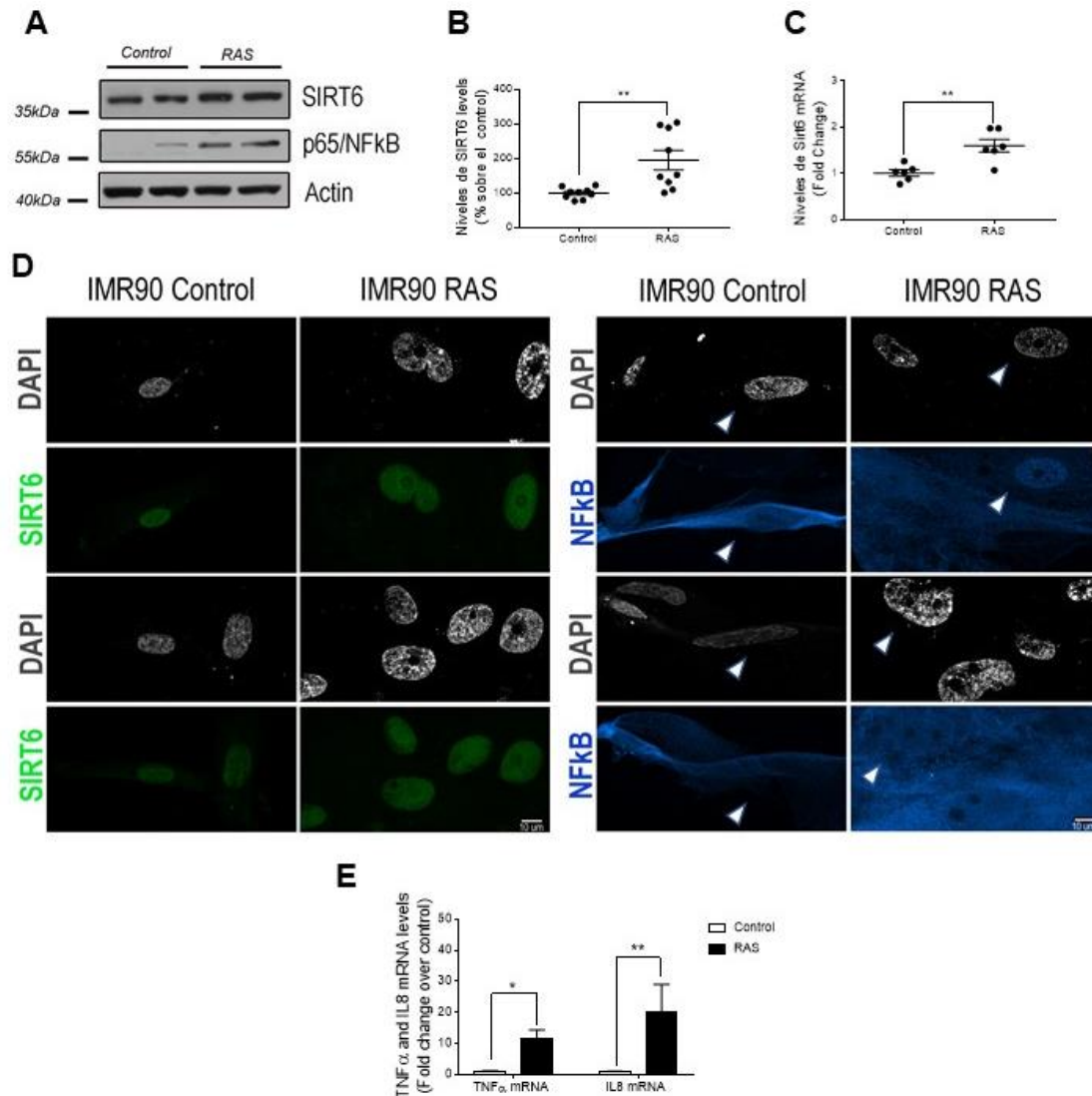


Figura 20. El incremento de SIRT6 en los fibroblastos IMR90 con sobreexpresión de RAS acompaña la mayor expresión y presencia de NFkB en el núcleo. A. WB representativo de SIRT6 y p65 donde se comparan fibroblastos IMR90 control versus RAS. **B.** Densitometría del WB de SIRT6 previo y todas las réplicas experimentales que se realizaron, expresada como incrementos sobre el control (en porcentaje). **C.** Niveles del ARNm de *Sirt6* en fibroblastos IMR90 Control versus RAS. **D.** Imágenes confocales de IF de fibroblastos IMR90 control versus RAS marcados con DAPI (gris), SIRT6 (verde) y p65 (azul). Las puntas de flechas blancas señalan regiones nucleares. La barra inferior blanca representa 10 μ m. **E.** Niveles del ARNm de *Tnfa* e *Il8* en fibroblastos IMR90 control versus RAS. En los gráficos se representan las medias $\pm$ SEM. Todos los experimentos en cultivo se han repetido al menos 3-4 veces. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

La presencia de p65/RelA nuclear en los fibroblastos RAS junto con la sobreexpresión del mensajero de *Sirt6*, nos llevó a hipotetizar una posible regulación de su expresión

por NFkB. Es importante recordar que durante los estímulos agudos con LPS, donde NFkB es activado, habíamos observado que en fibroblastos embrionarios MEF también existía un incremento en la transcripción de *Sirt6* (24 horas post-LPS), apoyando esta hipótesis. Para ahondar sobre esta idea, se llevaron a cabo una serie de análisis *in silico* que se muestran en la **Fig.21**. Comenzamos con la búsqueda y alineamiento de las secuencias promotoras de *Sirt6* de humano y ratón, las cuales se encuentran codificadas en la hebra complementaria tanto en el genoma humano como en el murino. Las secuencias promotoras fueron alineadas, encontrando dentro de ellas, una secuencia de 280 nucleótidos (nt) con un 80% de identidad. Sobre esta región, se analizó la presencia de secuencias consenso de unión a diferentes factores de transcripción con las herramientas detalladas previamente. El análisis en PROMO de la región evidenció una secuencia consenso de unión a NFkB (99% de similitud con las experimentales) presente en ambos promotores cuya ubicación se presenta a continuación: Hs: 5´-4182359-4182348-3´; Mm: 5´-81627365-81627354-3´ (**Fig.21A**).

El siguiente paso consistió en corroborar dicha predicción. Para ello, buscamos experimentos de ChIP-Seq para NFkB (p65/RelA) con estímulos pro-inflamatorios en ambas especies, encontrando dos artículos con la información deseada. Por un lado, encontramos una ChIP-seq anti-p65 de cultivos primarios de macrófagos derivados de monocitos humanos, tratados o no con TNFα (10ng/ml) por 24h¹⁴⁸, donde mediante el análisis con HOMER se observó un pico en el número de lecturas secuenciadas en la muestra tratada con TNFα y mayor al control (p<0.0001). Esta región se encontraba a 150pb corriente arriba de la secuencia consenso predicha por PROMO para el promotor de *Sirt6* (Hs: 5´-4182650-4182500-3´) (**Fig.21C**). Por otra parte, encontramos otra ChIP-seq anti p65 en cultivos primarios de macrófagos murinos obtenidos de lavado peritoneal luego del tratamiento con tioglicolato estimulados con una endotoxina de E.coli por 1h, 24h o control sin tratar¹⁴⁹. En este caso no se observaron diferencias significativas en el número de lecturas para ninguno de los tiempos respecto del control, sobre la región consenso predicha por PROMO para el promotor murino de *Sirt6* (Mm: 5´-81627600-81627400- 3´). Sin embargo, sí se observó diferencias significativas respecto del control (p<0.0001), tanto para 1 o 24h de tratamiento, en una región ubicada a 1000 pb corriente abajo de la secuencia predicha por PROMO (Mm: 5´-81627400-81627200- 3´) (**Fig.21D**).

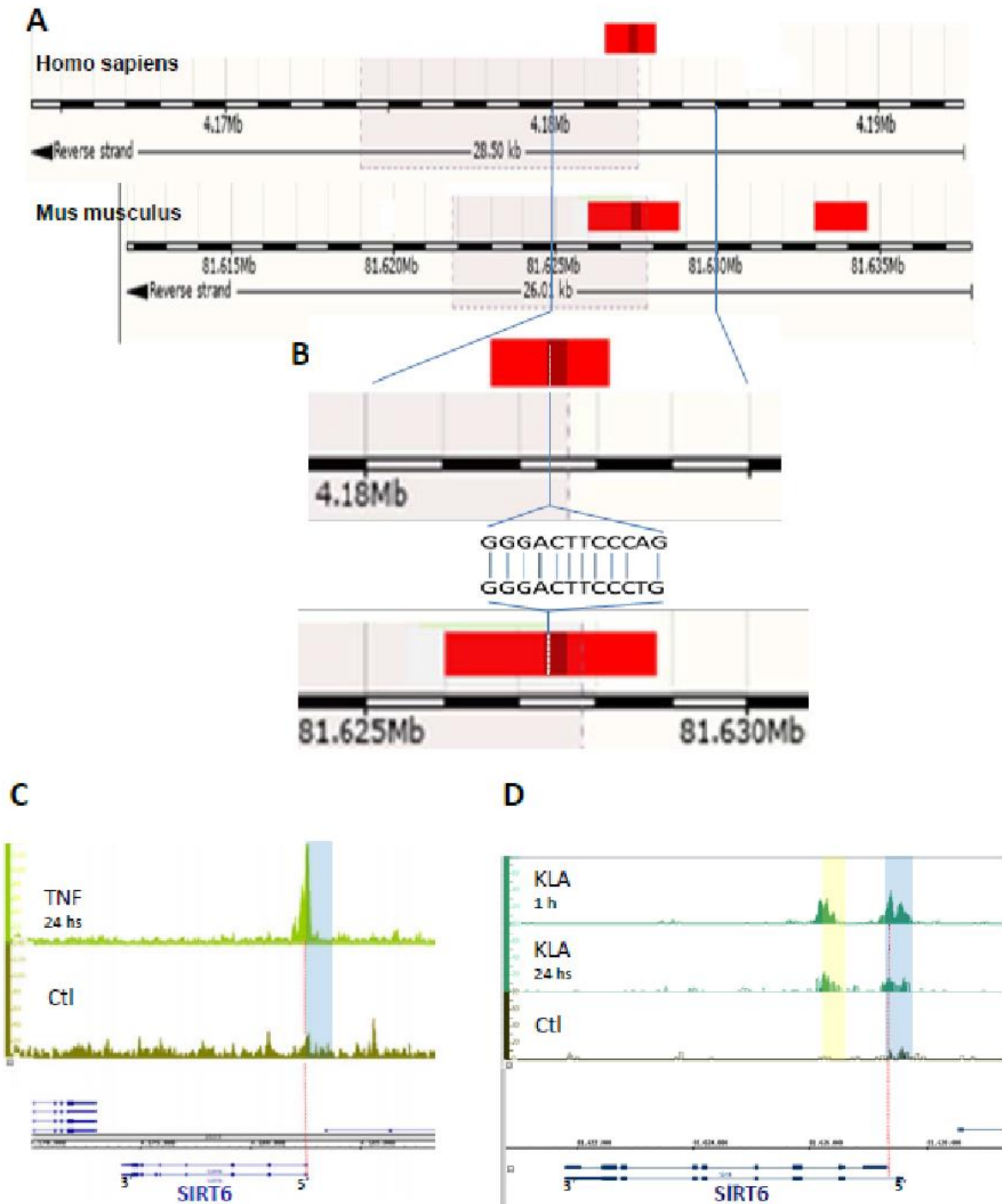


Figura 21. El análisis del promotor de Sirt6 presenta secuencias consenso reconocidas por NFkB y las mismas están enriquecidas en análisis de Chip-Seq para p65. A. Esquema representativo del gen *Sirt6* (caja gris) y sus regiones promotoras (cajas rojas), adaptado de Ensembl. Luego del alineamiento nos quedamos con una secuencia de 280 nt (región sombreada en caja roja). **B.** Magnificación de A en la zona comprendida entre las líneas azules, donde se estudió la presencia de secuencias consenso de unión a NFkB(p65) mediante la herramienta PROMO. Los resultados mostraron una secuencia consenso de unión a NFkB(p65) (línea blanca punteada). **C.** Análisis mediante HOMER donde se muestran un pico de lecturas en una región a 150pb corriente arriba (caja celeste) de la secuencia consenso predicha por PROMO (línea roja punteada) para el promotor de *Sirt6* humano. **D.** Análisis mediante HOMER donde se muestra un pico en el número de lecturas en las muestras tratadas 1 o 24h y mayor al control en una región ubicada a 1000 pb corriente abajo (caja amarilla) de la secuencia predicha por PROMO (línea roja punteada en caja celeste).

Como mostramos en la primera parte de este objetivo, al igual que en la inflamación aguda, en la inflamación crónica inducida por sobreexpresión de RAS, hay incrementos de expresión de SIRT6 y este incremento proteico, se acompaña de una mayor síntesis del mensajero. Con este último análisis *in silico* pudimos además mostrar que NFkB podría ser uno de los factores encargados de producir este incremento. Terminados los análisis *in vitro* e *in silico*, nos propusimos continuar los estudios analizando la expresión de SIRT6 *in vivo*, utilizando un modelo de inflamación crónica usado en nuestro laboratorio, el modelo de obesidad inducida por dieta.

Para ello un grupo de ratones C57BL/6J adultos machos fueron sometidos a una dieta rica en grasa y azúcares (WD) por 10 semanas. Durante el transcurso del experimento se controló el peso, donde pudimos apreciar tempranamente diferencias en la ganancia de peso de los ratones en WD respecto a los alimentados con dieta estándar (dieta normal ND, del inglés normal diet), las cuales fueron significativas a partir de la semana 2 con la dieta (**Fig.22A**). Los ratones fueron ganando peso y a la semana 10 de WD, finalizado el experimento, presentaron hiperglucemia en ayuno (**Fig.22B**). El análisis mediante hemograma de los leucocitos de la sangre periférica evidenció una mayor inflamación sistémica, medida por una mayor proporción de células inmunes en los ratones en dieta WD, incluyendo monocitos, neutrófilos y linfocitos (**Fig.22C**). Por otro lado, a pesar de ser muy poco el tiempo de dieta como para evaluar parámetros de daño renales y hepáticos, encontramos niveles incrementados de la enzima Alanina aminotransferasa (ALT) en el hígado y de Creatinina (CRE) en el riñón (**Fig.22D**). Analizamos de esta forma la funcionalidad de varios de los tejidos que se ven fuertemente afectados durante la obesidad y qué son fundamentales para el manejo de la glucosa en condiciones saludables.

A continuación, nos interesó evaluar y comparar los niveles de expresión de *Sirt6* y *Tnfa* en el tejido adiposo de ratones ND y WD. No se observaron diferencias significativas entre los niveles de ARNm de los marcadores previamente señalados en condiciones ND versus WD (**Fig.22E**). Realizamos también, un fraccionamiento del tejido y nos quedamos exclusivamente con su FEV que contiene las células infiltrantes del mismo, además de pre-adipocitos, fibroblastos y células endoteliales. En esta fracción observamos diferencias significativas en la expresión de los ARN mensajeros de *Sirt6* y *Tnfa*, los cuales se ven incrementados en los animales en dieta WD (**Fig.22F**). En adición, se observó también un incremento en los niveles proteicos de TNFα en condiciones WD (**Fig.22G**). Esta fracción fue posteriormente analizada por citometría de flujo, con el fin de evaluar los niveles de expresión de SIRT6 en macrófagos.

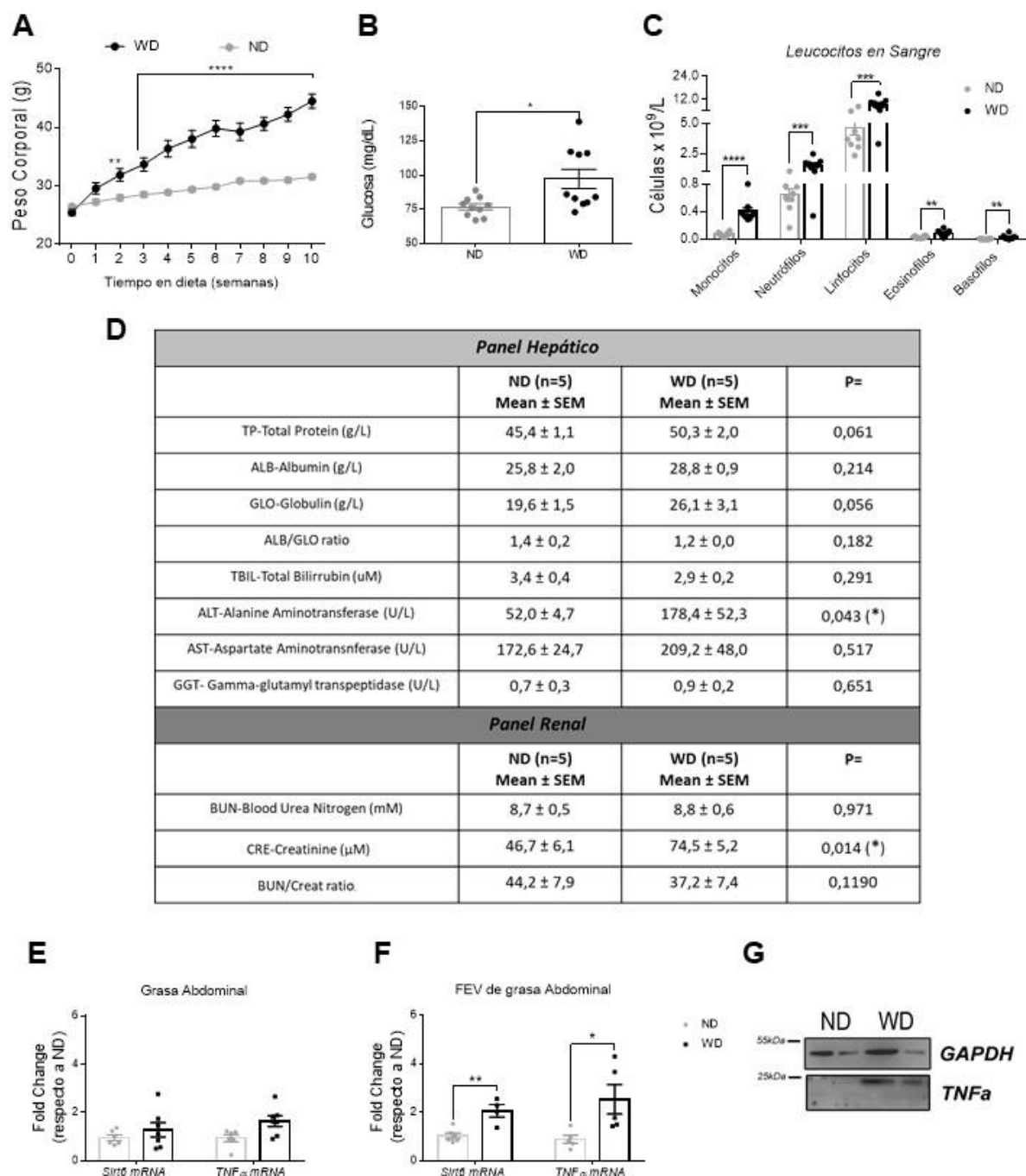


Figura 22. Los parámetros metabólicos e inflamatorios de ratones sometidos a dietas ND y WD se acompañan de incrementos de expresión de SIRT6 en la FEV. A. Ganancia de peso de ratones alimentados con una dieta Western respecto a los alimentados con una dieta normal durante 10 semanas (n=10). B. Glucemia basal medida en ayuno en ratones ND y WD luego de 10 semanas de dieta (n=10). C. Hemograma realizado de sangre periférica obtenida por sangrado submandibular de ratones ND y WD luego de 10 semanas de dieta (n=5). D. Parámetros hepáticos y renales medidos en la sangre de ratones ND y WD luego de 10 semanas de dieta (n=5). E. Niveles del ARNm de *Sirt6* y *Tnfα* del tejido adiposo de ratones ND y WD luego de 10 semanas de dieta (n=7). F. Niveles del ARNm de *Sirt6* y *Tnfα* de la FEV del tejido adiposo de ratones ND y WD luego de 10 semanas de dieta (n=7). G. WB representativo de *TNFα* donde se comparan la FEV en ND versus WD. En los gráficos se representan las medias ± SEM. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Los resultados obtenidos de la citometría de la FEV de animales bajo ND y WD muestran un menor reclutamiento de células SIRT6⁺ en la población inmune definida por CD45⁺CD11⁺F4/80⁺ en ratones WD, si se los compara con los ND (**Fig.23B**). A

pesar de ello, la GMFI de SIRT6 medida en esta población es significativamente mayor que la de los ND (**Fig.23C**). Siguiendo el análisis de las fracciones, la población de células definidas como $CD45^-$ que incluye las células de la FEV que no son leucocitos, también tiene un porcentaje menor de células SIRT6⁺ en WD (**Fig.23D**), sin embargo, esta población tiene una menor intensidad de fluorescencia de SIRT6 (**Fig.23E**).

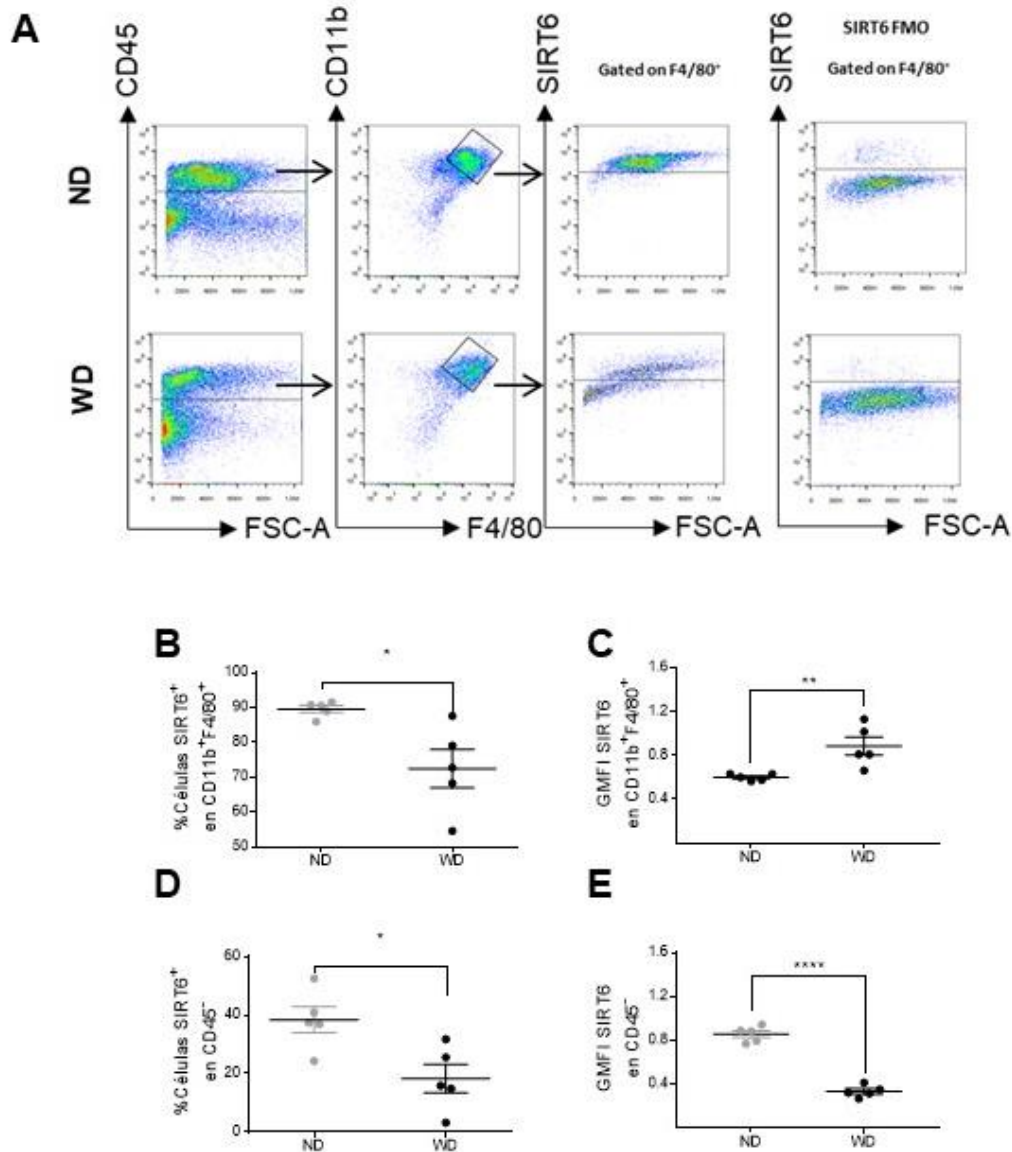


Figura 23. La población de macrófagos del tejido adiposo presenta una mayor intensidad de SIRT6 en los ratones que fueron sometidos a WD. **A.** Estrategia de selección empleada para definir los macrófagos del tejido adiposo y evaluar en ellos SIRT6. **B.** Porcentajes de células SIRT6⁺ dentro de la población definida por CD11b⁺F4/80⁺. **C.** Media de Fluorescencia Geométrica para SIRT6 dentro de la población CD11b⁺F4/80⁺. **D.** Porcentajes de células SIRT6⁺ dentro de la población definida por CD45⁻. **E.** Media Geométrica de la Intensidad de Fluorescencia para SIRT6 dentro de la población CD45⁻ (n=5). En los gráficos se representan las medias $\pm$ SEM. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Así, la FEV presenta mayor intensidad en la población de macrófagos definido por CD11b⁺F4/80⁺, hecho que sugiere una mayor expresión de la proteína que podría correlacionarse, al menos en parte, con los incrementos a nivel mensajero observados en la FEV (**Fig.22F**). La menor proporción de células SIRT6⁺ en la FEV de los ratones

en WD, no era un resultado esperado, quizás la utilización de otros marcadores nos permitan identificar en más detalle cuales son los macrófagos que están contribuyendo a los incrementos observados en la GMFI.

Finalizamos entonces el OE2, mostrando una vez más que los incrementos de SIRT6 *in vitro*, se recapitulan *in vivo*, lo cual nos impulsó a realizar un modelo murino para comprender con mayor profundidad el rol de SIRT6 *in vivo*. De esta forma, llegamos al OE3, el cual consistió en *generar un modelo animal transgénico tejido-específico KO para SIRT6 en macrófagos y realizar una caracterización inicial del mismo en el contexto de inflamación inducida por obesidad*.

Para cumplir este objetivo, como ya se detalló previamente en materiales y métodos, se adquirieron dos ratones cuyo cruce nos permitió obtener el genotipo deseado. Debido a que el fondo genético de los mismos era diferente, en primer lugar, realizamos 10 retro cruza por C57BL/6J. Estas fueron necesarias para poder realizar los experimentos de WD en las mismas condiciones en que se realizó el OE2. Realizadas las retro cruza y obtenido el ratón *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+*, con macrófagos SIRT6 KO e inducible por tamoxifeno, se procedió a caracterizarlo y ajustar las dosis de tamoxifeno necesarias para inducir la delección de SIRT6 en macrófagos. El primer abordaje que utilizamos fue el cultivo de macrófagos de médula ósea BMDM, de ratones *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* y la adición al cultivo de 4-OH-Tamoxifeno. La adición de este compuesto a una concentración de 2 μ M en el medio de cultivo generó una disminución de la expresión de SIRT6 en los macrófagos tratados medido por WB (**Fig.24A**), que además se reflejaba en los niveles de mensajero de *Sirt6* (**Fig.24B**).

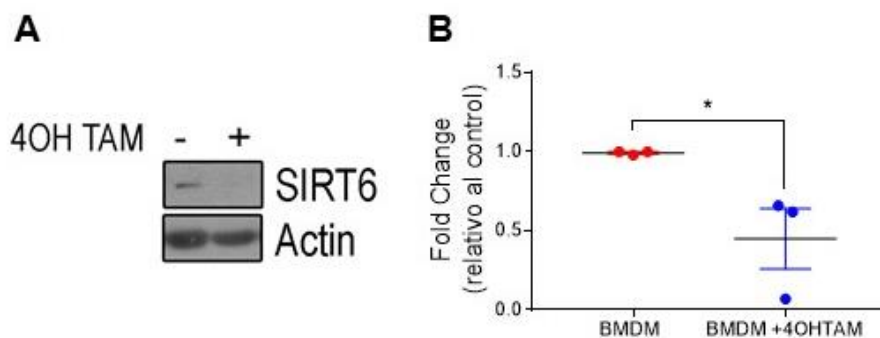


Figura 24. Los macrófagos diferenciados de Médula Ósea de ratones *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* escinden SIRT6 en respuesta al 4-OH-Tamoxifeno. **A.** WB representativo de SIRT6 donde se comparan BMDM con y sin 4-OH-Tamoxifeno (2 μ M). **B.** Niveles del ARNm de *Sirt6* donde se comparan BMDM con y sin 4-OH-Tamoxifeno (2 μ M). En el gráfico se representan las medias $\pm$ SEM. *p<0,05.

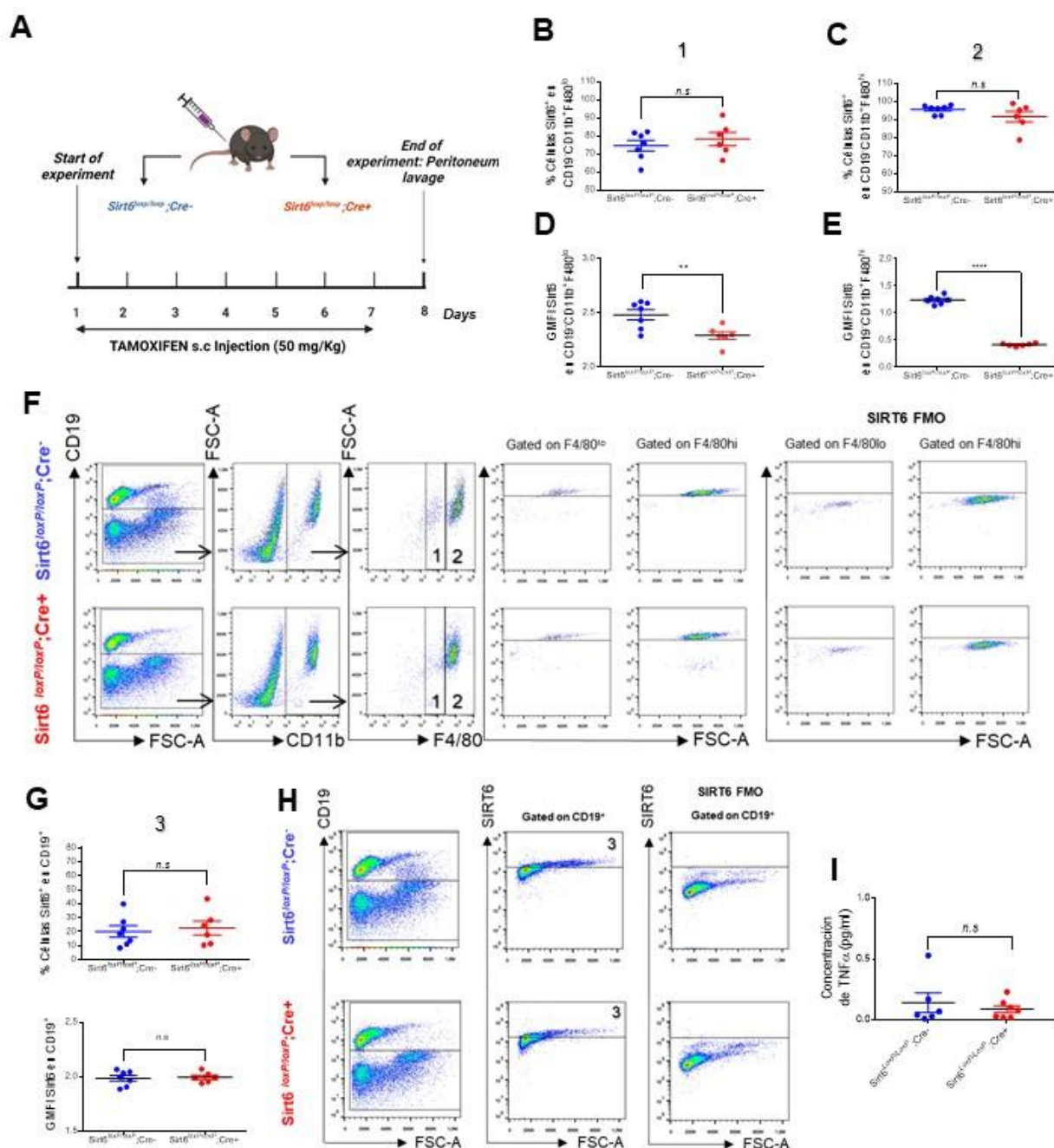


Figura 25. Los macrófagos $CD19^+CD11b^+F4/80^{hi}$ del peritoneo de ratones $Sirt6^{loxP/loxP};Cre^+$ tratados con Tamoxifeno presenta una menor intensidad de SIRT6. A. Esquema de la forma de administración de Tamoxifeno en ratones $Sirt6^{loxP/loxP};Cre^+$ y sus controles $Sirt6^{loxP/loxP};Cre^-$ (n=7 y n=6, respectivamente). B. Porcentajes de células SIRT6⁺ dentro de la población de macrófagos del peritoneo, definida como $CD19^+CD11b^+F4/80^{lo}$. C. Media Geométrica de la Intensidad de Fluorescencia para SIRT6 dentro de la población de macrófagos $CD19^+CD11b^+F4/80^{lo}$. D. Porcentajes de células SIRT6⁺ dentro de la población definida como $CD19^+CD11b^+F4/80^{hi}$. E. Media Geométrica de Fluorescencia para SIRT6 dentro de la población de macrófagos $CD19^+CD11b^+F4/80^{hi}$. F. Estrategia de selección empleada para definir las poblaciones de macrófagos de la cavidad peritoneal y evaluar en ellos la expresión de SIRT6. G. Porcentajes de células SIRT6⁺ y Media Geométrica de la Intensidad de SIRT6, dentro de la población de linfocitos B, definida como $CD19^+$. H. Estrategia de selección empleada para definir los linfocitos B de la cavidad peritoneal y evaluar en ellos SIRT6. I. Concentración de TNF α obtenido del lavado del peritoneo de ratones $Sirt6^{loxP/loxP};Cre^+$ y sus controles $Sirt6^{loxP/loxP};Cre^-$ (n=4). En los gráficos se representan las medias $\pm$ SEM. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Confirmada la escisión de SIRT6 en los BMDM del ratón $Sirt6^{loxP/loxP};Cre^+$ en cultivo, quisimos confirmar la escisión del gen en los macrófagos *in vivo* mediante el análisis por citometría de los macrófagos peritoneales. Para ello, realizamos un protocolo de

administración de Tamoxifeno, que se muestra en la **Fig.25A** (detallado previamente en materiales y métodos). Del lavado del peritoneo de ratones no estimulados sometidos al tratamiento con Tamoxifeno realizamos citometría de flujo diferenciando macrófagos **CD19⁺CD11b⁺F4/80^{hi}** y **CD19⁺CD11b⁺F4/80^{lo}**. A pesar de no encontrar diferencias en la cantidad de células SIRT6⁺ evaluadas en ambas poblaciones de macrófagos, si se lograron ver diferencias significativas entre las GMFI de ratones *Sirt6*^{loxP/loxP};Cre⁺ y sus controles *Sirt6*^{loxP/loxP};Cre⁻, teniendo estos últimos mayores niveles de intensidad media (**Fig.25B-E**). En contraposición, el conjunto de la población de células englobadas dentro de CD19⁺, la cual incluye otras células inmunes como los Linfocitos B, no presenta diferencias ni en porcentaje, ni en intensidad media entre ratones *Sirt6*^{loxP/loxP};Cre⁺ y sus controles *Sirt6*^{loxP/loxP};Cre⁻ (**Fig.25G**). Tal como se puede apreciar en la estrategia de selección empleada (**Fig.25F**), la población mayoritaria de macrófagos es la señalada con el número 2 (**Fig.25**), **CD19⁺CD11b⁺F4/80^{hi}**, la cual constituye la población residente del peritoneo. Al ser un peritoneo no estimulado, es de esperar la poca cantidad de macrófagos infiltrantes, señalados en la figura como la población 1, **CD19⁺CD11b⁺F4/80^{lo}**. Ambas poblaciones de macrófagos responden al Tamoxifeno, no observándose efectos ni diferencias sobre la concentración de TNFα en el peritoneo (**Fig.25I**).

Estudiamos también los parámetros fisiológicos de los ratones *Sirt6*^{loxP/loxP};Cre⁺ y sus controles *Sirt6*^{loxP/loxP};Cre⁻, los cuales fueron alimentados con dieta estándar no encontrando diferencias en la cantidad de monocitos, neutrófilos, linfocitos, eosinófilos y basófilos en sangre periférica (**Fig.26A**), tampoco en los niveles de glucosa en ayuno (**Fig.26B**), ni en el peso corporal (**Fig.26C**).

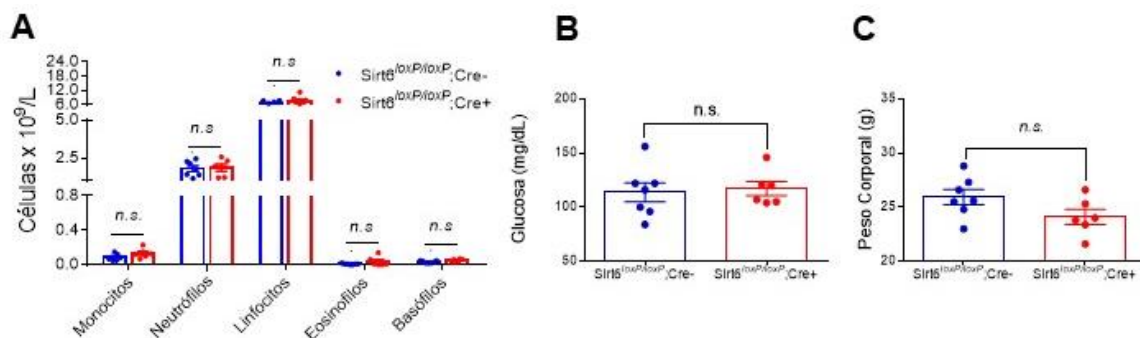


Figura 26. Los parámetros fisiológicos de leucocitos en sangre, glucosa y peso son iguales en ratones *Sirt6*^{loxP/loxP};Cre⁺ y sus controles *Sirt6*^{loxP/loxP};Cre⁻ alimentados con ND. A. Hemograma realizado de sangre periférica obtenida por sangrado submandibular de ratones *Sirt6*^{loxP/loxP};Cre⁺ y sus controles *Sirt6*^{loxP/loxP};Cre⁻ en dieta normal. B. Glucemia basal medida en ayuno en ratones *Sirt6*^{loxP/loxP};Cre⁺ y sus controles *Sirt6*^{loxP/loxP};Cre⁻ en dieta normal. C. Peso de ratones *Sirt6*^{loxP/loxP};Cre⁺ y sus controles *Sirt6*^{loxP/loxP};Cre⁻ en dieta normal. (n=6) En los gráficos se representan las medias ± SEM. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Finalizando este objetivo, resta analizar el comportamiento de los ratones *Sirt6*^{loxP/loxP};Cre⁺ y sus controles *Sirt6*^{loxP/loxP};Cre⁻ al ser sometidos a una dieta WD durante 10 semanas. A partir de la semana 8, se realizaron inyecciones sucesivas de Tamoxifeno con el fin de analizar si la escisión de SIRT6, luego del desarrollo de obesidad, genera la reversión del fenotipo metabólico desarrollado por la WD. Los

ratones luego de la primera semana de dieta comenzaron a ganar peso significativamente, mostrando un peso siempre mayor al del inicio del tratamiento. Respecto a la ganancia de peso el grupo de ratones *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* no se diferenció de sus controles *Sirt6^{loxP/loxP};Cre-* (**Fig.27A**). La glucemia basal de los ratones *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* y sus controles *Sirt6^{loxP/loxP};Cre-* en ND no presentó diferencias significativas, tal como vimos en la figura **Fig.26B**. Luego de transcurridas 6 semanas de dieta WD los ratones aún no habían desarrollado hiperglucemia y tampoco mostraban diferencias entre ellos. Finalmente, luego de 2 semanas de inyecciones de tamoxifeno y alcanzada la semana 10 de WD, los ratones controles desarrollaron hiperglucemia diferenciándose significativamente de ellos mismos en las dos medidas previas de glucosa en sangre, así como de los ratones *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+*. La glucemia de estos últimos permaneció igual durante todo el tratamiento (**Fig.27C**).

Referente a la evaluación del panel hepático y renal y focalizándonos en ALT y CRE, que habíamos observado alteradas a causa de la WD (**Fig.22D**), se vuelve a observar una menor incidencia de la dieta WD sobre estas en los ratones *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+*. Los niveles de ALT y CRE son significativamente menores en los ratones *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* en comparación con los controles (**Fig.27F**). Finalmente, el hemograma realizado en la sangre periférica, muestra niveles significativamente menores de leucocitos en la sangre de ratones *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+*, con excepción de los basófilos que no presentan diferencias (**Fig.27C**). Si comparamos estos valores con los obtenidos en la **Fig.22C**, los valores de los ratones *Sirt6^{loxP/loxP};Cre-* son más similares a los de WD y los *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* se asimilaron a los ND. En concordancia, el lavado del peritoneo de los ratones *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* presentó menor TNF α en comparación con sus controles (**Fig.27D**). Los niveles de TNF α en el plasma obtenidos de ambos ratones dieron por debajo de los niveles de detección. En suma, los ratones *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* están menos afectados por los efectos de la WD que sus controles, al menos en estas condiciones experimentales.

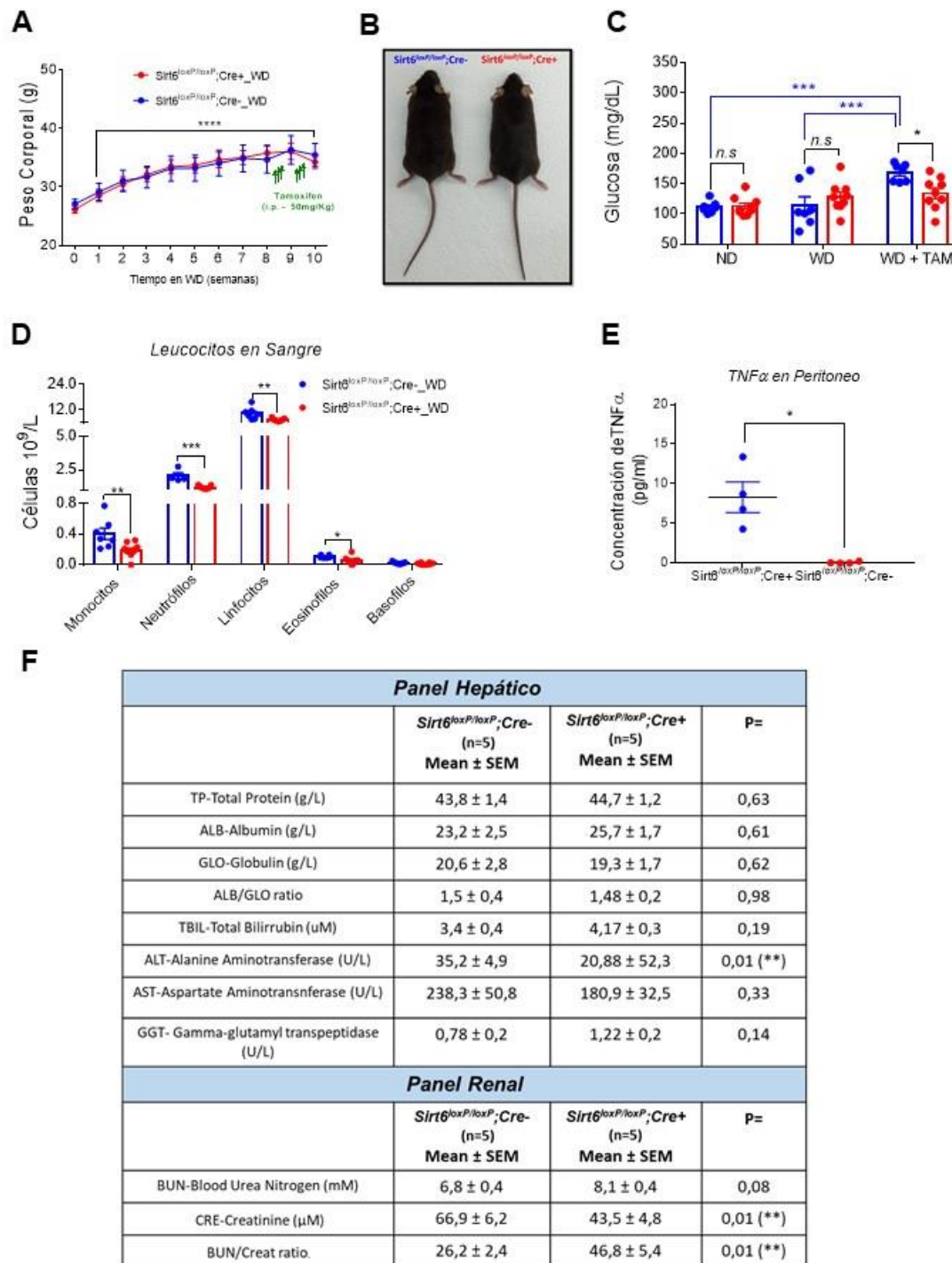


Figura 27. Los parámetros metabólicos e inflamatorios de ratones *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* en WD reversion los efectos de la dieta. **A.** Ganancia de peso de ratones *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* y sus controles *Sirt6^{loxP/loxP};Cre-* alimentados con WD (n=9 y n=8, respectivamente). **B.** Imagen de los ratones *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* y sus controles *Sirt6^{loxP/loxP};Cre-*. **C.** glucemia basal medida en ayuno en ratones *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* y sus controles *Sirt6^{loxP/loxP};Cre-* en ND, previo a la administración de Tamoxifeno y luego de esta. **D.** Hemograma realizado de sangre periférica obtenida por sangrado submandibular de ratones *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* y sus controles *Sirt6^{loxP/loxP};Cre-* luego de 10 semanas de dieta. **E.** Concentración de TNF α obtenido del lavado del peritoneo de ratones *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* y sus controles *Sirt6^{loxP/loxP};Cre-* (n=4). **F.** Parámetros hepáticos y renales medidos en la sangre de ratones *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* y sus controles *Sirt6^{loxP/loxP};Cre-*. En los gráficos se representan las medias $\pm$ SEM. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Algunos de los resultados mostrados previamente, fueron publicados posterior a la defensa de esta tesis y se encuentran a continuación.



SIRT6 stabilization and cytoplasmic localization in macrophages regulates acute and chronic inflammation in mice

Received for publication, September 30, 2021, and in revised form, February 1, 2022. Published, Papers in Press, February 9, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101711>

Mariana Bresque^{1,2}, Karina Cal^{1,3}, Valentina Pérez-Torrado^{1,4,5}, Laura Colman^{1,6}, Jorge Rodríguez-Duarte², Cecilia Vilaseca⁷, Leonardo Santos¹, María Pía Garat¹, Santiago Ruiz¹, Frances Evans^{8,9}, Rosina Dapuerto^{1,2}, Paola Contreras^{1,7}, Aldo Calliari^{1,3}, and Carlos Escande^{1,*}

From the ¹Laboratory of Metabolic Diseases and Aging, and ²Laboratory of Vascular Biology and Drug Development, INDICYO Program, Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay; ³Departamento de Biociencias, Facultad de Veterinaria, ⁴Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, ⁵Área Inmunología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, ⁶Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, ⁷Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, and ⁸Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay; ⁹Laboratory of Neuroinflammation and Gene Therapy, Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay

Edited by Dennis Voelker

Acute and chronic inflammations are key homeostatic events in health and disease. Sirtuins (SIRT), a family of NAD-dependent protein deacetylases, play a pivotal role in the regulation of these inflammatory responses. Indeed, SIRT have anti-inflammatory effects through a myriad of signaling cascades, including histone deacetylation and gene silencing, p65/RelA deacetylation and inactivation, and nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat, and pyrin domain-containing protein 3 inflammasome inhibition. Nevertheless, recent findings show that SIRT, specifically SIRT6, are also necessary for mounting an active inflammatory response in macrophages. SIRT6 has been shown to positively regulate tumor necrosis factor alpha (TNF α) secretion by demyristoylating pro-TNF α in the cytoplasm. However, how SIRT6, a nuclear chromatin-binding protein, fulfills this function in the cytoplasm is currently unknown. Herein, we show by Western blot and immunofluorescence that in macrophages and fibroblasts there is a subpopulation of SIRT6 that is highly unstable and quickly degraded *via* the proteasome. Upon lipopolysaccharide stimulation in Raw 264.7, bone marrow, and peritoneal macrophages, this population of SIRT6 is rapidly stabilized and localizes in the cytoplasm, specifically in the vicinity of the endoplasmic reticulum, promoting TNF α secretion. Furthermore, we also found that acute SIRT6 inhibition dampens TNF α secretion both *in vitro* and *in vivo*, decreasing lipopolysaccharide-induced septic shock. Finally, we tested SIRT6 relevance in systemic inflammation using an obesity-induced chronic inflammatory *in vivo* model, where TNF α plays a key role, and we show that short-term genetic deletion of SIRT6 in macrophages of obese mice ameliorated systemic inflammation and hyperglycemia, suggesting that SIRT6 plays an active role in inflammation-mediated glucose intolerance during obesity.

* For correspondence: Carlos Escande, escande@pasteur.edu.uy.



SIRT6 regulates TNF α secretion in macrophages *in vivo*

to the cytoplasm during this acute inflammatory response is currently unknown. Importantly, although the cytoplasmic localization of SIRT6 is linked to a proinflammatory function, its role in the nucleus is more complex. It was shown that SIRT6 silences NF κ B-dependent transcription (16). On the contrary, in pancreatic cancer cells, SIRT6 overexpression increases Ca²⁺ influx indirectly, leading to nuclear factor of activated T cell–dependent TNF α and interleukin 8 induction (9). This suggests that the role of SIRT6 during inflammation is complex and probably under tight spatiotemporal regulation, although the evidence in this sense is scarce. Even more, whether SIRT6 regulates TNF α secretion *in vivo* during inflammation is not known. The possible implications of this regulation go beyond LPS-mediated acute inflammation, since macrophage-derived TNF α is also a driving force for chronic inflammation, glucose intolerance, and tissue damage during obesity (17, 18).

Herein, we show that in macrophages and fibroblasts, LPS treatment promotes a rapid increase in SIRT6 expression that is independent of transcription. Inhibition of the ubiquitin proteasome and blocking of protein synthesis revealed that there is a subpopulation of SIRT6 that is highly unstable. Upon LPS stimulation, SIRT6 is rapidly stabilized in the cytoplasm, locates to the ER, and promotes TNF α secretion. Acute SIRT6 inhibition dampened TNF α secretion both *in vitro* and *in vivo*, showing that SIRT6 is a positive regulator of TNF α secretion *in vivo*. In fact, acute SIRT6 inhibition ameliorated LPS-dependent septic shock. Finally, we show that time-controlled genetic deletion of SIRT6 in macrophages of obese mice decreased obesity-dependent TNF α secretion and ameliorated systemic inflammation and hyperglycemia, suggesting that SIRT6 plays an active role in inflammation-mediated glucose intolerance after the onset of obesity.

Results

SIRT6 is rapidly upregulated in response to LPS in macrophages

In order to gain insight into how SIRT6 is regulated during acute inflammatory response, we treated Raw 264.7 macrophages with LPS (200 ng/ml) for different periods. We found that LPS promoted a fast increase in SIRT6 protein levels that became significant as early as 1 h after stimulation (Fig. 1, A and B). This SIRT6 accumulation was time dependent and continued to rise for up to 24 h after LPS stimulation (Fig. 1, C and D). Surprisingly, the increase in protein expression was not preceded by changes in mRNA (Fig. 1E). Based on these results, we sought to determine if SIRT6 could be subject to post-transcriptional regulation, leading to a fast upregulation during inflammatory response. For that, we treated Raw 264.7 cells with LPS with the proteasome inhibitor MG132 and with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX) for a short period (1 h). We found that MG132 led to a fast and comparable increase in SIRT6 protein (Fig. 1, F and G). On the contrary, inhibition of protein synthesis with CHX generated a time-dependent decrease in SIRT6 protein levels (Fig. 1, H and I). Time response experiments with CHX and MG132 showed

that in macrophages SIRT6 has a short half-life (~3 h, Fig. 1J). The fast upregulation of SIRT6 protein levels in response to LPS treatment was coincidental with the increase in TNF α synthesis and secretion (Fig. 1, K–M). Similar results were obtained using MEFs. In these cells, LPS led to a rapid increase in SIRT6 protein levels independently of mRNA, and this SIRT6 protein increase was sensitive to MG132 and CHX. Furthermore, incubation of cells with combination of LPS and MG132 produced similar changes as either stimuli alone, suggesting that the same pool of SIRT6 is being regulated by both compounds (Fig. S1).

Upon LPS stimulation, stabilized SIRT6 localizes in the nucleus and cytoplasm

Next, we determined the subcellular localization of SIRT6 during LPS-induced macrophage activation. Subcellular fractionation showed that LPS promoted a clear upregulation of SIRT6 in the cytoplasm and also to some extent in the nucleus (Fig. 2, A and B). Immunofluorescence analysis and quantitation on Raw 264.7 cells and in bone marrow–derived macrophages (BMDMs) showed that LPS led to an accumulation in SIRT6 both in the nucleus and cytoplasm (Figs. 2, C–E and S2). The specificity of the cytoplasmic signaling of SIRT6 was validated by siRNA-mediated SIRT6 knockdown (Fig. S2). The increase in SIRT6 cytoplasmic signal was statistically significant 1 h after treatment and remained high for up to 24 h (Fig. 2E). Since it has been proposed that cytoplasmic SIRT6 is necessary for TNF α secretion (7, 8), we sought to determine if rapid cytoplasmic SIRT6 upregulation could play a role in this pathway. TNF α is synthesized and secreted by the classical secretory pathway. Once in the ER, the cytoplasmic tail of TNF α has to be demyristoylated by SIRT6 in order to avoid being targeted to lysosomes and instead traffic to the cell surface (8). We measured TNF α in the cells in response to LPS, and similar to SIRT6, we found an increase in its cytoplasmic staining 1 h after LPS treatment, remaining high even 24 h later (Fig. 2F). Next, we aimed to determine if the increase in cytoplasmic SIRT6 corresponded with an ER accumulation of the protein. We labeled the ER with ER-Tracker Red Dye (Fig. 2G) and then measured the amount of SIRT6 in the ER area. We found that upon LPS treatment, SIRT6 readily accumulated in the ER area within 1 h of LPS treatment (Fig. 2H), coincidental with TNF α increase (Fig. 2F). Furthermore, we measured the Mander's overlap coefficient and found that LPS treatment led to an increase in the localization of SIRT6 into the ER (Fig. 2I).

Acute SIRT6 inhibition decreases TNF α secretion without affecting its intracellular expression

In order to determine if SIRT6 stabilization and cytoplasmic localization was directly linked to TNF α secretion, we treated cells with the recently described (19) SIRT6 inhibitor 2,4-dioxo-N-[4-(pyridin-3-yloxy)phenyl]-1,2,3,4-tetrahydroquinazolin-6-sulfonamide (compound 1). Since chronic SIRT6 deletion promotes TNF α transcription (Fig. S2), we sought to minimize this effect by treating cells acutely with compound 1,

SIRT6 regulates TNF α secretion in macrophages in vivo

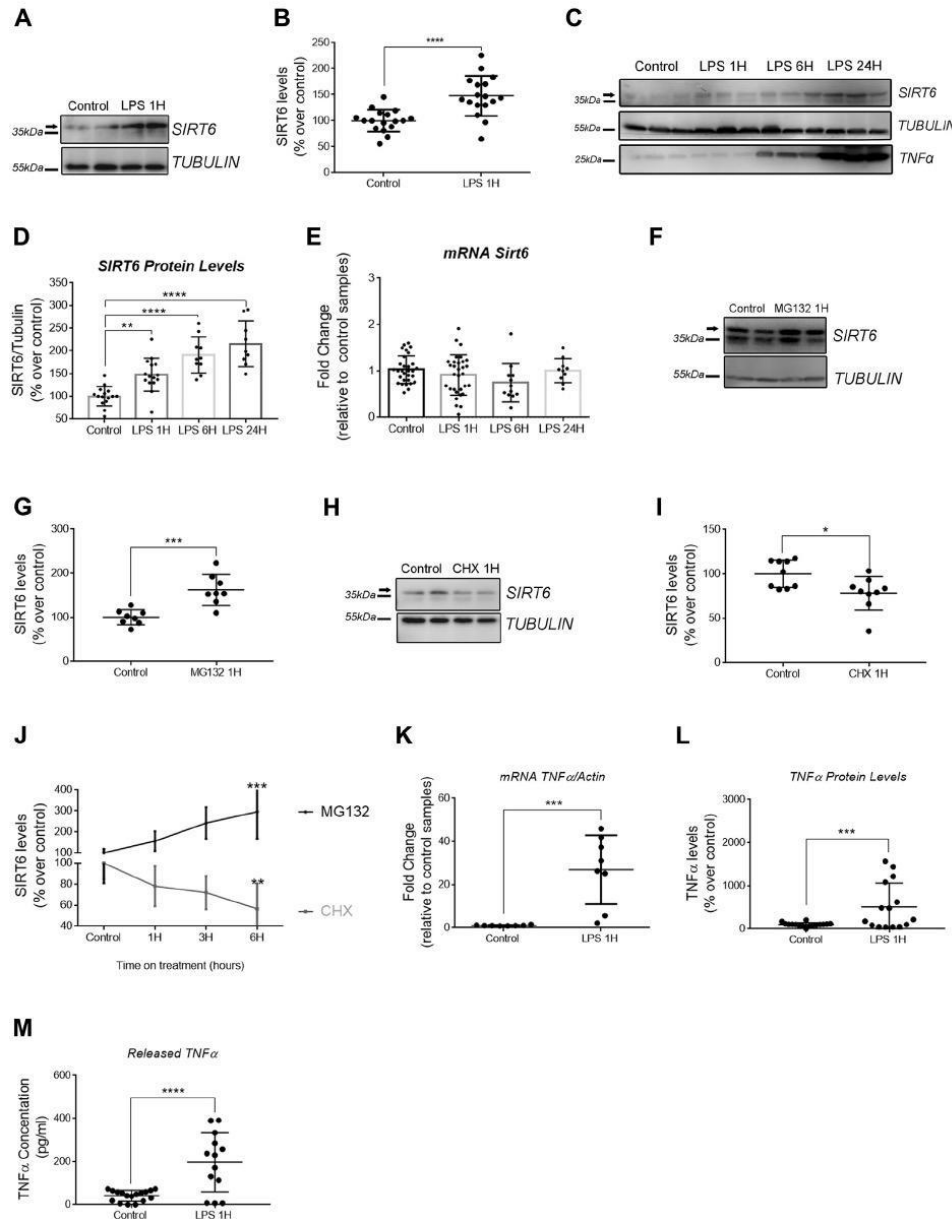


Figure 1. SIRT6 is upregulated by protein stabilization in response to LPS in macrophages. A, representative Western blot (WB) of SIRT6 protein levels in Raw 264.7 cells exposed to LPS (200 ng/ml) for 1 h. Each condition is shown in triplicates. B, densitometry analysis of SIRT6 in the conditions described in A. C, representative WB of SIRT6 protein levels in Raw 264.7 cells exposed to LPS (200 ng/ml) for 1, 6, and 24 h. Each condition is shown in triplicates. D, densitometry analysis of SIRT6 as described in C. E, *Sirt6* mRNA levels in Raw 264.7 cells exposed to LPS (200 ng/ml) for 1, 6, and 24 h. F and G, representative WB and densitometry analysis of SIRT6 protein levels in Raw 264.7 cells exposed to MG132 (10 μ M) for 1 h. H and I, representative WB and densitometry analysis of SIRT6 protein levels in Raw 264.7 cells exposed to cycloheximide (CHX, 100 μ g/ml) for 1 h. J, densitometry of SIRT6 levels relative to control samples in Raw 264.7 cells exposed to MG132 (10 μ M) for 1, 3, and 6 h (black line) and CHX (1 μ g/ml) for 1, 3, and 6 h (gray line) treatments. K, *Tnf α*

SIRT6 regulates TNF α secretion in macrophages *in vivo*

together with LPS stimulation. LPS-dependent intracellular TNF α protein levels were not affected by the inhibitor, as immunofluorescence staining showed similar staining and distribution of intracellular TNF α in response to LPS in the presence or the absence of compound 1 (Fig. 3A). A basal TNF α signal could be detected in some cells, an effect that could be attributed to the dimethyl sulfoxide (DMSO) treatment, since it was also seen in control cells (Fig. 3A). We further confirmed these results by Western blot, where we found that the SIRT6 inhibitor did not significantly affect intracellular TNF α levels in response to LPS (Fig. 3, B and C). However, when we measured the amount of TNF α secreted to the cellular medium, we found that inhibition of SIRT6 significantly reduced the LPS-mediated TNF α secretion (Fig. 3D), supporting our hypothesis that rapid upregulation of cytoplasmic SIRT6 accumulation and localization to the ER in response to LPS is necessary of TNF α secretion. Similar results for TNF α secretion were obtained in MEFs (Fig. S2).

Acute SIRT6 inhibition *in vivo* inhibits LPS-induced TNF α secretion and reduces septic shock

The effects of SIRT6 inhibition in systemic inflammation are varied and sometimes opposite. While genetic, chronic SIRT6 inhibition in macrophages promotes inflammation and insulin resistance (20), pharmacological inhibition of SIRT6 ameliorates glucose intolerance during diet-induced obesity (DIO) (19). In the same line, recent findings in an experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model show that acute pharmacological SIRT6 inhibition decreases TNF α secretion (21). Since nuclear and cytoplasmic SIRT6 seem to play opposite roles in relation to TNF α secretion and inflammation, dissecting *in vivo* effects may need to consider the time frame during which SIRT6 activity is predominant. First, we sought to determine if SIRT6 was acutely upregulated during inflammation *in vivo*. For this purpose, we treated mice with LPS (10 mg/kg, IP) for 2 h and then isolated the peritoneal cavity cells and lavage fluid. Expression profile from total peritoneal cavity cell fraction showed no changes in SIRT6 mRNA (Fig. 4A). As expected, TNF α secretion into peritoneal cavity fluid was significantly upregulated by the treatment with LPS (Fig. 4, B and C). Next, we analyzed SIRT6 protein levels in macrophages from the peritoneal cavity by flow cytometry (Fig. 4, D–H). In the case of CD11b⁺F4/80^{lo} (recruited) macrophages, LPS did not affect SIRT6 protein levels, either in the percent of SIRT6-positive cells (Fig. 4E) or in SIRT6 fluorescence intensity (measured as geometric mean fluorescence intensity in SIRT6⁺ cells) (Fig. 4F). However, when we analyzed CD11b⁺F4/80^{hi} (resident) macrophages, we found that LPS led to a significant increase in both SIRT6-positive cells (Fig. 4G) and SIRT6 fluorescence intensity within those cells (Fig. 4H). Immunofluorescence analysis of the SIRT6 subcellular localization in the peritoneal cavity cellular fraction showed a significant increase in SIRT6 staining both in the

nucleus and in the cytoplasm after LPS treatment (Fig. 5, A–C). The effect of cytoplasmic SIRT6 accumulation *in vivo* during LPS stimulation was further confirmed in thioglycollate-elicited macrophages (Fig. 5, D and E). Finally, we investigated if acute SIRT6 inhibition decreased the LPS-dependent inflammatory response and septic shock *in vivo*. We treated mice with LPS (20 mg/kg) or LPS + compound 1 (30 mg/kg) for 2 h and found that SIRT6 inhibition completely blocked acute TNF α secretion *in vivo* (Fig. 5F). Consistent with this, SIRT6 inhibition modestly decreased LPS-induced septic shock and mortality (Fig. 5, G and H) and systemic effect of SIRT6 during the acute inflammatory response.

Genetic deletion of SIRT6 in macrophages ameliorates systemic inflammation and hyperglycemia in obese mice

It is well established that chronic inflammation is a major driving force for the deleterious effects of obesity and has been directly linked to the progression of hyperglycemia, insulin resistance, nonalcoholic fatty liver disease, and atherosclerosis (22). In fact, TNF α has been unequivocally linked to these phenomena (17, 18, 23, 24). To test the possible role of SIRT6 on TNF α secretion after the onset of chronic inflammation during obesity, we developed a genetic mouse model for inducible SIRT6 deletion in macrophage colony-stimulating factor receptor 1 (Csf1r)-positive macrophages. For this purpose, we crossed Sirt6^{loxP/loxP} $\times$ Csf1r-Mer-iCre-Mer mice and put them on a C57BL/6J background (Sirt6^{loxP/loxP}, Cre+; see methods for detailed mouse generation and background homogenization). The effectiveness of tamoxifen-induced SIRT6 deletion in macrophages was first determined in BMDM *in vitro* (Fig. 6, A and B). Next, we treated Sirt6^{loxP/loxP}, Cre– and Sirt6^{loxP/loxP}, Cre+ with tamoxifen (50 mg/kg/day) for 1 week before analyzing circulating monocytes, neutrophils, basophils, eosinophils, and lymphocytes (Fig. 6C) as well as basal glucose levels and body weight (Fig. 6, D and E). We found no significant difference among genotypes treated with tamoxifen when the mice were on normal chow. Furthermore, we measured secreted TNF α in the peritoneal cavity and found no differences among genotypes (Fig. 6F). In summary, tamoxifen treatment led to a significant decrease in SIRT6 expression in macrophages, without affecting inflammation or glucose management when mice were fed on normal chow.

Next, we used the extensively analyzed DIO model of systemic inflammation and glucose intolerance in C57BL/6J mice as previously described (25, 26). Mice were fed with a Western-style diet for 10 weeks. During that period, mice consistently became obese (Fig. 7A) as well as developed hyperglycemia (Fig. 7B) and systemic inflammation (Fig. 7C). Based on our results and previous work, we hypothesized that constitutive and time-controlled SIRT6 deletion or inhibition can lead to different outcomes in terms of systemic inflammation. Taking this into consideration, we decided to induce SIRT6 deletion in macrophages for a short period, and after

mRNA levels in Raw 264.7 cells exposed to LPS (200 ng/ml) for 1 h. *L*, densitometry readings of TNF α relative to tubulin of WB showed in A and its replicates. *M*, released TNF α levels measured by ELISA in the supernatant of Raw 264.7 cells exposed to LPS (200 ng/ml) for 1 h. Data represent mean $\pm$ SD. **p* < 0.05, ****p* < 0.01, *****p* < 0.001, and *****p* < 0.0001. All experiments were repeated four times. LPS, lipopolysaccharide; SIRT6, sirtuin 6; TNF α , tumor necrosis factor alpha.

SIRT6 regulates TNF α secretion in macrophages in vivo

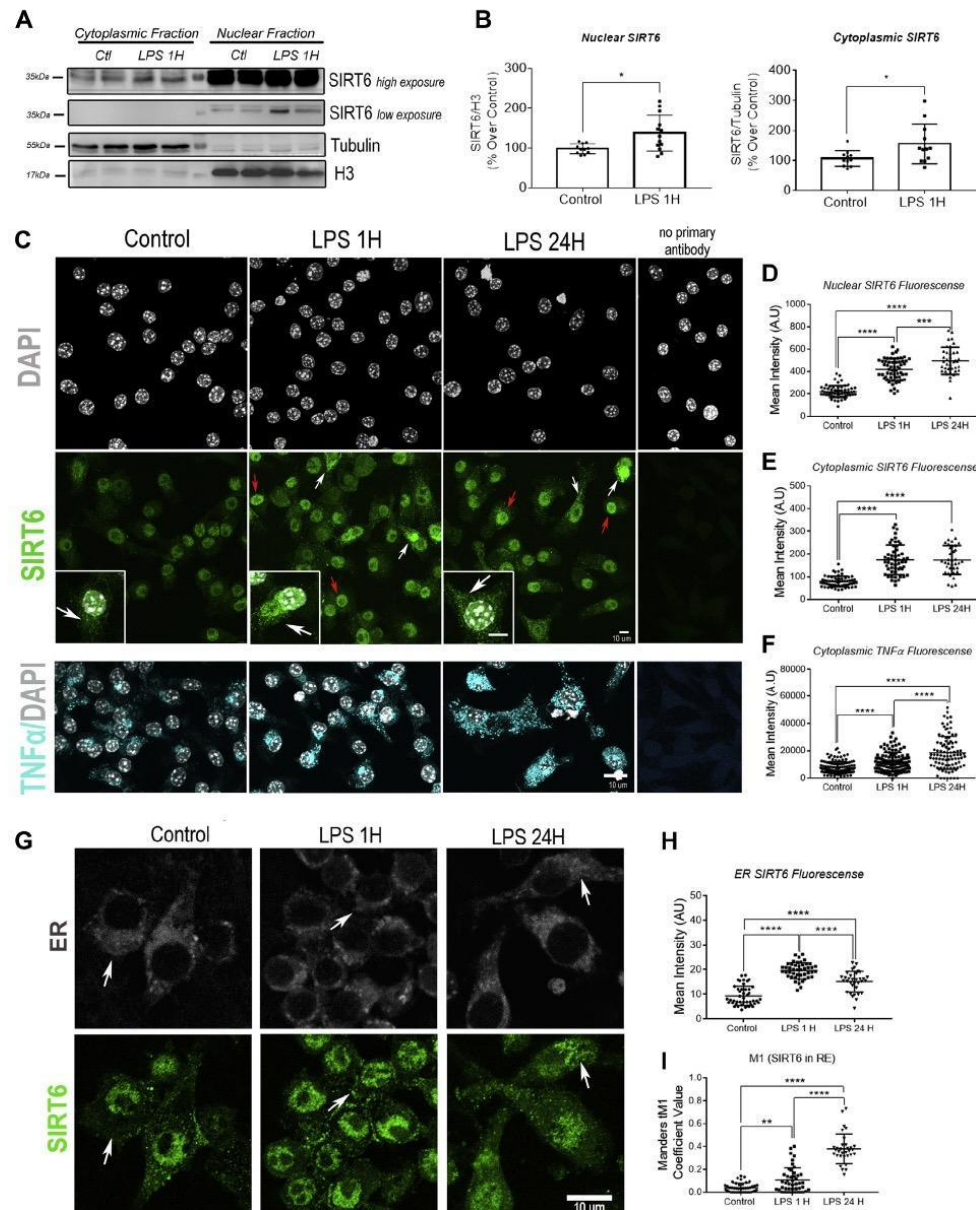


Figure 2. LPS promotes SIRT6 cytoplasmic and ER accumulation in macrophages. A, representative Western blot of SIRT6 in cytoplasmic and nuclear fractions from Raw 264.7 cells incubated with LPS (200 ng/ml) for 1 h. Tubulin and H3 were used as markers for cytoplasmic and nuclear fractions, respectively. B, densitometry analysis of SIRT6 expression in the conditions described in A. C, representative immunofluorescence (IF) confocal images of Raw 264.7 cells incubated with LPS (200 ng/ml) for 1 and 24 h. Cells were labeled with DAPI (gray), SIRT6 (green), and TNF α (cyan). Right panel shows IF control with no primary antibody. The insets represent the magnification of the framed nuclei. White arrows indicate cytoplasmic SIRT6 accumulations, and red arrows indicate nuclear SIRT6. The scale bar represents 10 μ m. D and E, mean fluorescence intensity quantification in nuclear (D) and cytoplasmic (E) SIRT6 signals in response to LPS treatments. F, mean fluorescence intensity quantification of TNF α in the cytoplasm. G, representative IF of Raw 264.7 cells exposed to LPS (200 ng/ml) for 1 and 24 h staining SIRT6 (green) and ER (white). White arrows indicate SIRT6 accumulations to the ER. The scale bar

SIRT6 regulates TNF α secretion in macrophages in vivo

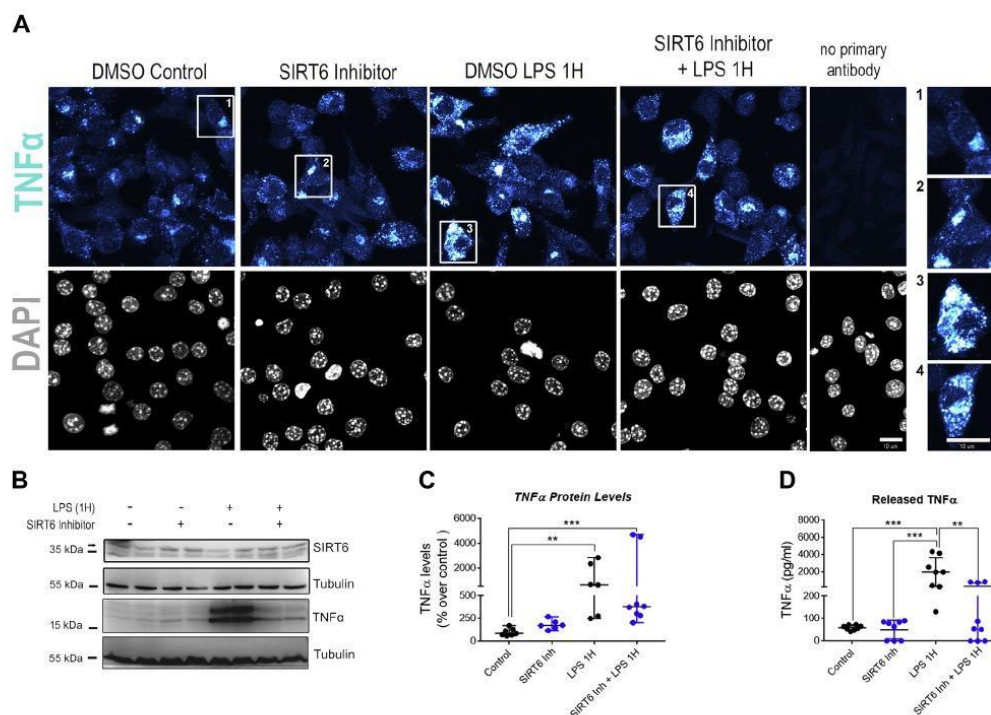


Figure 3. Acute SIRT6 inhibition *in vitro* impairs TNF α release in LPS-treated macrophages. *A*, representative IF confocal images of Raw 264.7 cells incubated with LPS (200 ng/ml) and SIRT6 inhibitor (compound 1, 200 μ M) for 1 h. Cells were stained for DAPI (gray) and TNF α (cyan). Numbered squares correspond to magnifications in the right panel. The scale bar represents 10 μ m. *B*, representative Western blot for TNF α in Raw 264.7 cells exposed to LPS (200 ng/ml) and SIRT6 inhibitor (compound 1, 200 μ M) for 1 h. *C*, densitometry measurements of intracellular TNF α expression in the experiments described in *B*. *D*, levels of released TNF α to the cell media measured by ELISA in the supernatant of Raw 264.7 cells incubated with LPS (200 ng/ml) and the SIRT6 inhibitor (compound 1, 200 μ M) for 1 h. Data represent median $\pm$ 95% confidence interval (*C*) and mean $\pm$ SD (*D*), * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, and **** p < 0.0001. All experiments were repeated four times. DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; IF, immunofluorescence; LPS, lipopolysaccharide; SIRT6, sirtuin 6; TNF α , tumor necrosis factor alpha.

that mice became obese. We put them on Western diet (WD) and followed weight gain for 10 weeks. Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁻ and Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁺ mice gained weight in a similar manner (Fig. 7, *D* and *E*). Between weeks 8 to 9 of WD, we treated them with tamoxifen. We found that SIRT6 deletion in macrophages partially protected mice against systemic inflammation (Fig. 7*F*). Consistent with this, we also found a significant protection against hyperglycemia (Fig. 7*G*), strongly suggesting that conditional SIRT6 deletion in macrophages once obesity is established prevents systemic inflammation and hyperglycemia. We measured TNF α levels in plasma, but even in the mice on WD, we could not detect measurable levels of the cytokine. As a proof of principle, we turned to measure TNF α levels in the peritoneal cavity of the obese Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁻ and Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁺ mice treated with tamoxifen. We found that Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁻ mice had significantly higher levels of secreted TNF α in the peritoneal cavity than Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁺

mice (Fig. 7*H*), confirming that SIRT6 deletion in macrophages ameliorates TNF α secretion *in vivo* during obesity. Finally, we measured liver and kidney function and found a mild, although significant, protection against liver and kidney damage (Fig. 7, *I* and *J* and Table S1).

Discussion

SIRT6s play a myriad of protective roles in metabolism, cell cycle regulation and cancer, aging, and inflammation. While SIRT6s, especially SIRT1 and SIRT6, seem to have anti-inflammatory functions by silencing NF κ B-dependent gene expression in the nucleus (1), recent evidence shows that, at least in macrophages, fibroblasts (7, 8), and dendritic cells (27), SIRT6 can have different, and even opposite, functions in regulating inflammation. How the cell manages SIRT6 activity and localization in order to orchestrate these *a priori* opposite actions is not completely understood. The

represents 10 μ m. *H*, SIRT6 mean fluorescence intensity quantification in ER regions. *I*, Manders M1 coefficient value in Raw 264.7 cells exposed to LPS (200 ng/ml) for 1 and 24 h. Data represent mean $\pm$ SD, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, and **** p < 0.0001. All experiments were repeated four times. DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; ER, endoplasmic reticulum; LPS, lipopolysaccharide; SIRT6, sirtuin 6; TNF α , tumor necrosis factor alpha.

SIRT6 regulates TNF α secretion in macrophages in vivo

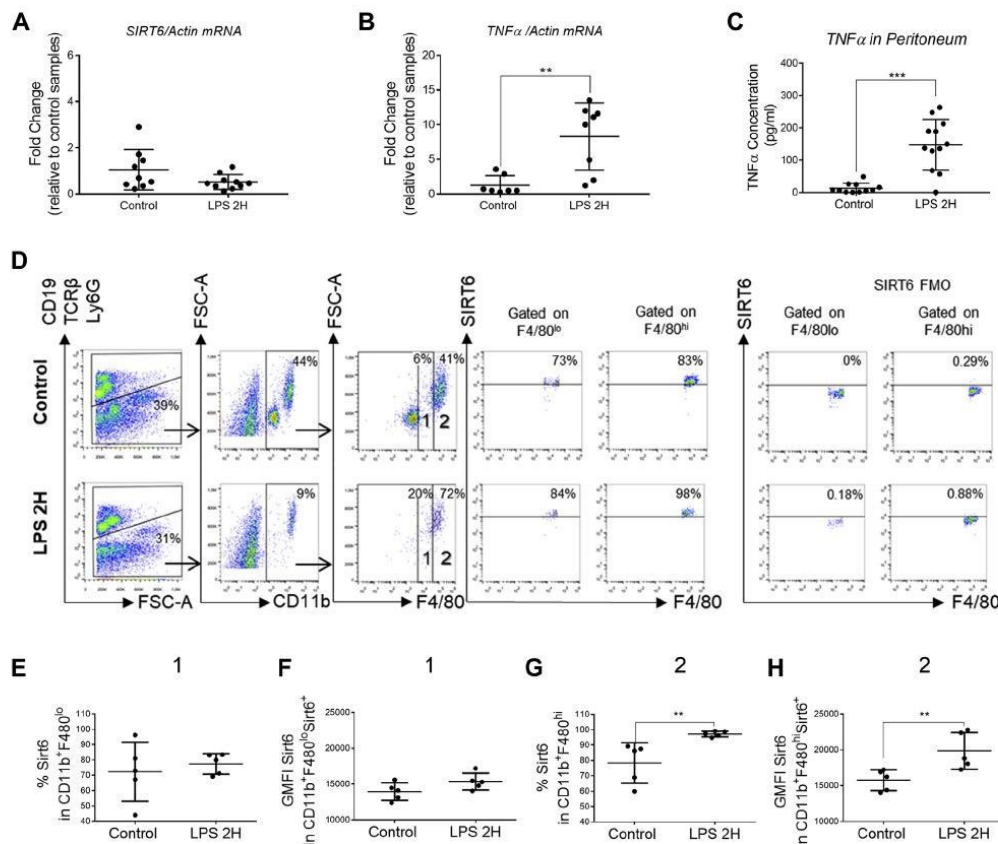


Figure 4. LPS administration to mice promotes rapid SIRT6 upregulation in resident peritoneal macrophages. **A** and **B**, SIRT6 and TNF α mRNA levels in peritoneal cavity cells obtained after LPS injection (10 mg/kg) for 2 h. **C**, released TNF α levels measured by ELISA in the peritoneal lavage of mice after LPS injection (10 mg/kg) for 2 h. **D–H**, flow cytometry analysis of SIRT6 protein levels in CD11b⁺F4/80^{lo} (recruited) and CD11b⁺F4/80^{hi} (resident) macrophages within peritoneal cavity cells obtained after LPS injection. **D**, representative dot plots showing the gating strategy used for the identification of CD11b⁺F4/80^{lo} and CD11b⁺F4/80^{hi} macrophages and SIRT6 analysis in these cells; SIRT6 FMOs were used for the determination of SIRT6-positive cells in each condition. **E–H**, quantitation of SIRT6 protein levels in CD11b⁺F4/80^{lo} and CD11b⁺F4/80^{hi} macrophages, shown as percentage of SIRT6-positive cells (**E** and **G**) and SIRT6 geometric mean fluorescence intensity (GMFI) in SIRT6-positive cells within these populations (**F** and **H**). Data represent mean $\pm$ SD, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, and **** p < 0.0001 (n = 5). FMO, Fluorescence Minus One; LPS, lipopolysaccharide; SIRT6, sirtuin 6; TNF α , tumor necrosis factor alpha.

fact that the proinflammatory and anti-inflammatory actions of SIRT6 occur in different subcellular compartments (cytoplasm and nucleus, respectively) suggests that protein compartmentalization may play a role in this phenomenon. Previous work has shown that during LPS treatment, SIRT6 appears to cosediment with the ER fraction upon subcellular fractionation (7). However, how SIRT6 ends up in the cytoplasm during this response is not established. Also, until now, evidence for the proinflammatory function of SIRT6 through positive regulation of TNF α secretion has been focused on cell culture experiments, with limited experimental *in vivo* support. In this work, we intended to shed light on these questions.

LPS promoted rapid SIRT6 upregulation that was not dependent on transcription but on protein stabilization instead. It has been shown that SIRT6 protein levels and activity is regulated by ubiquitination and proteasome-dependent degradation. In particular, it has been shown that the ubiquitin ligase carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) stabilizes SIRT6 and prevents proteasomal degradation by noncanonical ubiquitination (28). On the other hand, ubiquitin-specific peptidase 10 promotes SIRT6 stabilization by preventing ubiquitination and degradation (29). Interestingly, these previous reports show an important difference in the half-life of the protein, going from 1 to 2 h to 24 to 48 h, suggesting that the stability of SIRT6 may be

SIRT6 regulates TNF α secretion in macrophages in vivo

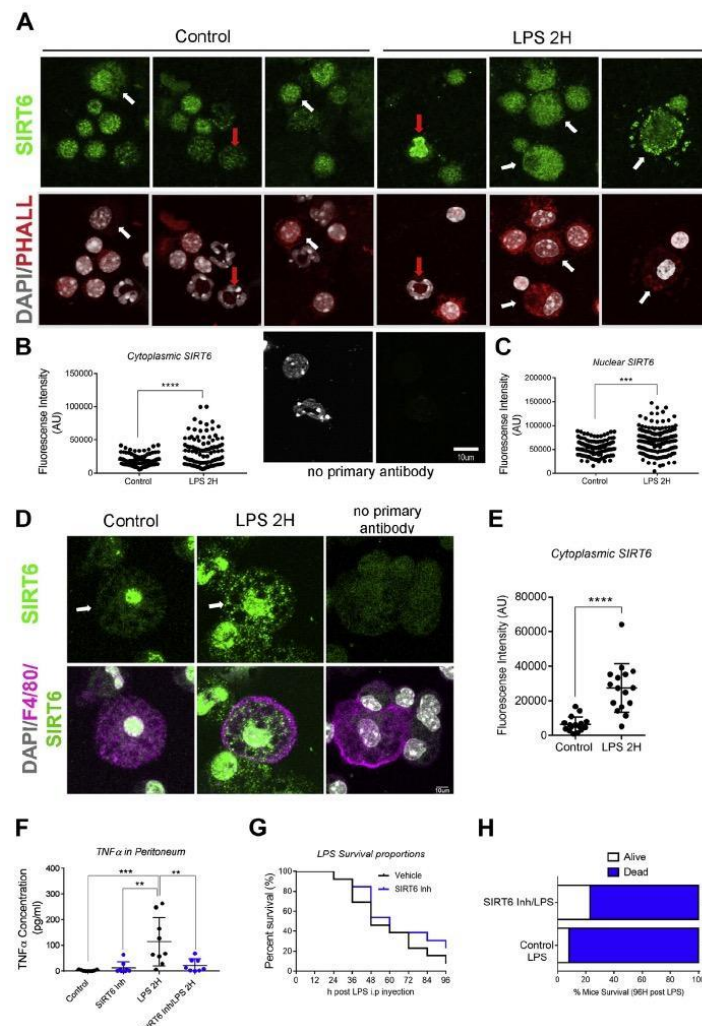


Figure 5. *In vivo* pharmacological SIRT6 inhibition decreases TNF α secretion after LPS stimulation and reduces LPS-dependent mortality. A, representative confocal immunofluorescence images of cells obtained from the peritoneal cavity after LPS injection, stained with DAPI (gray), phalloidin (red), and SIRT6 (green). White arrows indicate cytoplasmic SIRT6 accumulations, and red arrows indicate cells with high SIRT6 signals. The scale bar represents 10 μ m. B and C, SIRT6 mean fluorescence intensity quantification in nuclear (B) and corresponding cytoplasmic fractions (C) obtained from peritoneal cavity cells after LPS injection in mice. D and E, representative confocal immunofluorescence images of thioglycollate-elicited macrophages in response to LPS treatment (10 mg/kg, 2 h). F4/80 (magenta) was used as a marker for macrophages, and SIRT6 (green) was quantified in macrophage cytoplasm (E). White arrows indicate cytoplasmic SIRT6 accumulations. The scale bar represents 10 μ m. F, released TNF α levels measured by ELISA in the peritoneal cavity lavage of mice exposed to LPS with or combination of LPS and SIRT6 inhibitor (compound 1, 30 mg/kg) (n = 7). G, Kaplan–Meier survival curve after treating mice with LPS (20 mg/kg) or LPS + SIRT6 inhibitor (compound 1, 30 mg/kg). H, contingency graph showing survival after an LPS lethal injection (20 mg/kg) with or without the administration of SIRT6 inhibitor (compound 1, 30 mg/kg) (n = 14 per experimental group). Data represent mean $\pm$ SD, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, and **** p < 0.0001. DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; LPS, lipopolysaccharide; SIRT6, sirtuin 6; TNF α , tumor necrosis factor alpha.

differentially regulated in different cellular types and contexts. Our results *in vivo* are aligned with these reports, since we showed an increased SIRT6 level in CD11b⁺F4/80^{hi} (resident) peritoneal macrophages in response to LPS but not in

CD11b⁺F4/80^{lo} (recruited) peritoneal macrophages, suggesting that SIRT6 acute regulation may differ among macrophage subtypes. The ubiquitin ligase CHIP has been linked to LPS-dependent signaling and inflammatory response in

SIRT6 regulates TNF α secretion in macrophages in vivo

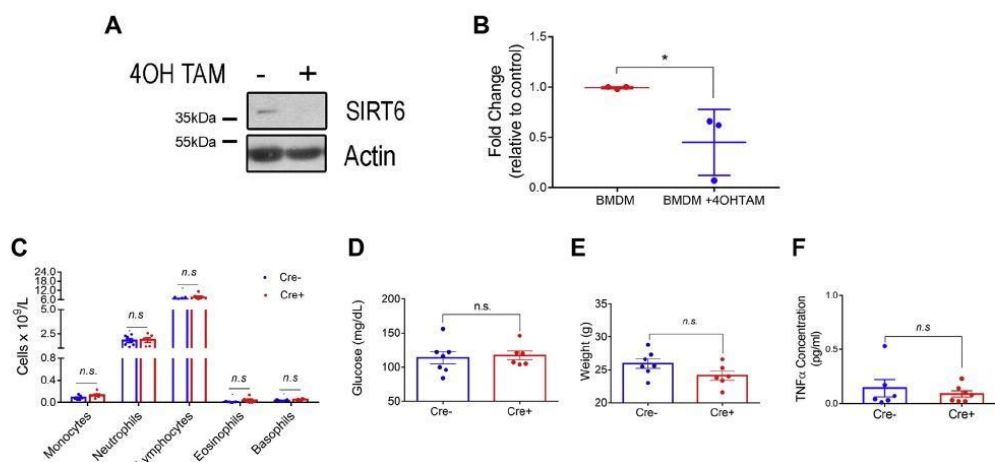


Figure 6. Tamoxifen-induced SIRT6 deletion in macrophages does not affect systemic inflammation and glucose management in lean mice. A, representative Western blot showing the effect of 4-OH-tamoxifen (2 μ M) on SIRT6 protein levels in BMDM isolated and cultured from Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁺ mice. B, Sirt6 mRNA levels in BMDM isolated and cultured from Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁺ mice and exposed to 4-OH-tamoxifen. C, peripheral blood cell count in Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁺ and Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁻ mice after tamoxifen treatment. D, basal glycemia of Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁺ and Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁻ mice after tamoxifen treatment. E, body weight of Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁺ and Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁻ mice after tamoxifen treatment. F, released TNF α levels measured by ELISA in the peritoneal lavage of Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁺ and Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁻ mice after tamoxifen treatment. Data represent mean $\pm$ SD, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, and **** p < 0.0001. BMDM, bone marrow-derived macrophage; SIRT6, sirtuin 6; TNF α , tumor necrosis factor alpha.

macrophages (30), and it also regulates SIRT6 stability in MEFs (28), suggesting that this ubiquitin ligase is a good candidate to mediate LPS-dependent SIRT6 stabilization. SIRT6 protein stabilization by LPS led to clear increase in cytoplasmic and specifically ER localization of the protein. However, we also found a rapid increase in nuclear SIRT6. Whether SIRT6 nuclear accumulation is a result of cytoplasmic SIRT6 stabilization and nuclear leakage, or because of specific nuclear stabilization, remains to be studied. Recent evidence shows that the ubiquitin proteasome machinery is present in the nucleus (31, 32), so a specific nuclear regulation of SIRT6 stability is plausible. It has been recently proposed that SIRT6 can be moved to the cytoplasm by p62 during cadmium-induced cellular toxicity (10). Although we cannot rule out a nuclear–cytoplasmic shuttling of SIRT6 and cytoplasmic accumulation during LPS stimulation, the kinetics of nuclear and cytoplasmic accumulation suggest otherwise. While cytoplasmic SIRT6 upregulation peaked at 1 h post-LPS incubation and remained constant until 24 h later, nuclear SIRT6 continued to accumulate even after 24 h. This supports the notion that upon LPS stimulation, SIRT6 is stabilized in the cytoplasm for the duration of the stimulus, leading to a continuous leak into the nucleus regulated by the nuclear localization signal in SIRT6. Accumulated cytoplasmic SIRT6 showed an enrichment in the ER area, consistent with our hypothesis that SIRT6 stabilization plays a role in TNF α demyristoylation as previously shown (7). In fact, SIRT6 inhibition decreased TNF α secretion without clearly affecting intracellular protein levels, although important variability was observed. This variability could be explained by fast degradation because of SIRT6 inhibition (8). It is important to mention

that not all cytoplasmic SIRT6s localized to the ER. Whether the remaining cytoplasmic SIRT6 plays a different role in the cytoplasm, or is just a bystander of the actual regulatory role of the protein in TNF α secretion, could not be sorted out. Nevertheless, clarification of this issue will deserve further investigation.

While it was very well established that SIRT6 plays a pivotal proinflammatory role during TNF α secretion, *in vivo* evidence of this regulation is scarce. Recently, it was shown that pharmacological SIRT6 inhibition in an EAE model delays the onset of the disease through a lower dendritic cell activation and migration, which correlated with decreased TNF α in plasma (21). However, most *in vivo* evidence has ascribed an anti-inflammatory role of SIRT6. Here, we are providing direct evidence that SIRT6 is rapidly upregulated in macrophages *in vivo* during LPS-induced inflammation. In fact, LPS promoted an upregulation of SIRT6 that also localized in the cytoplasm and nucleus. Consistent with this, SIRT6 inhibition decreased LPS-induced TNF α secretion *in vivo*, suggesting that cytoplasmic SIRT6 upregulation in macrophages *in vivo* is also required for this response. Interestingly, LPS-induced SIRT6 upregulation was restricted to CD11b⁺F4/80^{hi} resident macrophages, suggesting that in different subsets of macrophages, SIRT6 regulation may differ. In addition, we cannot rule out the possibility that SIRT6 inhibition impairs macrophage migration to the peritoneum, as has been described for BxPC-3 cells and dendritic cells (9, 21).

Our findings extend the role of SIRT6 in the regulation of TNF α -mediated inflammation to chronic inflammation and glucose management during obesity. This is not the first time that SIRT6 inhibition is linked to a better outcome in glucose

SIRT6 regulates TNF α secretion in macrophages in vivo

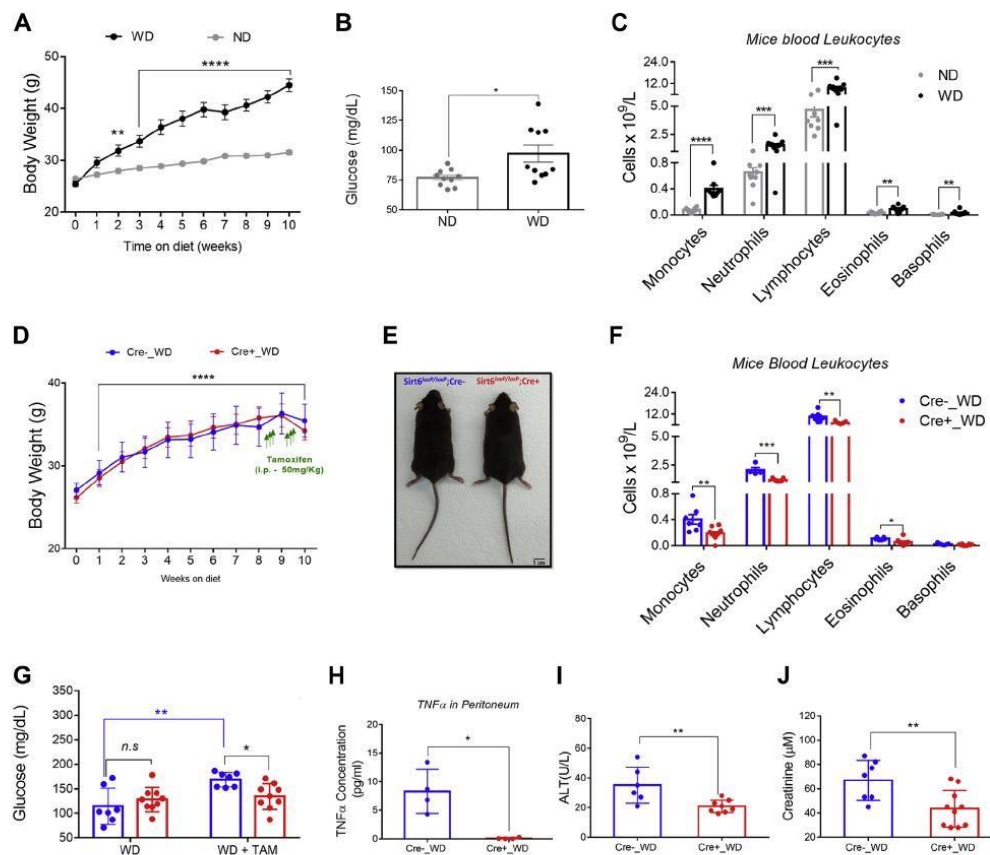


Figure 7. Tamoxifen-induced SIRT6 deletion in macrophages after the onset of obesity ameliorates systemic inflammation and hyperglycemia. A, body weight gain in mice fed with normal chow diet (ND, gray line) and Western diet (WD, black line) (n = 10). B, basal glycemia in lean (ND) and obese (WD) mice 10 weeks after the onset of the treatment. C, peripheral blood cell count in mice in ND and WD 10 weeks after the onset of the treatment. D, body weight gain of Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁻ and Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁺ mice fed with WD (n = 7). Green arrows indicate sequential and daily tamoxifen (50 mg/kg, subcutaneously [SC]) injections. E, representative picture of Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁻ and Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁺ mice at the end of the treatment (10 weeks of WD + tamoxifen). F, hemogram of peripheral blood cells of Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁻ and Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁺ mice in WD and after the treatment with tamoxifen (50 mg/kg, SC). G, fasting glucose levels in mice in WD before and after tamoxifen (50 mg/kg, SC) treatment. H, released TNF α levels measured by ELISA in the peritoneal lavage of Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁻ and Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁺ under WD + 2 weeks of tamoxifen (50 mg/kg, SC) sequential injections. I and J, alanine aminotransferase (ALT) and creatinine levels from mice. Blue lines show Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁻ and red lines show Sirt6^{loxP/loxP};Cre⁺ mice in WD. SIRT6, siRNA 6; TNF α , tumor necrosis factor alpha.

management. Recent work has shown that pharmacological SIRT6 inhibition ameliorates glucose intolerance and tissue damage during obesity, although this effect was ascribed to nuclear control of the expression of glycolytic genes. Whether TNF α -related inflammation was contributing to this phenotype was not studied (19). In the same line, as mentioned previously, pharmacological SIRT6 inhibition in an experimental model of EAE ameliorated progression of the disease, including diminished TNF α levels *in vivo* (21). However, other evidence points in the opposite direction. Constitutive SIRT6 deletion in myeloid cells promotes inflammation and tissue damage during obesity by promoting macrophage polarization

toward an M1 phenotype (20), clearly showing that constitutive SIRT6 deletion in myeloid cells has deleterious effects during obesity and inflammation. Nevertheless, it is not clear to what extent this phenotype is influenced by constitutive SIRT6 deletion in the whole myeloid population, and in particular, what is the participation of nonmacrophage myeloid cell types. In our mice model, we generated a new macrophage-specific Sirt6 KO mice, that can be temporally activated by tamoxifen. Macrophage Sirt6 deletion was corroborated in BMDM under tamoxifen addition in culture. No differences were found in control and transgenic animals in normal diet as well as in WD before tamoxifen injections,

SIRT6 regulates TNF α secretion in macrophages *in vivo*

suggesting nonspecific Cre effects in parameters measured. Nonetheless, Cre nonspecific effects have been described for stimulator of interferon gene antiviral pathway activation and the induction of type 1 interferon (33), so future work should also consider this possibility. We found that SIRT6 down-regulation in macrophages after the onset of obesity, decreased systemic inflammation and TNF α secretion, as well as improved glucose management. This not only extends our findings on a proinflammatory role of SIRT6 to chronic inflammation during obesity but also opens a plausible therapeutic window for treating inflammation and hyperglycemia during this disease. However, the latter has to be considered cautiously, and longer experiments need to be conducted in order to determine the duration of this protective effect. Since the majority of SIRT6, even during acute inflammation, is located in the nucleus, it is highly possible that during chronic SIRT6 deletion, with time the transcriptional control over proinflammatory genes regulated by SIRT6 becomes the dominant effect. Indeed, when we measured TNF α expression in SIRT6 KO MEFs, we found a dramatic decrease in TNF α expression in response to LPS, supporting this idea (Fig. S2). Finding the right time frame and dosage of SIRT6 inhibition may be key in order to correctly achieve anti-inflammatory and protective effects of SIRT6 inhibition, without affecting its major regulatory functions in the nucleus.

Conclusions and perspectives

This work brings novel insight into how SIRT6 is actively regulated during acute inflammation, highlighting its role in the secretion of TNF α during inflammations. In addition, we show for the first time that SIRT6 controls TNF α secretion *in vivo* during LPS-dependent acute inflammation. We further extended these findings to chronic inflammation during obesity, suggesting that SIRT6-dependent TNF α secretion in macrophages play a key role in chronic systemic inflammation as well. However, we believe that further investigation needs to be conducted in order to clearly determine how macrophages, and maybe other immune cells, orchestrate a finely tuned SIRT6-dependent response to control inflammation.

Experimental procedures

General reagents and antibodies

All general reagents and chemicals were purchased from Sigma–Aldrich, unless otherwise specified. Supplements and media for cell culture were from Invitrogen. Antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (anti-Sirt6, catalog no.: 12486; anti-p27, catalog no.: 3688; anti-histone H3, catalog no.: 4620; and antiubiquitin, catalog no.: 3936), Abcam (anti-TNF α , catalog no.: ab183218 and anti-SIRT6, catalog no.: ab191385), or Sigma–Aldrich (anti- β actin, catalog no.: A5441 and anti- α tubulin, catalog no.: T6074). Antibodies for flow cytometry were purchased from Thermo Fisher Scientific (LIVE/DEAD Fixable Far Red Dead Cell Stain Kit; catalog no.: L10120), BioLegend (CD19-APCCy7, catalog no.: 115530; T-cell receptor beta (TCR β)-APCCy7, catalog no.:

109220; Ly6G-APCCy7, catalog no.: 127624; CD11b-BV510, catalog no.: 101245; and ZOMBIE-AQUA, catalog no.: 423102), or Millipore (F4/80-PE, catalog no.: MABF1530).

Cell growth and maintenance

MEFs were obtained from E13.5–E14.5 embryos following standard procedures. Raw 264.7 macrophages were obtained from American Type Culture Collection (ATCC-TIB-71). Cell growth and maintenance was performed in standard conditions in a humidified CO₂ incubator. High-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine, 10 mM Hepes, 10,000 U/ml penicillin, and 10,000 μ g/ml streptomycin (complete DMEM) were used for both cell lines. Experiments in MEFs were performed between passages 2 and 5, whereas experiments in Raw 264.7 were performed between passages 15 and 22.

In vitro assays and specific reagents

LPS from *Escherichia coli* serotype 0111:B4 (catalog no.: L3129; Sigma) was used at 200 ng/ml; MG132 (catalog no.: ab141003; abcam) was used at 10 μ M; CHX (catalog no.: C6255; Sigma) was used at 1 μ g/ml, and the SIRT6 inhibitor compound 1 was supplied by Chemspace (catalog no.: CSC000732205) and used at 200 μ M in culture media. All the experiments were done in complete DMEM with 0.1% FBS. MG132, CHX, and the SIRT6 inhibitor were dissolved in DMSO. Control experiments for each treatment were done with DMSO alone. Final volumes in cell culture were always below 0.1%.

Subcellular fractionation

Raw 264.7 cells were treated with LPS during 1 h. After, cells were washed with 5 ml of warm PBS (37 $^{\circ}$ C), harvested in 1 ml of PBS, and centrifuged (3 min, 500g). Pelleted cells were mechanically lysed in a hypotonic buffer (10 mM Hepes, 1 mM EDTA, and 0.1 mM EGTA containing 3% Triton X-100) containing a protease inhibitor cocktail (catalog no.: S8830; Sigma) with 10 strokes using a glass–pestle homogenizer, followed by 10 s of vigorous shaking. Proper cell lysis with simultaneous nuclear preservation was monitored by observation under microscope. The cell lysates were centrifuged at 13,000g for 10 min, yielding a supernatant (cytosolic fraction) and a pellet containing mostly nuclei and cytoplasmic debris. The nuclei-enriched pellet was further resuspended in radio-immunoprecipitation assay (25 mM Tris [pH 8.0], 150 mM NaCl, 1% NP-40, and 0.1% SDS) and subsequently sonicated in ice with five cycles of short bursts of 10 s, followed by intervals of 5 s to keep the suspension cool and avoid foaming. The supernatant obtained after a 10 min centrifugation (10,000g) represented our nuclear fraction.

Fluorescent labeling of SIRT6, TNF α , and ER in macrophages

Raw 264.7 cells were incubated with LPS for 1 and 24 h (200 ng/ml) in order to induce activation. ER tracker (catalog

SIRT6 regulates TNF α secretion in macrophages in vivo

no.: E34250; Invitrogen) was used at 1 μ M final concentration in the cell medium and was incubated 30 min before fixation. Peritoneal cells were centrifuged in cytospin after peritoneal lavage. In all cases, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature (RT), permeabilized, and blocked (1% bovine serum albumin, 0.1% saponin, 150 mM glycine, and 5% FBS in PBS) for 1 h at RT. Primary antibodies against SIRT6 and TNF α were prepared in antibody dilution buffer (1% bovine serum albumin, 0.1% saponin, and 150 mM glycine in PBS) and incubated overnight at 4 °C. Alexa-conjugated secondary antibodies were incubated for 1 h. Nuclei were stained using 4',6-diamidino-2-phenylindole (catalog no.: D9542; Sigma) and actin filaments with phalloidin (catalog no.: A22283; Invitrogen). Samples were mounted in Prolong Gold Antifade Reagent (catalog no.: P10144; Invitrogen), and images were acquired using a Zeiss LSM 880 spectral confocal laser scanning microscope, using a 60 $\times$ oil-immersion objective (numerical aperture of 1.45). Images were processed using ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health).

Animal handling and experiments

All mice used in this study (male C57BL/6) were bred and maintained at the Institut Pasteur Montevideo Animal facility (UBAL). The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Institut Pasteur Montevideo (CEUA; protocol numbers 70153-000839-17, 003-19, and 006-19). All the studies described were performed according to the methods approved in the protocol and following all international guidelines and legal regulations. Mice received standard chow water *ad libitum* or WD (catalog no.: 5TJN-1810842; TestDiet) and water containing glucose and fructose (18.9 and 23.1 g/l, respectively).

LPS challenge and survival mice studies

Adult mice (4–5 months) were injected intraperitoneally with compound 1 (SIRT6 inhibitor, 30 mg/kg) or vehicle (DMSO). After 2 h, mice were injected with 10 mg/kg of LPS (for TNF α release) or 20 mg/kg LPS (for survival experiments) in PBS. Survival was checked every 12 h for 4 days. For each animal, a severity score was calculated according to clinical parameters, such as weight, physical appearance, and motor activity. Those animals above a score of 5 were euthanized. Survivors at the end of the experiment were euthanized by cervical dislocation.

Thioglycollate-elicited macrophages in peritoneal cavity and LPS treatment

Mice were injected intraperitoneally with 800 μ l of 4% (w/v) of brewer thioglycollate medium (Sigma). At 72 h, mice were injected with 10 mg/kg of LPS in PBS. After 2 h, the peritoneal lavage was performed, injecting 3 ml of RPMI medium + 0.2% FBS into the peritoneal cavity and recovering this volume to obtain the cells to be analyzed by immunofluorescence.

BMDM generation and LPS treatment

BMDMs were isolated from 20-week-old male mice. To obtain bone marrow cells, the femur and tibia were flushed with complete DMEM supplemented with 10% FBS. Cells were plated into 100 mm Petri dish with complete DMEM supplemented with 20 ng/ml recombinant mouse macrophage colony-stimulating factor protein (catalog no.: ab129146; Abcam). Four days after seeding, cells were subcultured in the same medium and grown on glass coverslips for 3 days until differentiated into BMDM. On day 8, BMDMs were treated for 3 h with LPS (200 ng/ml) and later fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min for immunofluorescence analysis. To confirm Sirt6 deletion, BMDM from Sirt6^{loxP/loxP}; Cre+ were obtained, and 4-OH-Tamoxifen (2 μ M) was added to cell medium 6 days after seeding. Twenty-four hours later, the cells were processed for Western blot and quantitative PCR.

Macrophage-specific Sirt6 KO mice generation and treatments

Mice carrying a SIRT6 conditional allele (017334; Jackson Laboratories) were crossed with a transgenic mice expressing the tamoxifen-inducible MerCreMer fusion protein under control of the macrophage-specific mouse *Csf1r* (Tg[Csf1r-Mer-iCre-Mer]1jwp; catalog no.: 019098; Jackson Laboratories) in order to conditionally delete Sirt6 in macrophages. Transgenic mice used were previously backcrossed into C57BL/6 J for more than 10 generations in order to reach a homogeneous background. For activation of MerCreMer, 50 mg/kg of tamoxifen (catalog no.: T5648; Sigma) in corn oil (catalog no.: C8267; Sigma) were administered to 5-month-old mice once a day for seven consecutive days. Tamoxifen-treated Sirt6^{loxP/loxP}; Cre+ mice were used as controls. For DIO studies, adult mice (3 months) were monitored for body weight and basal glycemia before and after WD administration for 10 weeks. In weeks 8 and 9, tamoxifen injections (50 mg/kg) were done for three consecutive days. At week 10 of WD, mice were euthanized with an excess of ketamine/xylazine solution followed by cervical dislocation. Sample and blood collection were taken for posterior analyses.

Glycemia determination

Basal glycemia was controlled in 12 h-fasted mice on standard diet or WD. Plasma glucose concentrations were measured in blood from the tail using a hand-held glucometer (Accu-Chek; Roche).

Hemogram and biochemical parameters

Blood analyses were done with 30 μ l of blood in Hemocytometer Mindray BC-5000Vet. Kidney and Liver parameters were measured with 100 μ l of blood in MNCHIP (PointCare V2).

Western blotting

Cells were pelleted (5 min, 500g) and lysed using radio-immunoprecipitation assay buffer (in a volume ratio of 1:10) supplemented with 5 mM NaF, 5 mM nicotinamide, 50 mM

SIRT6 regulates TNF α secretion in macrophages in vivo

β -glycerophosphate, 1 μ M trichostatin A (catalog no.: 647925; Sigma), a protease inhibitor cocktail, and then sonicated by means of five cycles of 10 s each followed by intervals of 5 s. Homogenates were incubated during 20 to 30 min at 4 °C under constant agitation and then centrifuged at 10,000g during 10 min. Protein concentrations in the supernatants were determined using the Bradford protein assay reagent. Samples were resuspended in Laemmli 5 $\times$, separated in SDS-PAGE gels, and transferred to polyvinylidene fluoride membranes. After blocking (with Tris-buffered saline containing 0.2% Tween-20 and 5% nonfat milk), the membranes were incubated overnight with the appropriate antibodies. Secondary antibodies were incubated 1 h and detected using Super-Signal West Pico Chemiluminescent Kit (catalog no.: 34080; Pierce). Results were processed by densitometry analysis with ImageJ (Rasband W.S.; National Institutes of Health).

RNA isolation and quantitative PCR

Cells were homogenized in TRIzol reagent for RNA extraction according to the manufacturer's protocol (catalog no.: 15596026; Invitrogen). DNase I treatment was used to eliminate genomic DNA contamination (catalog no.: 04716728001; Roche). Reverse transcription (1 μ g) was done using SuperScript II RT (catalog no.: 18064-014; Invitrogen), and quantitative RT-PCR was performed using Fast SYBR Green Mix (catalog no.: 04913850001; Roche) in Quant-Studio3 thermocycler (Applied Biosystems). Gene expression analysis was calculated using the $\Delta\Delta$ Ct method with β -actin as the housekeeping gene. Expression was calculated as fold increase over control condition. Primers were synthesized by Integrated DNA Technology and are listed in Table S2.

TNF α detection in Raw 264.7 supernatant, serum, and peritoneal lavage of mice

Raw 264.7 cells were plated 24 h before incubation with compound 1 (SIRT6 inhibitor, 200 μ M) in DMEM and 0.1% FBS. After 1 h of compound 1 incubation, cells were exposed to LPS (200 ng/ml) for an additional hour. The presence of TNF α in the culture medium was determined by ELISA (catalog no.: 555268; BD OptEIA). TNF α levels were also measured in mice serum and peritoneal lavage after LPS challenge and tamoxifen injections.

Flow cytometry analysis of SIRT6 expression in macrophages in the peritoneal cavity

Flow cytometry analysis was performed to evaluate SIRT6 expression in peritoneal cells. The peritoneal washes were carried out by injecting 3 ml of RPMI medium + 0.2% FBS and recovering this volume to obtain the cells to be analyzed. Cell surface staining was performed for 30 min at 4 °C using the antibodies against murine CD19 (1:400 dilution), CD11b (1:300 dilution), and F4/80 (1:200 dilution); in cases where the peritoneal cavity was treated with inflammatory stimuli, anti-TCR β (1:400 dilution) and anti-Ly6G (1:400 dilution) antibodies were also added. For SIRT6 intracellular labeling, cells were fixed and permeabilized overnight at 4 °C. Cells were

stained with anti-SIRT6 antibody (1:200 dilution) for 30 min and then with a goat anti-rabbit secondary antibody (1:200 dilution) for 1 h. Fluorescence Minus One controls were added, corresponding to anti-SIRT6 or the secondary antibody. The acquisition of the samples was performed using Attune NxT cytometer (Thermo Fisher Scientific), and the analysis was performed with FlowJo, version X.0.7 software. Dead cells were excluded using Zombie or live/dead fixable dead cell markers. Macrophage populations within the peritoneal cells were defined as CD19⁺CD11b⁺F4/80^{lo} (recruited macrophages) and CD19⁺CD11b⁺F4/80^{hi} (resident macrophages); under inflammatory conditions, the same populations were identified as CD19⁺TCR β ⁺Ly6G⁺CD11b⁺F4/80^{lo} (recruited macrophages) and CD19⁺TCR β ⁺Ly6G⁺CD11b⁺F4/80^{hi} (resident macrophages). When B cells were analyzed, they were defined as CD19⁺ cells. SIRT6 expression in all mentioned populations was expressed as the percentage of SIRT6-positive cells and SIRT6 geometric mean fluorescence intensity in SIRT6-positive cells, as a measure of SIRT6 expression levels within this population. The expression thresholds for each group and experiment were determined with the help of the Fluorescence Minus One controls.

Statistical analysis

All data are presented as mean $\pm$ SD. D'Agostino–Pearson analyses were performed to confirm normal distributions. ROUT method was used to identify outliers. Unpaired *t* test was used to compare two independent groups. In multiple comparisons, ANOVA followed by Tukey's post hoc test was used. Under non-normal distribution, data were expressed as median $\pm$ 95% confidence interval. Mann–Whitney *U* test was used to compare two independent samples (groups). Kruskal–Wallis test was used for multiple comparisons in cases where sample distributions were not normal, followed by Dunn's post hoc test. For comparisons of proportions, Fisher's exact test was used. In all cases, *p* < 0.05 was considered to be significant. Calculations were done using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc.).

Data availability

All the data presented are contained within the article. Any additional information, reagents, or mice models will be shared upon request to the lead contact, Carlos Escande, PhD (escande@pasteur.edu.uy).

Supporting information—This article contains supporting information.

Acknowledgments—The Attune NxT Cytometer was purchased and upgraded by an institutional grant by ANII (grant no.: PEC_3_2019_1_158811). We thank all the people at the Animal Facility Unit (UBAL), the Cell Biology Unit, and the Advanced Bioimaging Unit at the Institut Pasteur Montevideo for their support and assistance in the present work. We also thank Dr Mercedes Segovia (LIRI, Institut Pasteur Montevideo) and Alvaro Díaz (Facultad de Química, Universidad de la República) for helpful advice.

SIRT6 regulates TNF α secretion in macrophages in vivo

and discussions for the flow cytometry analysis and Dr Raul Mostoslavsky (Harvard University) for generously providing the SIRT6 KO MEFs.

Author contributions—M. B. and C. E. conceptualization; M. B., C. E., and L. C. methodology; M. B. and C. E. validation; L. S., V. P.-T., and S. R. formal analysis; M. B., L. C., K. C., R. D., J. R.-D., C. V., P. C., V. P.-T., M. G., F. E., and A. C. investigation; M. B., A. C., and C. E. writing—original draft.

Funding and additional information—This work was supported by grants by ANII (grant nos.: FCE_1_2014_1_104002 and INNOVA II; to C. E.) and FOCEM—Fondo para la Convergencia Estructural del Mercosur (grant no.:COF 03/11). M. B. was supported by scholarships from ANII (grant no.: POS_NAC_2015_1_109950) and CAP (UdelaR).

Conflict of interest—The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Abbreviations—The abbreviations used are: BMDM, bone marrow-derived macrophage; CHIP, carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein; CHX, cycloheximide; Csflr, colony-stimulating factor receptor 1; DIO, diet-induced obesity; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DMSO, dimethyl sulfoxide; EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; ER, endoplasmic reticulum; FBS, fetal bovine serum; LPS, lipopolysaccharide; MEF, mouse embryonic fibroblast; RT, room temperature; SIRT, sirtuin; TCR β , T-cell receptor beta; TNF α , tumor necrosis factor alpha; WD, Western diet.

References

- Kitada, M., Ogura, Y., Monno, I., and Koya, D. (2019) Sirtuins and type 2 diabetes: Role in inflammation, oxidative stress, and mitochondrial function. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 10, 187
- Choi, J.-E., and Mostoslavsky, R. (2014) Sirtuins, metabolism, and DNA repair. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 0, 24–32
- Santos, L., Escande, C., and Denicola, A. (2016) Potential modulation of sirtuins by oxidative stress. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2016, 9831825
- Tanno, M., Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K., and Horio, Y. (2007) Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J. Biol. Chem.* 282, 6823–6832
- North, B. J., and Verdin, E. (2007) Interphase nucleocytoplasmic shuttling and localization of SIRT2 during mitosis. *PLoS One* 2, e784
- Iwahara, T., Bonasio, R., Narendra, V., and Reinberg, D. (2012) SIRT3 functions in the nucleus in the control of stress-related gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 32, 5022–5034
- Jiang, H., Khan, S., Wang, Y., Charron, G., He, B., Sebastian, C., Du, J., Kim, R., Ge, E., Mostoslavsky, R., Hang, H. C., Hao, Q., and Lin, H. (2013) SIRT6 regulates TNF- α secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. *Nature* 496, 110–113
- Jiang, H., Zhang, X., and Lin, H. (2016) Lysine fatty acylation promotes lysosomal targeting of TNF- α . *Sci. Rep.* 6, 24371
- Bauer, I., Grozio, A., Lasigle, D., Basile, G., Sturla, L., Magnone, M., Sociali, G., Soncini, D., Caffa, I., Poggi, A., Zoppoli, G., Cea, M., Feldmann, G., Mostoslavsky, R., Ballestrero, A., et al. (2012) The NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT6 promotes cytokine production and migration in pancreatic cancer cells by regulating Ca²⁺ responses. *J. Biol. Chem.* 287, 40924–40937
- So, K. Y., Park, B. H., and Oh, S. H. (2021) Cytoplasmic sirtuin 6 translocation mediated by p62 polyubiquitination plays a critical role in cadmium-induced kidney toxicity. *Cell Biol. Toxicol.* 37, 193–207
- Chang, A. R., Ferrer, C. M., and Mostoslavsky, R. (2020) SIRT6, a mammalian deacetylase with multitasking abilities. *Physiol. Rev.* 100, 145–169
- Michishita, E., McCord, R. A., Berber, E., Kioi, M., Padilla-Nash, H., Damian, M., Cheung, P., Kusumoto, R., Kawahara, T. L. A., Barrett, J. C., Chang, H. Y., Bohr, V. A., Ried, T., Gozani, O., and Chua, K. F. (2008) SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature* 452, 492–496
- Gil, R., Barth, S., Kanfi, Y., and Cohen, H. Y. (2013) SIRT6 exhibits nucleosome-dependent deacetylase activity. *Nucleic Acids Res.* 41, 8537–8545
- Feldman, J. L., Baeza, J., and Denu, J. M. (2013) Activation of the protein deacetylase SIRT6 by long-chain fatty acids and widespread deacylation by mammalian sirtuins. *J. Biol. Chem.* 288, 31350–31356
- Carreño, M., Bresque, M., Machado, M. R., Santos, L., Durán, R., Vitturi, D. A., Escande, C., and Denicola, A. (2020) Nitro-fatty acids as activators of hSIRT6 deacetylase activity. *J. Biol. Chem.* 295, 18355–18366
- Kawahara, T. L. A., Michishita, E., Adler, A. S., Damian, M., Berber, E., Lin, M., McCord, R. A., Ongaigui, K. C. L., Boxer, L. D., Chang, H. Y., and Chua, K. F. (2009) SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF- κ B-dependent gene expression and organismal life span. *Cell* 136, 62–74
- Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W., and Hotamisligil, G. S. (1997) Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 389, 610–614
- De Taeye, B. M., Novitskaya, T., McGuinness, O. P., Gleaves, L., Medda, M., Covington, J. W., and Vaughan, D. E. (2007) Macrophage TNF- α contributes to insulin resistance and hepatic steatosis in diet-induced obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, E713–E725
- Sociali, G., Magnone, M., Ravera, S., Damonte, P., Vigliarolo, T., Von Holtey, M., Vellone, V. G., Millo, E., Caffa, I., Cea, M., Parenti, M. D., Del Rio, A., Murone, M., Mostoslavsky, R., Grozio, A., et al. (2017) Pharmacological Sirt6 inhibition improves glucose tolerance in a type 2 diabetes mouse model. *FASEB J.* 31, 3138–3149
- Lee, Y., Ka, S.-O., Cha, H.-N., Chae, Y.-N., Kim, M.-K., Park, S.-Y., Bae, E. J., and Park, B.-H. (2017) Myeloid sirtuin 6 deficiency causes insulin resistance in high-fat diet-fed mice by eliciting macrophage polarization toward an M1 phenotype. *Diabetes* 66, 2659–2668
- Ferrara, G., Benzi, A., Sturla, L., Marubbi, D., Frumento, D., Spinelli, S., Abbotto, E., Ivaldi, F., von Holtey, M., Murone, M., Nencioni, A., Uccelli, A., and Bruzzone, S. (2020) Sirt6 inhibition delays the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis by reducing dendritic cell migration. *J. Neuroinflammation* 17, 228
- Saltiel, A. R., and Olefsky, J. M. (2017) Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J. Clin. Invest.* 127, 1–4
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., and Ferrante, A. W. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112, 1796–1808
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., and Spiegelman, B. M. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87–91
- Daputo, R., Rodriguez-Duarte, J., Galliussi, G., Kamaid, A., Bresque, M., Bathiany, C., Lopez, G. V., and Escande, C. (2021) A novel nitroalkene vitamin E analogue inhibits the NLRP3 inflammasome and protects against inflammation and glucose intolerance triggered by obesity. *Redox Biol.* 39, 101833
- Escande, C., Chini, C. C., Nin, V., Dykhouse, K. M., Novak, C. M., Levine, J., van Deursen, J., Gores, G. J., Chen, J., Lou, Z., and Chini, E. N. (2010) Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity and contributes to high-fat diet-induced liver steatosis in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 545–558
- Lasigle, D., Boero, S., Bauer, I., Morando, S., Damonte, P., Cea, M., Monacelli, F., Odetti, P., Ballestrero, A., Uccelli, A., Mostoslavsky, R., Poggi, A., and Nencioni, A. (2016) Sirt6 regulates dendritic cell differentiation, maturation, and function. *Aging (Albany NY)* 8, 34–49
- Ronnebaum, S. M., Wu, Y., McDonough, H., and Patterson, C. (2013) The ubiquitin ligase CHIP prevents Sirt6 degradation through non-canonical ubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* 33, 4461–4472
- Lin, Z., Yang, H., Tan, C., Li, J., Liu, Z., Quan, Q., Kong, S., Ye, J., Gao, B., and Fang, D. (2013) USP10 antagonizes c-Myc transcriptional activation

SIRT6 regulates TNF α secretion in macrophages in vivo

- through SIRT6 stabilization to suppress tumor formation. *Cell Rep.* **5**, 1639–1649
30. Yang, M., Wang, C., Zhu, X., Tang, S., Shi, L., Cao, X., and Chen, T. (2011) E3 ubiquitin ligase CHIP facilitates Toll-like receptor signaling by recruiting and polyubiquitinating Src and atypical PKC(zeta). *J. Exp. Med.* **208**, 2099–2112
 31. Kito, Y., Matsumoto, M., Hatano, A., Takami, T., Oshikawa, K., Matsumoto, A., and Nakayama, K. I. (2020) Cell cycle-dependent localization of the proteasome to chromatin. *Sci. Rep.* **10**, 5801
 32. Enam, C., Geffen, Y., Ravid, T., and Gardner, R. G. (2018) Protein quality control degradation in the nucleus. *Annu. Rev. Biochem.* **87**, 725–749
 33. Pepin, G., Ferrand, J., Honing, K., Jayasekara, W. S., Cain, J. E., Behlke, M. A., Gough, D. J., BR, G. W., Hornung, V., and Gantier, M. P. (2016) Cre-dependent DNA recombination activates a STING-dependent innate immune response. *Nucleic Acids Res.* **44**, 5356–5364

CAPÍTULO II: Resultados OE4

En la parte introductoria de este trabajo ya hemos mencionado las capacidades enzimáticas, así como la estructura y los múltiples roles donde se desempeña la Sirtuina 6. En esta sección realizaremos un breve repaso de aquellas particularidades que presenta esta SIRT6 y que han llevado a que en conjunto con el grupo de la **Dra. Ana Denicola** del Dpto. de Fisicoquímica Biológica de Facultad de Ciencias, Udelar, se decidiera aunar esfuerzos para estudiar la potencial modulación de hSIRT6 por ácidos grasos nitrados y caracterizar sus cambios estructurales y funcionales en respuesta a estos. Es muy importante destacar que gran parte de este trabajo fue realizado por la **Mag. Mara Carreño** en el contexto de su Tesis de Maestría. Nuestro aporte estuvo dado principalmente en la concepción de la idea, discusión y puesta a punto de diseños experimentales y en la realización de los experimentos celulares que se muestran en el manuscrito que adjuntamos a continuación. En este, compartimos primera autoría con Mara Carreño y el rol de “Corresponding Author” también fue compartido por la Dra. Ana Denicola (Tutora de la Tesis de Maestría de Mara) y el **Dr. Carlos Escande** (Co-Tutor de Tesis de Maestría de Mara y tutor de esta tesis de Doctorado).

Los ácidos grasos nitrados (NO₂-FAs del inglés, Nitrated fatty acids) son moléculas generadas por la interacción de especies reactivas de nitrógeno con ácidos grasos insaturados, que se han hallado tanto en el plasma, orina, membranas celulares y tejidos humanos¹⁵⁸. Los NO₂-FA se producen endógenamente mediante reacciones inflamatorias y metabólicas, siendo potentes mediadores de respuestas anti-inflamatorias y anti-oxidantes¹⁵⁹.

Las características estructurales de SIRT6, que la hacen única, consisten en: por un lado, poseer una estructura más abierta y distante entre sus 2 dominios globulares, lo cual ocurre debido a una delección en su secuencia que genera la falta de un módulo helicoidal que es sustituido por un pequeño loop¹¹², y por otro lado, las 4 cisteínas del motivo de unión a Zn²⁺ son C₁₄₁, C₁₄₄, C₁₆₆ y C₁₇₇, presentan una estructura diferente a la de la mayoría de las Sirtuinas, generando un loop más flexible¹¹². Estas diferencias estructurales serían la causa de la baja actividad desacetilasa de la enzima *in vitro*, sin embargo, cuando un sustrato con grupo acilo de cadena larga se posiciona en el sitio activo, esto conduce a un cambio conformacional, que acerca ambos dominios y permite que se incremente su actividad enzimática^{113,118}. Tomando en cuenta la presencia de la histidina 133 en el sitio activo de las sirtuinas, así como los residuos de cisteína, previamente detallados, en el OE4 de esta tesis exploramos el potencial de los NO₂-FAs para alterar la estructura y funcionalidad de SIRT6. El diseño experimental, los materiales y métodos y los resultados de este objetivo específico se presentan en el artículo publicado que se presenta a continuación.



Nitro-fatty acids as activators of hSIRT6 deacetylase activity

Received for publication, June 17, 2020, and in revised form, October 16, 2020. Published, Papers in Press, October 29, 2020. DOI 10.1074/jbc.RA120.014883

Mara Carreño^{1,†}, Mariana Bresque^{2,†}, Matías R. Machado³, Leonardo Santos², Rosario Durán⁴, Darío A. Vitturi⁵, Carlos Escande^{2,*}, and Ana Denicola^{1,*}

From the ¹Laboratorio de Físicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, and Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, the ²Laboratorio de Patologías del Metabolismo y el Envejecimiento and ³Laboratorio de Simulaciones Biomoleculares, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, the ⁴Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur de Montevideo, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay, and the ⁵Department of Pharmacology and Chemical Biology, Heart, Lung, Blood and Vascular Medicine Institute, and Center for Critical Care Nephrology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania, USA

Edited by Ruma Banerjee

Sirtuin 6, SIRT6, is critical for both glucose and lipid homeostasis and is involved in maintaining genomic stability under conditions of oxidative DNA damage such as those observed in age-related diseases. There is an intense search for modulators of SIRT6 activity, however, not many specific activators have been reported. Long acyl-chain fatty acids have been shown to increase the weak *in vitro* deacetylase activity of SIRT6 but this effect is modest at best. Herein we report that electrophilic nitro-fatty acids (nitro-oleic acid and nitro-conjugated linoleic acid) potently activate SIRT6. Binding of the nitro-fatty acid to the hydrophobic crevice of the SIRT6 active site exerted a moderate activation (2-fold at 20 μ M), similar to that previously reported for non-nitrated fatty acids. However, covalent Michael adduct formation with Cys-18, a residue present at the N terminus of SIRT6 but absent from other isoforms, induced a conformational change that resulted in a much stronger activation (40-fold at 20 μ M). Molecular modeling of the resulting Michael adduct suggested stabilization of the co-substrate and acyl-binding loops as a possible additional mechanism of SIRT6 activation by the nitro-fatty acid. Importantly, treatment of cells with nitro-oleic acid promoted H3K9 deacetylation, whereas oleic acid had no effect. Altogether, our results show that nitrated fatty acids can be considered a valuable tool for specific SIRT6 activation, and that SIRT6 should be considered as a molecular target for *in vivo* actions of these anti-inflammatory nitro-lipids.

Sirtuins are a family of NAD⁺-dependent lysine deacetylases critical for maintaining cellular and organ homeostasis (1–4). This family includes seven sirtuins (SIRT1–7) with different subcellular location, enzymatic activities, substrate proteins, and biological functions, as well as different key roles in metabolism, nutrition, aging, inflammation, and cancer (5–8). SIRT6 is primarily located in the nucleus along with SIRT1 and SIRT7, whereas SIRT2 is cytosolic, and SIRT3, SIRT4, and SIRT5 are found in the mitochondria (9).

SIRT6 is implicated in the regulation of diverse physiological processes such as maintenance of genomic stability, inflamma-

tion, and energy metabolism (10–12). Overexpression of SIRT6 increased lifespan in male mice, preserved glucose tolerance, and attenuated adipose tissue inflammation (13–15). More recently, overexpression of SIRT6 showed neuroprotection in an animal model of spinal cord injury (16). Conversely, mice globally deficient in SIRT6 are hypoglycemic, suffer lymphopenia, premature aging, and die within 1 month (17). Tissue-specific SIRT6 ablation in adipocytes, macrophages, or pancreatic beta-cells, sensitizes mice toward high-fat diet-induced obesity and insulin resistance (18–20). Specific neural SIRT6-deleted mice did not die from hypoglycemia, but displayed postnatal growth retardation and ultimately became obese (21). In these latter mice, hyperacetylation of histone H3 lysine 9 (H3K9) and lysine 56 (H3K56) were observed in various regions of the brain. In fact, H3K9 and H3K56 are the main molecular targets for SIRT6 activity *in vivo* (22–24) with recent reports also including H3K18 (25).

In addition to deacetylating histone H3, SIRT6 can also bind and regulate nonhistone proteins such as the transcription factor HIF-1 α (26), catalyze intramolecular mono-ADP-ribosylation (27), and mediate deacylation of long-chain fatty acyl groups (e.g. myristoylated tumor necrosis factor- α (28)). As recently reviewed by Klein and Denu (29) the physiological substrates, biological activities, and specific cellular functions of SIRT6 still need further investigation.

All sirtuins share a highly conserved globular catalytic core of 275 amino acids but the N and C termini are highly disordered and differ significantly among family members (30–32). The active site comprises three structural pockets A, B, and C, with the latter having the most hydrophobic character and the largest number of highly conserved residues. Two domains flank the active site, a large Rossmann-fold where co-substrate NAD⁺ binds, and a smaller Zn²⁺-binding motif (Fig. 1) (33). In particular, SIRT6 displays a more open structure in which the two domains are more distant than in other isoforms (34). Accommodation of a long-chain acyl group in the C-pocket favors the domains to close up, thus resulting in better deacetylase than deacetylase activity (28, 35). The N- and C-terminal regions in SIRT6 are short, less structured and flexible. The C terminus is required for nuclear localization, whereas the N terminus, rich in positive residues, is important for both

[†]These authors contributed equally to this work.

*For correspondence: Ana Denicola, denicola@fcien.edu.uy; Carlos Escande, escande@pasteur.edu.uy.

This is an Open Access article under the CC BY license.



© 2020 Carreño et al. Published under exclusive license by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

Nitro-fatty acids as SIRT6 activators

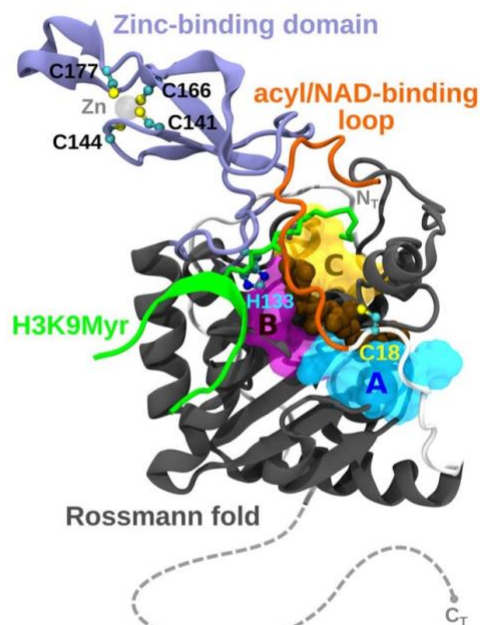


Figure 1. Human SIRT6 structure. Molecular representation of hSIRT6 in complex with a myristoylated H3 peptide at Lys-9 (H3K9Myr) and a co-substrate (PDB code 3ZG6). Structural features such as functional domains, A, B, C pockets and relevant residues are indicated. The location of N and C termini (N_T and C_T , respectively) is also shown. Continuation of the peptide chain structure toward C_T is sketched as a guide for helping visualization.

chromatin association and for intrinsic catalytic activity because its deletion severely compromised H3K9 and H3K56 deacetylation (27, 36, 37). The mechanism of catalysis includes the binding of cofactor NAD^+ and the acylpeptide in the right orientation so that the amide of the acylated lysine can attack the anomeric carbon of the ribose via an SN_2 -type mechanism, releasing nicotinamide and forming an alkylamidate intermediate (35, 38, 39). A conserved histidine residue in the active site functions as a general base to catalyze the release of the acylated-ADPR and lysine peptide products (40, 41). Thus, in sirtuins, catalysis depends on this histidine residue (His-133 in the human SIRT6 isoform, hSIRT6) and not on Zn^{2+} as in other histone deacetylases (HDAC class I, II, and IV). In this regard, the zinc atom has a purely structural role and it is coordinated by four cysteine residues in a CXXC motif. In the case of hSIRT6 these are Cys-141, Cys-144, and Cys-166, Cys-177, where the insertion of 10 residues (167 to 176) forming a flexible loop, is unique for SIRT6 (Fig. 1).

Given its importance in the maintenance of energy metabolism and DNA stability, the discovery of novel pharmacological agents that boost SIRT6 activity can have great potential for treatment of diabetes, arthritis, cardiovascular, and neurodegenerative diseases (42). As a result, there is an intense search for modulators of SIRT6 activity, however, not many specific activators have been reported. Interestingly, Feldman *et al.* (43)

demonstrated that the low *in vitro* deacetylase activity of SIRT6 could be activated in the presence of free long-chain fatty acids, particularly oleic and linoleic acid (5-fold increase at 100 μM), and that this activation was not displayed by SIRT1. Similarly, polyphenols were shown to either inhibit (catechins) or weakly activate (anthocyanidins, 2-fold increase at 100 μM) SIRT6 activity but these responses are similarly weak (44, 45). In addition, two synthetic small molecule activators have been identified, a pyrrole[1,2-*a*]quinoxaline derivative (UBCS039) that achieved a 2-fold increase in activity at 100 μM (46) and MDL-800, a more effective pharmacological activator (22-fold at 100 μM) (47), both binding at a distal region of the fatty acyl substrate. Finally, a targeted screen of fatty acids and lipid-like molecules identified other activators with >15-fold activation at 100 μM such as oleoyl-lysophosphatidic acid (48-fold) and 2-(3-chloro-4-(2,4-dichlorobenzamido)phenyl)-1,3-dioxoisindoline-5-carboxylic acid (CL-4, 18-fold) (48).

Nitro-fatty acids (NO_2 -FA) are detected in diverse species, including humans (49–51) and have been extensively shown to exert cellular protective actions and to protect against metabolic disorders and inflammation (52). NO_2 -FA are both derived from the diet and can also be formed endogenously by the olefinic nitration of unsaturated fatty acids thus reaching nanomolar concentrations in the plasma of healthy subjects (50, 53). In addition, dietary supplementation with nitrite and CLA (conjugated linoleic acid, also known as ruminic acid) have been shown to increase the levels of NO_2 -CLA in plasma, urine, and tissues (49, 50). Importantly, the nitration of unsaturated fatty acids results in the formation of an electrophilic nitroalkene moiety that can react via Michael addition with nucleophilic residues, thus resulting in post-translational modification (PTM) of transcription factors and enzymes (52, 54–56). These post-translational modifications alter protein structure and function, resulting in signaling actions that include Nrf2-regulated gene induction, inhibition of NF- κ B-dependent proinflammatory cascades, and modulation of enzyme activities such as xanthine oxidoreductase inhibition and pro-matrix metalloproteinases-7 and -9 activation (57–61). Considering the presence of a nucleophilic histidine in the active site of sirtuins, as well as of several cysteine residues with known structural roles (zinc-binding motif), we explored the potential of NO_2 -FA to exert structural and functional changes in these proteins. Herein we report that the nitrated fatty acids nitro-oleic and nitro-conjugated linoleic acid (Fig. 2A) potently activate SIRT6 deacetylase activity via covalent modification of the isoform-specific Cys-18 in the N-terminal domain.

Results

Nitro-fatty acids stimulate the deacetylase activity of hSIRT6 *in vitro*

The *in vitro* deacetylase activity of hSIRT6 is low under basal conditions ($k_{cat} = 0.003 s^{-1}$, $K_m = 400 \mu M$) and the activation by oleic acid (OA) was confirmed as previously reported (Fig. 2B). Notably, incubation with a racemic mixture of nitro-oleic acid (NO_2 -OA) resulted in potent activation of the deacetylase activity, with a fold of activation significantly higher than that achieved by the corresponding non-nitrated fatty acid (Fig. 2C).

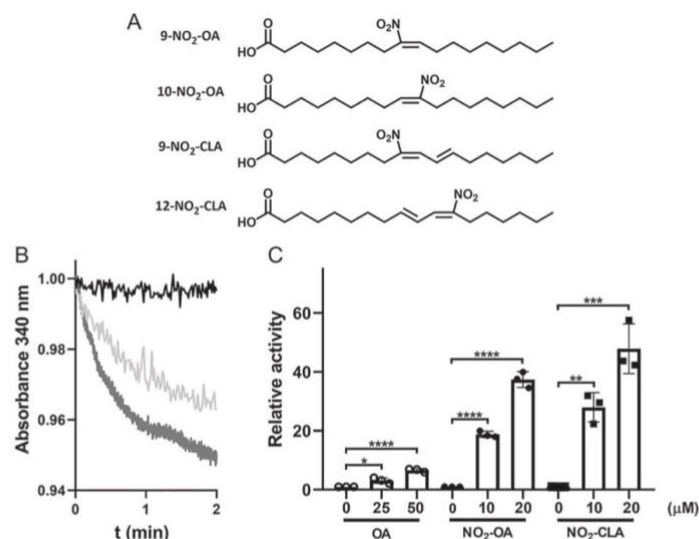


Figure 2. Effect of fatty acids and nitro-fatty acids on *in vitro* deacetylase activity of hSIRT6. *A*, chemical structures of 9- and 10-nitro-oleic acids (NO₂-OA), 9- and 12-nitro-conjugated linoleic acids (NO₂-CLA). Experiments were performed using the racemic mixtures 9- and 10-NO₂-OA, and 9- and 12-NO₂-CLA in the presence of 1 μ M SIRT6. *B*, representative runs of deacetylase activity measured using the coupled assay for untreated hSIRT6 (black), hSIRT6 incubated with oleic acid (50 μ M, light gray), and hSIRT6 incubated with nitro-oleic acid (20 μ M, dark gray). *C*, fold-change in SIRT6 deacetylase activity after incubation with the indicated concentrations of OA ($\square$), NO₂-OA ($\bullet$), and NO₂-CLA ($\blacksquare$). Error bars represent S.D. of at least three replicates. *, $p < 0.1$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$ ANOVA test.

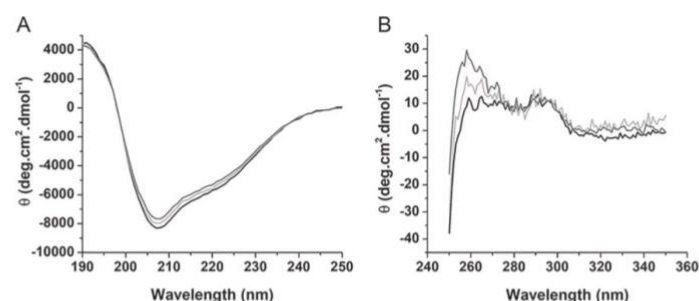


Figure 3. CD of hSIRT6. Far-UV (*A*) and near-UV (*B*) CD spectra of hSIRT6 (3 and 10 μ M, respectively) after 30 min incubation at 37 °C in the absence (black) or presence of either 5-fold excess of OA (light gray) or NO₂-OA (dark gray). Spectra were normalized for comparison as detailed under "Experimental procedures."

In this regard, preincubation of SIRT6 with a 20-fold excess of OA increased deacetylase activity (H3K9Ac) by 2-fold, whereas the same treatment with NO₂-OA resulted in 40-fold activation. Similar results were obtained with nitro-conjugated linoleic acid (NO₂-CLA), the most abundant endogenous NO₂-FA in humans (Fig. 2C). No activation was observed for the SIRT6 deacetylase (H3K9Myr) activity ($k_{\text{cat}} = 0.008 \text{ s}^{-1}$, $K_m = 20 \text{ } \mu\text{M}$). Similarly, no effect was observed by either OA (43) or up to 100 μ M NO₂-OA on the deacetylase and demyristoylase activities of SIRT1 (data not shown).

Incubation with either OA or NO₂-OA did not significantly alter the secondary structure of hSIRT6, but a conformational change was evidenced by near-UV CD. More specifically, a

change in the asymmetric environment of the aromatic residues and disulfides was observed, in particular, an ellipticity increase around 260 nm (Fig. 3).

Reaction of nitro-fatty acids with hSIRT6 cysteine residues

Electrophilic NO₂-FA, such as NO₂-OA and NO₂-CLA, can react with nucleophilic protein residues via reversible Michael addition (54, 56). Because hSIRT6 has a catalytic histidine residue, His-133, the incubation with NO₂-FA could result in inactivation. Taking advantage of the change in absorption of NO₂-CLA with environment polarity ($\lambda_{\text{max}} = 330 \text{ nm}$ in water versus $\lambda_{\text{max}} = 312 \text{ nm}$ in methanol), the binding of this nitro-

Nitro-fatty acids as SIRT6 activators

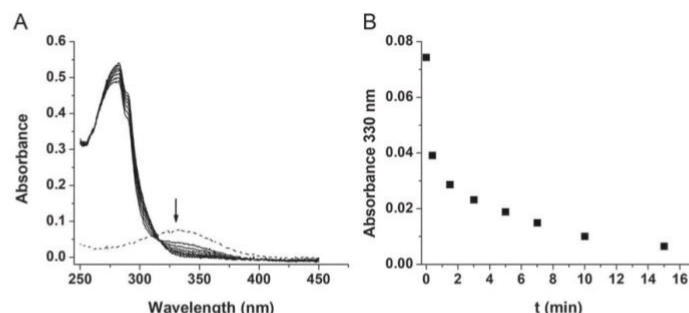


Figure 4. Consumption of NO₂-CLA by hSIRT6. A, UV-visible spectra of hSIRT6 (solid black line) with a characteristic peak at 280 nm, NO₂-CLA alone (dashed line) with a characteristic peak at 330 nm, and of a mixture of 15 μM hSIRT6 with 10 μM NO₂-CLA. B, change in absorbance at 330 nm with time after mixing hSIRT6 with NO₂-CLA (1.5:1).

lipid to hSIRT6 was investigated. As shown in Fig. 4, the blue shift expected in the UV-visible spectrum for NO₂-CLA binding to a hydrophobic site in the enzyme was not observed. Instead, a time-dependent decrease in absorbance at 330 nm was detected, suggesting a reaction between NO₂-CLA and a nucleophilic protein residue. To explore which nucleophilic residues were involved in this reaction, hSIRT6 was treated with NEM or DEPC to block cysteines or histidines, respectively, followed by incubation with biotinylated-NO₂-OA (Bt-NO₂-OA). Streptavidin-HRP adduct blotting strongly suggested the occurrence of a covalent interaction between NO₂-OA and cysteine residues in hSIRT6 (Fig. 5A). ESI ionization MS/MS analysis further confirmed this observation and identified Cys-141 (one of the cysteines coordinating Zn²⁺) and Cys-18 at the N-terminal domain, as the reactive targets (Fig. 5, B and C). Interestingly, despite the confirmation of adduct formation between NO₂-OA and Cys-141, as well as the conformational change evidenced by CD spectra (Fig. 3), no loss of zinc was detected from hSIRT6 upon incubation with either NO₂-FA (data not shown).

N-terminal Cys-18 is responsible for hSIRT6 nitro-fatty acid activation

Because MS analysis revealed Michael adduct formation with cysteine residues and in particular the N-terminal Cys-18, the effect of NO₂-FA was assayed on hSIRT6 mutant C18S. Interestingly, the level of activation achieved on the mutant was similar to the effect of the corresponding non-nitrated fatty acid (2-fold). This result suggested that both nitrated and non-nitrated fatty acids bind to the same pocket in the mutant. However, the significant 40-fold activation observed with the WT protein was lost in the absence of adduct formation with Cys-18 (Fig. 6). Molecular docking of NO₂-OA or NO₂-CLA into the active site of hSIRT6 in the absence of a H3K9Ac peptide showed that the electrophilic nitroalkene moiety is distant from the catalytic histidine (Fig. 7, A and B), thus providing an explanation for the non-inhibitory activity of NO₂-FA on hSIRT6 activity. Furthermore, docking poses of NO₂-OA or NO₂-CLA into the active site in the presence of H3K9Ac peptide were similar to those observed with OA and CLA, consistent with ~2-fold activation observed with of the C18S mutant

(Fig. 7, C and D). The solvent-exposed conformation of CLA's chromophore group in the resulting poses may agree with observations made in its absorption spectrum (Fig. 4). In all cases, Cys-18 was always found far from the nitroalkene group, thus preventing a possible adduct formation with the docked NO₂-FA in the active site of the WT protein. Molecular modeling of a Cys-18 adduct with 9-NO₂-OA showed that neither the carboxylic nor the acyl ends of the NO₂-FA were able to reach the C-pocket of hSIRT6 (~20 Å away), on the contrary, they should remain close to the acyl/co-substrate-binding loop (Fig. 8).

Binding of hSIRT6 to nitro-fatty acid at the cellular level

To determine whether the reported interaction between NO₂-OA and hSIRT6 could take place in a cellular context, HEK293T cells overexpressing FLAG-hSIRT6 were treated with 10 μM Bt-NO₂-OA for 1 h. At the end of the incubation period, Bt-NO₂-OA-modified proteins were pulled down from whole-cell lysates using streptavidin-conjugated beads and subjected to Western blotting analysis. As shown in Fig. 9A, pull-down of Bt-NO₂-OA resulted in prominent FLAG-SIRT6 detection, confirming the occurrence of this modification under cellular conditions.

Nitro-fatty acids induced cellular histone deacetylation

The modulation of the cellular deacetylase activity of hSIRT6 was monitored by assessing changes in H3K9 acetylation levels following 1 h treatment of HEK293T cells overexpressing FLAG-hSIRT6 with OA or NO₂-OA (10 μM). In accordance with the potent activation of hSIRT6 deacetylase activity observed *in vitro*, Western blotting analysis showed a marked decrease in H3K9Ac levels in HEK293T cells incubated with NO₂-OA (Fig. 9, B and C). No decrease in H3K9Ac levels was observed upon OA incubation, with H3K9Ac/H3 ratios being identical to control levels. Taken together, these results show that NO₂-OA effectively interacts with hSIRT6 in the cellular environment resulting in the activation of its deacetylase activity and the corresponding decrease in H3K9 acetylation levels.

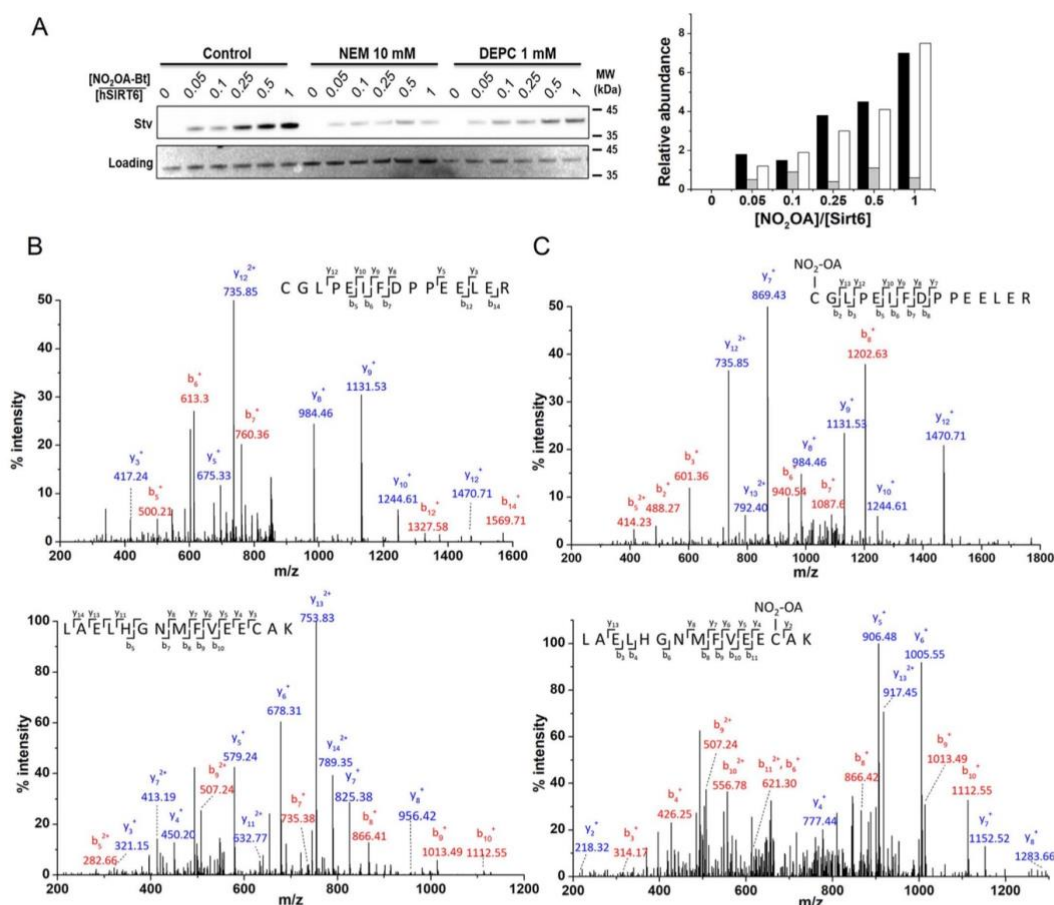


Figure 5. Identification of hSIRT6 residues modified by NO₂-OA. A, untreated hSIRT6 (control), and hSIRT6 treated with either NEM or DEPC to block cysteine and histidine residues, respectively, was incubated with the indicated excess of biotinylated-NO₂-OA and adduct formation detected using streptavidin-HRP (upper panel). Ponceau S staining was used as a loading control (lower panel) for densitometric analysis: control (black), NEM-treated hSIRT6 (gray), and DEPC-treated hSIRT6 (white). One of two consistent experiments is shown. B, MS spectra of untreated-hSIRT6 peptides obtained from tryptic digestion (2 h at 37 °C). The upper panel corresponds to the fragmentation of the doubly charged peptide sequence containing Cys-18 (CGLPEIFDPPEELR; monoisotopic *m/z*: 872.73) and the lower panel corresponds to the triply charged sequence containing Cys-141 (LAELHGFMFVEECAK; monoisotopic *m/z*: 564.34). C, MS/MS spectra of NO₂-OA-treated hSIRT6 (×5) ions with $\Delta m = 327.24$. Upper panel corresponds to the doubly charged peptide sequence containing Cys-18 (CGLPEIFDPPEELR; monoisotopic *m/z*: 1036.21) and the lower panel corresponds to the triply charged sequence containing Cys-141 (LAELHGFMFVEECAK; monoisotopic *m/z*: 673.56). The spectra are representative of three independent experiments. y- and b-ions detected by MS/MS analysis for each tryptic peptide.

Discussion

The hydrophobic pocket in the active site of hSIRT6 accommodates a long acyl-chain resulting in better deacetylase than deacetylase activity *in vitro*. Previous studies observed that free fatty acids bound to this hydrophobic crevice cause a conformational change that brings closer the two domains of the enzyme, which in turn favors the binding of the substrates. Thus, the poor *in vitro* deacetylase activity of SIRT6 increases in the presence of free fatty acids such as OA. Considering the enzyme depends on a histidine residue (His-133) for catalysis, we speculated that electrophilic NO₂-FA would accommodate in the active site, react with the nucleophilic histidine, and in-

hibit SIRT6 activity. Surprisingly, incubation with low micromolar concentrations of NO₂-OA or NO₂-CLA not only resulted in activation of the deacetylase activity but also to a significantly higher degree than that obtained with the corresponding non-nitrated fatty acids (Fig. 2). Molecular docking analyses support the experimental results showing that once accommodated in the active site, the distance and orientation of the reactive nitroalkene moiety do not allow for reaction with the catalytic histidine (Fig. 7). Nevertheless, UV-visible determinations showed that NO₂-CLA was consumed upon incubation with hSIRT6 suggesting that a reaction with nucleophilic residues of the enzyme was taking place (Fig. 4). MS

Nitro-fatty acids as SIRT6 activators

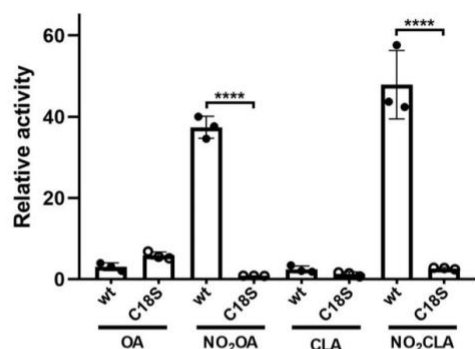


Figure 6. Effect of fatty acids and nitro-fatty acids on *in vitro* deacetylase activity of WT and C18S hSIRT6. Fold-change in SIRT6 deacetylase activity after incubation of 1 μ M WT hSIRT6 (●) or C18S mutant (○) with 20 μ M OA, NO₂-OA, CLA, or NO₂-CLA. Error bars represent S.D. of three replicates. ****, $p < 0.0001$ ANOVA test.

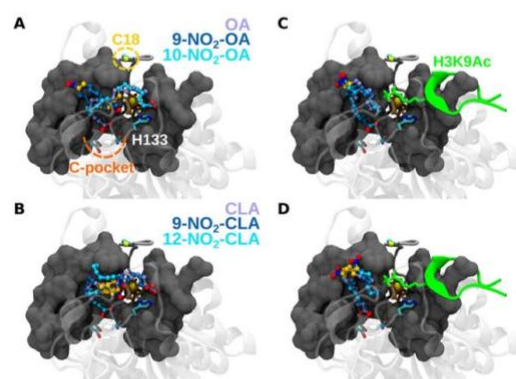


Figure 7. *In silico* docking experiments. A, best poses after docking OA and NO₂-OA into the active site of hSIRT6. The carbon backbone is colored according to the docked molecule. Oxygen and nitrogen atoms are red and blue, respectively, whereas unsaturations are shown in gold. The co-substrate is represented with brown sticks. Relevant residues in the protein are pointed out. The molecular surface of the active site is shown in gray, whereas the remaining structural context of the protein is shown as a transparent cartoon. B, same as panel A for CLA and NO₂-CLA. C, best poses after docking OA and NO₂-OA considering the presence of an acetylated H3 peptide at Lys-9 (H3K9Ac). D, same as panel C for CLA and NO₂-CLA.

analysis confirmed Michael adduct formation with cysteine residues, in particular with Cys-141 (coordinating Zn²⁺) and Cys-18 at the N terminus (Fig. 5). Interaction of SIRT6 with NO₂-OA at the cellular level was confirmed by pulldown with streptavidin after incubating HEK293T cells overexpressing FLAG-SIRT6 with Bt-NO₂-OA (Fig. 9). Despite not having a catalytic cysteine, oxidation of sirtuin cysteines has been shown to affect hSIRT6 activity *in vitro* and *in vivo* (62). For example, Cys-18 was found to be S-sulfenylated when colon cancer cells were exposed to hydrogen peroxide, resulting in the formation of a covalent complex with HIF1 α via disulfide bonding (63). Similarly, work on lipopolysaccharide-activated human monocytes demonstrated SIRT6 sulfenylation on Cys-144 (64), and incubation of hSIRT6 with nitrosating

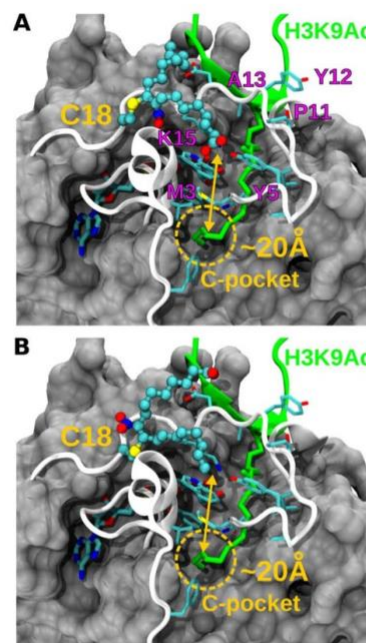


Figure 8. Molecular modeling of nitro-fatty acid conjugation to Cys-18. A, molecular representation of one possible conformation of the Michael adduct between Cys-18 and 9-NO₂-OA. The nitro-fatty acid is shown in balls and stick, whereas nearby protein residues are drawn in sticks. Residues that may form an exposed hydrophobic patch at the surface of the acyl/co-substrate-binding loop are labeled in magenta. The location and distance to the C-pocket is indicated. B, same as panel A but showing other alternative conformation that the same adduct may adopt.

agents resulted in protein S-nitrosation and loss of demyristoylase activity (65).

Molecular docking analysis (Fig. 7) showed that a NO₂-FA molecule accommodated in the active site would be unable to react with any of these cysteine residues, indicating that Michael adduct formation likely involves a different reaction site. Importantly, the covalent modification of hSIRT6 by NO₂-FA induces a conformational change (Fig. 3) that results in a much larger increase in enzymatic activity than that attained by mere binding of the long acyl chain of the NO₂-FA on the active site loop (Fig. 2). In line with this concept, incubation of NO₂-FA with the mutant C18S resulted in only a minor activation ("the fatty acid effect") compared with the much stronger effect achieved with the wt hSIRT6 where the Michael adduct with Cys-18 can be formed (Fig. 6). This result also indicates that, although Cys-141 is susceptible to modification by NO₂-FA, this reaction is not responsible for hSIRT6 activation. On the whole, the results suggest that NO₂-FA may still activate hSIRT6 by binding to the active site in a similar fashion as non-nitrated fatty acids, the formation of a Michael adduct with Cys-18 induces a much greater activation as a result of the stabilization of the hydrophobic patch constituted by residues Met-3, Tyr-5, Pro-11, Tyr-12, Ala-13, and Lys-15 in the acyl/

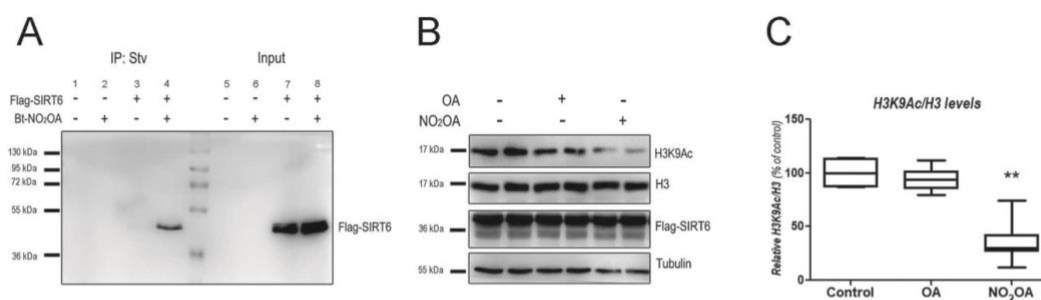


Figure 9. *In situ* covalent modification of hSIRT6 by NO₂-OA promotes H3K9 deacetylation in cells. **A**, HEK293T cells expressing FLAG-SIRT6 were treated with 10 μ M Bt-NO₂-OA for 1 h. After cell lysis, Bt-NO₂-OA adducts were affinity-purified using streptavidin-agarose beads followed by FLAG immunodetection (lanes 1–4). FLAG-SIRT6 from the same input lysates used for affinity purification is shown on the right (lanes 5–8). Immunoprecipitation was performed in HEK293T cells overexpressing FLAG-SIRT6 (lanes 3 and 4) and in control HEK293T cells without transfection (lanes 1 and 2). Arrows indicate 55- and 36-kDa molecular mass standards. **B**, HEK293T cells were treated with 10 μ M OA or 10 μ M NO₂-OA for 1 h in serum-free DMEM and H3K9 acetylation assessed by Western blotting analysis. **C**, densitometric H3K9Ac quantification versus total amount of H3 (H3K9Ac/H3). Statistically significant differences were observed between control and NO₂-OA incubation. Error bars represent S.D. of at least three replicates. **, $p < 0.001$ as determined by ANOVA.

co-substrate-binding loop (Fig. 8). Both activation mechanisms are expected to be independent and thus could not be mediated by the same NO₂-FA molecule. SIRT6 has the shortest N-terminal region among the seven sirtuins and is the only isoform that contains a reactive cysteine in this region (30), suggesting that the potent activation induced by NO₂-FA is likely to be specific to SIRT6. In fact, no *in vitro* activation of SIRT1 was observed by NO₂-FA.

Treatment of HEK293T cells with NO₂-OA resulted in a significant decrease in the levels of acetylated H3K9, an effect that was not observed when equivalent concentrations of OA were used (Fig. 9, B and C). Importantly, the concentration of NO₂-OA required to activate cellular hSIRT6 (10 μ M) is comparable with those shown to elicit physiologically relevant signaling events *in vitro* that then translate successfully to both animal and human studies (52, 66, 67). In this regard, administration of NO₂-OA to both genetic and dietary mouse models of obesity results in improved insulin sensitivity and glucose tolerance, as well as in protection against mitochondrial dysfunction (68, 69). These effects have been ascribed to a combination of partial peroxisome proliferator-activated receptor γ agonism, inhibition of pro-inflammatory NF- κ B signaling, attenuation of reactive species generation, and prevention of mitochondrial dysfunction in the adipose tissue (68–71). Notably, these results are also consistent with those obtained upon SIRT6 overexpression in both obese and non-obese mouse models (13–15), suggesting that posttranslational SIRT6 activation could contribute to the metabolic effects of NO₂-OA *in vivo*.

Considering that SIRT6 is a key enzyme in inflammation and metabolism, effective modulators of its activity are of special interest. Herein we report that nitrated derivatives from known fatty acid activators of hSIRT6 are able to further increase enzyme activity by ~40-fold. We postulate that a synergistic mechanism may be at play, involving both the binding of a NO₂-FA to a pocket in the active site of the enzyme and the formation of a Michael adduct with Cys-18. The complementary effect of Cys-18 nitro-alkylation may shift the N-terminal region of hSIRT6 to its active conformation, similar to other activators, such as MDL-800/801 (45), UBSC039 (44), querce-

tin, isoquercetin, and cyanidin (48). Taken together, our results indicate that activation of SIRT6-dependent deacetylase activity could significantly contribute to the physiological and pharmacological actions of NO₂-FA *in vivo*.

Experimental procedures

Reagents

Acylpeptide H3K9 (Ac-KQTARKSTGGWW), H3K9Ac (Ac-KQTARK(Ac)STGGWW), and H3K9Myr (Ac-KQTARK(My)STGGWW) were custom synthesized at $\geq 90\%$ purity by United Biosystems, VA, USA. 9- and 10-Nitrooctadec-9-enoic acid (nitro-oleic acid, 9- and 10-NO₂-OA), 9- and 12-nitrooctadec-9,11-dienoic acid (nitro-conjugated linoleic acid, 9- and 12-NO₂-CLA), and Bt-NO₂-OA were synthesized as previously described (58, 72, 73). For both, NO₂-OA and NO₂-CLA, a 1:1 mixture of the positional isomers in methanol (2 mM) was used as stock and kept at -80°C . Cell media, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), β -mercaptoethanol (β -ME), and tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP) were purchased from Sigma-Aldrich, USA. All other chemicals were of analytical grade.

Recombinant hSIRT6 WT and hSIRT6 C18S expression and purification

Competent BL21-DE3 *Escherichia coli* cells were transformed with pQE-80L plasmid containing N-terminal His-tagged human SIRT6 sequence (1–355) or His-tagged human SIRT6 C18S and were grown in 2YT medium supplemented with 100 μ g/ml of ampicillin to an absorbance of 0.6 at 600 nm. Protein expression was induced overnight by addition of 0.5 mM IPTG at 25°C . Cells were harvested by centrifugation at $5000 \times g$ and frozen at -80°C . Frozen cell pellets were thawed on ice and resuspended in lysis buffer: 50 mM sodium phosphate, pH 7.2, containing 250 mM NaCl, 5 mM imidazole, and 1 mM β -ME. Cells were lysed via sonication, centrifuged ($18,000 \times g$), and applied to a nickel-nitrilotriacetic acid column (GE Healthcare), washed with 5 volumes of lysis buffer followed by 5 volumes of 50 mM sodium phosphate, pH 7.5,

Nitro-fatty acids as SIRT6 activators

containing 250 mM NaCl, 10 mM imidazole, and 1 mM β -ME. Elution was carried out using 250 mM imidazole in the buffer. hSIRT6 was further purified by cationic exchange on a HiTrap SP-Sepharose Fast Flow column (GE Healthcare) in 50 mM sodium phosphate, pH 7.2, 50 mM NaCl, and 1 mM β -ME. After washing the column with 150 mM NaCl in buffer, elution was carried out by a linear gradient from 150 to 750 mM NaCl in the same buffer. Fractions containing purified hSIRT6 (containing 1 mol of Zn^{2+} /mol of protein) were concentrated and dialyzed into 50 mM Tris, pH 8.0 (4 °C), 150 mM NaCl, 100 μM TCEP, and 5% (w/v) glycerol, and stored at -80°C .

Recombinant Pnc1 expression and purification

Competent BL21-DE3 *E. coli* cells were transformed with pET28a plasmid containing His-tagged Pnc1 nicotinamidase from *Saccharomyces cerevisiae* (74) and grown in LB medium supplemented with 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of kanamycin to an absorbance of 0.6 at 600 nm. Protein expression was induced by addition of 1 mM IPTG for 4 h at 37 °C. Cells were harvested (5000 $\times$ g) and frozen at -80°C . Frozen cell pellets were thawed on ice and resuspended in lysis buffer: 50 mM Tris, pH 7.2, 250 mM NaCl, 5 mM imidazole, and 1 mM β -ME. Recombinant protein was purified from the clarified cell lysate by nickel affinity chromatography. After loading the column, a 10-volume wash was carried out with 50 mM Tris, pH 7.2, 250 mM NaCl, 30 mM imidazole, and 1 mM β -ME. For the elution, 500 mM imidazole was used in the same buffer. Pnc1 was further purified by gel filtration in 50 mM sodium phosphate, pH 8, 150 mM NaCl, 3 mM β -ME and stored at -80°C .

Quantification of Zn^{2+}

To determine the stoichiometry of zinc bound to hSIRT6, the metal ion was first released by *p*-chloromercuribenzoate treatment and complexed with the dye 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR). A molar extinction coefficient of 66,000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 500 nm was used for the resulting Zn-PAR complex (75). The reaction mixture contained 2 μM hSIRT6, 20 μM *p*-chloromercuribenzoate, 40 μM PAR in 50 mM sodium phosphate, pH 7.4, and absorbance at 500 nm was monitored.

Deacetylase activity assay

hSIRT6 deacetylase activity was measured under initial rate conditions using an enzyme-coupled assay as previously reported (76). Assays were performed in 50 mM sodium phosphate, pH 7.4, 150 mM NaCl, at 37 °C, in a final volume of 100 μl . The reaction mixture contained 0.6 mM NAD, 3 mM α -ketoglutarate, 0.2 mM NADPH, 3 μM Pnc1, 2 units of glutamic dehydrogenase, 50 μM H3K9Ac, and 0.5 μM hSIRT6 or hSIRT6 C18S. The reaction mixture was preincubated for 20 min at 37 °C until absorbance at 340 nm was stable and deacetylation reaction started by the addition of hSIRT6 or hSIRT6 C18S.

Effect of nitrated and non-nitrated fatty acids on hSIRT6 deacetylase activity

To determine the effect of fatty acids or nitro-fatty acids on deacetylase hSIRT6 activity, the enzyme (WT or mutant, 1 μM)

was preincubated, for 30 min at room temperature, with variable excess concentrations of OA, CLA, and their respective nitro-derivatives (NO_2 -OA, NO_2 -CLA). Racemic mixtures of the nitro-fatty acids used were: 9- and 10- NO_2 -OA, and 9- and 12- NO_2 -CLA (see Fig. 2). Stock solutions of the fatty acids in methanol were diluted in DMSO immediately before the experiment. All fatty acid concentrations used were below the CMC (CMC for OA, 150–200 μM (43), CMC for NO_2 -OA 40–60 μM).⁶ Nitro-fatty acid concentrations were determined using $\epsilon_{270\text{ nm}} = 8220\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ and $\epsilon_{330\text{ nm}} = 6,490\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (in phosphate buffer, pH 7.4) for NO_2 -OA and NO_2 -CLA, respectively (77). Excess fatty acid was eliminated by gel filtration before activity measured using the enzyme-coupled assay.

Structural assessment by CD

Protein samples in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, were filtered (0.2 μM) before running the spectra on a Chirascan Q100 spectropolarimeter (Applied Photophysics, UK). A 3 μM protein concentration was used for far-UV CD (0.1-cm light path) and 10 μM for near-UV CD (1-cm light path cuvette). All spectra were normalized using: ellipticity Θ (mdeg)/($n-1$) $\times$ (μM protein) $\times$ 10 light path (cm), where n is the number of amino acid residues. hSIRT6 was incubated at 37 °C for 30 min in the absence or presence of 5-fold excess of OA or NO_2 -OA before running the spectra.

In vitro hSIRT6 modification by biotinylated NO_2 -OA

hSIRT6 was first reduced in batch using a TCEP resin (30 min at 25 °C) followed by incubation with 10 mM NEM or 1 mM DEPC for 30 min at 37 °C to block cysteines and histidines, respectively. Unreacted reagents were removed by gel filtration and protein concentration was determined by UV absorbance ($\epsilon_{280} = 33,460\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Variable concentrations of Bt- NO_2 -OA were incubated with 1.2 μM hSIRT6 for 30 min at 25 °C, followed by SDS-PAGE separation and transfer to a PVDF membrane (1 h, 4 °C). Loaded amounts of hSIRT6 were visualized with Ponceau S staining. Membrane was blocked with PBS, 1% casein, overnight at 4 °C, and incubated with streptavidin-HRP for 1 h at room temperature. After three washes in 0.1% TBS-T buffer, bands were visualized using an ECL Western blotting system (ThermoFisher Scientific). Band intensities were quantified using ImageJ.

ESI-MS/MS analysis of Michael adduct formation between hSIRT6 and NO_2 -OA

hSIRT6 was reduced with 5 mM DTT (30 min at room temperature) and excess DTT was removed by gel filtration. Reduced hSIRT6 (4 μM) in 100 mM ammonium bicarbonate, pH 8, was incubated with two concentrations of NO_2 -OA (0.5 and 5 $\times$) for 30 min at 25 °C, and unreacted NO_2 -OA was removed by gel filtration to avoid interference during the analysis. Tryptic digestion was carried out for 2 h at 37 °C and the resulting peptides were analyzed by nano-LC (EASY-nLC 1000, Thermo Scientific) coupled to a linear ion trap mass spectrometer (LTQ Velos, Thermo Scientific). Peptide separation

⁶ M. Carreño and A. Denicola, unpublished results.

was performed using an in-house packed reverse phase nano-column (ReproSil-Pur[®], Maisch; inner diameter, 75 μ m; length, 28 cm) at a flow rate of 300 nL/min. A 70-min gradient of 0.1% (v/v) formic acid in water, 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile was used (4–55% acetonitrile in 60 min; 55–100% in 10 min). Mass spectrometer was set in a data-dependent acquisition mode (full MS followed by MS/MS of 10 most intense ions, using a 30-s dynamic exclusion list). Peptides were identified by searching a database containing *E. coli* Uniprot protein sequences (downloaded September 2018) plus hSirt6 sequence. Proteome Discoverer software (version 1.3.0.339, Thermo) with Sequest as search engine were used with the following parameters: precursor mass tolerance: 1.5 Da; fragment mass tolerance 0.8 Da; oxidation of methionine and modification with NO₂-OA (+327.24 Da) as dynamic modifications. High-confident peptides (target FDR set to 0.01) were considered. Manual inspection of the MS/MS spectra was performed to corroborate peptide sequence and modification site assignments.

Intracellular SIRT6 modification by NO₂-OA

HEK293T cells were grown in DMEM (high-glucose), 10% FBS, 100 units/ml of penicillin, and 100 μ g/ml of streptomycin. Cells were transfected with FLAG-SIRT6 plasmid (Addgene plasmid number 13817) with Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) for 48 h. Cells were then incubated with 10 μ M Bt-NO₂-OA in serum-free DMEM for 1 h. Cell lysis and immunoprecipitation was performed as described previously (78). Briefly, cells were lysed in NETN buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40) supplemented with 5 mM NaF, 50 mM 2-glycerophosphate, and a protease inhibitor mixture (Roche). Homogenates were incubated at 4 °C for 20 min under constant agitation and then centrifuged at 10,000 $\times$ g for 10 min at 4 °C. For each immunoprecipitation, 1 mg of protein was used. Samples were incubated with 20 μ L of Strep-Tactin Sepharose beads for 1–2 h at 4 °C under constant rotation. Finally, immunoprecipitates were washed 2–3 times with cold NETN before addition of 2 $\times$ Laemmli buffer followed by SDS-PAGE separation and transfer to a PVDF membrane (1 h, 4 °C). Primary and secondary antibodies utilized were anti-FLAG (Sigma, number F3165) and HRP-conjugated IgG from mouse (Sigma, A9044), respectively. Bands were visualized using an ECL Western blotting system (ThermoFisher Scientific) and images were processed by Photoshop.

Assessment of cellular H3K9 acetylation

HEK293T cells were grown in DMEM (high-glucose), 10% FBS, 100 units/ml of penicillin, and 100 μ g/ml of streptomycin. Cells were transfected with FLAG-SIRT6 plasmid (Addgene plasmid number 13817) with Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) for 48 h. Cells were later incubated with 10 μ M NO₂-OA (or 10 μ M OA) in serum-free DMEM for 1 h. Cell lysis was performed as described previously (79). Briefly, cells were lysed in RIPA buffer (25 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS) supplemented with 5 mM NaF, 50 mM 2-glycerophosphate, 1 μ M trichostatin A, 5 mM nicotinamide, and a protease inhibitor mixture (Roche). Homogenates were incubated at 4 °C for 20 min under constant agitation and

then centrifuged at 10,000 $\times$ g for 10 min at 4 °C. Protein lysates were separated on 15% SDS-PAGE followed by transfer to PVDF membrane and incubation with specific primary antibodies (H3K9Ac, H3, FLAG, and tubulin). H3K9Ac and H3 antibodies were from Cell Signaling (9649S and 4620S, respectively). Images were processed using Photoshop and densitometry analysis were done with ImageJ (Rasband, W.S., Bethesda, MD, USA).

Computational modeling

The experimental holo structure of hSIRT6 in complex with a H3K9 myristoyl peptide and ADP-ribose fragment of NAD⁺ co-substrate (PDB code: 3ZG6 (28)) was used as receptor template. Residues 1 to 12 constituting the acyl-binding loop of hSIRT6 were removed from the structure due to their high flexibility, which is evidenced in apo structures (PDB codes 3PKI (34) and 5X16 (47)) or in presence of inhibitor/activator compounds (46, 80, 81). The co-substrate and water molecules 2006 2018 2019 2035 2036 2038 2040 2042 2053 2080 2099 2103 2104 2110 2111 2123 2124 2132 were kept in the structure to mask unspecific pockets around the protein surface. The coordinates of the receptor were moved prior docking according to the following transformation matrix using VMD 1.9.3 (82): {-0.782000720500946 0.30951544642448425 -0.5409945249557495 69.48826599121094} {0.5513688921928406 -0.06120478734374046 -0.8320134282112122 3.671846389770508} {-0.2906324565410614 -0.9489226341247559 -0.1227950006723404 -6.218472480773926} {0.0 0.0 0.0 1.0}, where braces define row vectors. The ligands corresponded to OA, 9-NO₂-OA, 10-NO₂-OA, CLA, 9-NO₂-CLA, and 12-NO₂-CLA (Fig. 2A). Docking calculations were done with AutoDock Vina (83). Each molecule was prepared with AutoDockTools (84) by merging nonpolar hydrogen atoms and computing Gasteiger charges. Histidine residues were assumed to be protonated at N ϵ . The searching grid was centered at coordinates $x = 21.464$ Å, $y = 3.555$ Å, and $z = 16.125$ Å, and the total size was defined as 50, 70, and 44 Å for each coordinate, respectively. The receptor was considered rigid while ligands were allowed to be full flexible. At each run 20 binding modes were generated using an exhaustiveness of 20 and allowing for energy ranges of 100 kcal/mol. Calculations were replicated 500 times for a total of 10,000 poses per ligand. Poses scoring up to 1 kcal/mol from the best conformation were selected for cluster analysis. Cluster analysis was based on the distance matrix of root mean square deviations, using a cut-off of 4 Å for grouping poses. On each case, the best pose from the top populated cluster was chosen for analysis. Possible conformations for 9-NO₂-OA conjugation with Cys-18 were manually build and sculpted using PyMOL 1.8.4.0 (RRID:SCR_000305).

Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ S.D. (experiments repeated at least three times). Statistical comparisons were made using one way-ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test (GraphPad Prism 8.02). Difference was considered significant if $p < 0.05$.

Nitro-fatty acids as SIRT6 activators

Data availability

All data are contained within the manuscript. Raw data are available upon request (denicola@fcien.edu.uy, escande@pasteur.edu.uy).

Acknowledgments—We are grateful to Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur de Montevideo for MS analyses, Lucia Turell and Beatriz Alvarez (Universidad de la República) for helpful discussions, and Bruce A. Freeman (University of Pittsburgh) for insightful advice on nitro-fatty acids.

Author contributions—M. C., M. B., M. R. M., R. D., D. A. V., C. E., and A. D. formal analysis; M. C., M. B., and M. R. M. investigation; M. C., M. B., M. R. M., L. S., R. D., and D. A. V. methodology; M. R. M., C. E., and A. D. conceptualization; M. R. M. and A. D. writing-original draft; R. D., D. A. V., C. E., and A. D. supervision; D. A. V., C. E., and A. D. funding acquisition; C. E. and A. D. writing-review and editing.

Funding and additional information—This work was supported by grants (to A. D. and C. E.) and fellowships (to M. C., M. B., and L. S.) from Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Uruguay), and National Institutes of Health Grants K01HL133331 and P30DK079307 (to D. A. V.). This work was partially supported by FOCEM (Mercosur), Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) Universidad de la República and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Uruguay. A. D., C. E., R. D., and M. R. M. are part of the SNI program of ANII.

Conflict of interest—The authors declare that they have no conflict of interest with the contents of this article.

Abbreviations—The abbreviations used are: NO₂-FA, nitro-fatty acids; CLA, conjugated linoleic acid; OA, oleic acid; Bt-NO₂-OA, biotinylated-NO₂-OA; IPTG, isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside; NEM, N-ethylmaleimide; HRP, horseradish peroxidase; DEPC, diethyl pyrocarbonate; TCEP, tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride; β-ME, β-mercaptoethanol; PAR, 4-(2-pyridylazo)resorcinol; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; ANOVA, analysis of variance; PDB, Protein Data Bank; PVDF, polyvinylidene difluoride; CMC, critical micellar concentration.

References

- Chalkiadaki, A., and Guarente, L. (2012) Sirtuins mediate mammalian metabolic responses to nutrient availability. *Nat. Rev. Endocrinol.* **8**, 287–296 [CrossRef Medline](#)
- Finkel, T., Deng, C. X., and Mostoslavsky, R. (2009) Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature* **460**, 587–591 [CrossRef Medline](#)
- Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., and Guarente, L. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**, 795–800 [CrossRef Medline](#)
- Michan, S., and Sinclair, D. (2007) Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem. J.* **404**, 1–13 [CrossRef Medline](#)
- Giblin, W., Skinner, M. E., and Lombard, D. B. (2014) Sirtuins: guardians of mammalian healthspan. *Trends Genet.* **30**, 271–286 [CrossRef Medline](#)
- Haigis, M. C., and Sinclair, D. A. (2010) Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu. Rev. Pathol.* **5**, 253–295 [CrossRef Medline](#)
- Houtkooper, R. H., Pirinen, E., and Auwerx, J. (2012) Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 225–238 [CrossRef Medline](#)
- Rauh, D., Fischer, F., Gertz, M., Lakshminarasimhan, M., Bergbrede, T., Aladini, F., Kambach, C., Becker, C. F., Zerweck, J., Schutkowski, M., and Steegborn, C. (2013) An acetylene peptide microarray reveals specificities and deacetylation substrates for all human sirtuin isoforms. *Nat. Commun.* **4**, 2327 [CrossRef Medline](#)
- Michishita, E., Park, J. Y., Burnes, J. M., Barrett, J. C., and Horikawa, I. (2005) Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4623–4635 [CrossRef Medline](#)
- Gil, R., Barth, S., Kanfi, Y., and Cohen, H. Y. (2013) SIRT6 exhibits nucleosome-dependent deacetylase activity. *Nucleic Acids Res.* **41**, 8537–8545 [CrossRef Medline](#)
- Kugel, S., and Mostoslavsky, R. (2014) Chromatin and beyond: the multi-tasking roles for SIRT6. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 72–81 [CrossRef Medline](#)
- Mao, Z., Hine, C., Tian, X., Van Meter, M., Au, M., Vaidya, A., Seluanov, A., and Gorbunova, V. (2011) SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science* **332**, 1443–1446 [CrossRef Medline](#)
- Kanfi, Y., Naiman, S., Amir, G., Peshti, V., Zinman, G., Nahum, L., Bar-Joseph, Z., and Cohen, H. Y. (2012) The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature* **483**, 218–221 [CrossRef Medline](#)
- Kanfi, Y., Peshti, V., Gil, R., Naiman, S., Nahum, L., Levin, E., Kronfeld-Schor, N., and Cohen, H. Y. (2010) SIRT6 protects against pathological damage caused by diet-induced obesity. *Aging Cell* **9**, 162–173 [CrossRef Medline](#)
- Roichman, A., Kanfi, Y., Glaz, R., Naiman, S., Amit, U., Landa, N., Timman, S., Stein, I., Pikarsky, E., Leor, J., and Cohen, H. Y. (2017) SIRT6 overexpression improves various aspects of mouse healthspan. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **72**, 603–615 [CrossRef Medline](#)
- Zhaohui, C., and Shuihua, W. (2020) Protective effects of SIRT6 against inflammation, oxidative stress, and cell apoptosis in spinal cord injury. *Inflammation* **43**, 1751–1758 [CrossRef](#)
- Mostoslavsky, R., Chua, K. F., Lombard, D. B., Pang, W. W., Fischer, M. R., Gellon, L., Liu, P., Mostoslavsky, G., Franco, S., Murphy, M. M., Mills, K. D., Patel, P., Hsu, J. T., Hong, A. L., Ford, E., et al. (2006) Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* **124**, 315–329 [CrossRef Medline](#)
- Kuang, J., Zhang, Y., Liu, Q., Shen, J., Pu, S., Cheng, S., Chen, L., Li, H., Wu, T., Li, R., Li, Y., Zou, M., Zhang, Z., Jiang, W., Xu, G., et al. (2017) Fat-specific Sirt6 ablation sensitizes mice to high-fat diet-induced obesity and insulin resistance by inhibiting lipolysis. *Diabetes* **66**, 1159–1171 [CrossRef Medline](#)
- Lee, Y., Ka, S. O., Cha, H. N., Chae, Y. N., Kim, M. K., Park, S. Y., Bae, E. J., and Park, B. H. (2017) Myeloid sirtuin 6 deficiency causes insulin resistance in high-fat diet-fed mice by eliciting macrophage polarization toward an M1 phenotype. *Diabetes* **66**, 2659–2668 [CrossRef Medline](#)
- Song, M. Y., Wang, J., Ka, S. O., Bae, E. J., and Park, B. H. (2016) Insulin secretion impairment in Sirt6 knockout pancreatic beta cells is mediated by suppression of the FoxO1-Pdx1-Glut2 pathway. *Sci. Rep.* **6**, 30321 [CrossRef Medline](#)
- Schwer, B., Schumacher, B., Lombard, D. B., Xiao, C., Kurtev, M. V., Gao, J., Schneider, J. I., Chai, H., Bronson, R. T., Tsai, L. H., Deng, C. X., and Alt, F. W. (2010) Neural sirtuin 6 (Sirt6) ablation attenuates somatic growth and causes obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 21790–21794 [CrossRef Medline](#)
- Kawahara, T. L., Michishita, E., Adler, A. S., Damian, M., Berber, E., Lin, M., McCord, R. A., Ongaigui, K. C., Boxer, L. D., Chang, H. Y., and Chua, K. F. (2009) SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-κB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell* **136**, 62–74 [CrossRef Medline](#)
- Michishita, E., McCord, R. A., Berber, E., Gkoi, M., Padilla-Nash, H., Damian, M., Cheung, P., Kusumoto, R., Kawahara, T. L., Barrett, J. C., Chang, H. Y., Bohr, V. A., Ried, T., Gozani, O., and Chua, K. F. (2008) SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature* **452**, 492–496 [CrossRef Medline](#)

24. Yang, B., Zwaans, B. M., Eckersdorff, M., and Lombard, D. B. (2009) The sirtuin SIRT6 deacetylates H3 K56Ac *in vivo* to promote genomic stability. *Cell Cycle* **8**, 2662–2663 [CrossRef Medline](#)
25. Tasselli, L., Xi, Y., Zheng, W., Tennen, R. L., Odrowaz, Z., Simeoni, F., Li, W., and Chua, K. F. (2016) SIRT6 deacetylates H3K18ac at pericentric chromatin to prevent mitotic errors and cellular senescence. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 434–440 [CrossRef Medline](#)
26. Zhong, L., D'Urso, A., Toiber, D., Sebastian, C., Henry, R. E., Vadsyrisack, D. D., Guimaraes, A., Marinelli, B., Wikstrom, J. D., Nir, T., Clish, C. B., Vaitheeswaran, B., Iliopoulos, O., Kurland, I., Dor, Y., *et al.* (2010) The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1 α . *Cell* **140**, 280–293 [CrossRef Medline](#)
27. Tennen, R. L., and Chua, K. F. (2011) Chromatin regulation and genome maintenance by mammalian SIRT6. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 39–46 [CrossRef Medline](#)
28. Jiang, H., Khan, S., Wang, Y., Charron, G., He, B., Sebastian, C., Du, J., Kim, R., Ge, E., Mostoslavsky, R., Hang, H. C., Hao, Q., and Lin, H. (2013) SIRT6 regulates TNF- α secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyllysine. *Nature* **496**, 110–113 [CrossRef Medline](#)
29. Klein, M. A., and Denu, J. M. (2020) Biological and catalytic functions of sirtuin 6 as targets for small-molecule modulators. *J. Biol. Chem.* **295**, 11021–11041 [CrossRef Medline](#)
30. Costantini, S., Sharma, A., Raucchi, R., Costantini, M., Autiero, I., and Colonna, G. (2013) Genealogy of an ancient protein family: the Sirtuins, a family of disordered members. *BMC Evol. Biol.* **13**, 60 [CrossRef Medline](#)
31. Sanders, B. D., Jackson, B., and Marmorstein, R. (2010) Structural basis for sirtuin function: what we know and what we don't. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 1604–1616 [CrossRef Medline](#)
32. Zhao, K., Chai, X., Clements, A., and Marmorstein, R. (2003) Structure and autoregulation of the yeast Hst2 homolog of Sir2. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 864–871 [CrossRef Medline](#)
33. Min, J., Landry, J., Sternglanz, R., and Xu, R. M. (2001) Crystal structure of a SIR2 homolog-NAD complex. *Cell* **105**, 269–279 [CrossRef Medline](#)
34. Pan, P. W., Feldman, J. L., Devries, M. K., Dong, A., Edwards, A. M., and Denu, J. M. (2011) Structure and biochemical functions of SIRT6. *J. Biol. Chem.* **286**, 14575–14587 [CrossRef Medline](#)
35. Feldman, J. L., Dittenhafer-Reed, K. E., Kudo, N., Thelen, J. N., Ito, A., Yoshida, M., and Denu, J. M. (2015) Kinetic and structural basis for acyl-group selectivity and NAD $^{+}$ dependence in sirtuin-catalyzed deacylation. *Biochemistry* **54**, 3037–3050 [CrossRef Medline](#)
36. Frye, R. A. (2000) Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**, 793–798 [CrossRef Medline](#)
37. Tennen, R. L., Berber, E., and Chua, K. F. (2010) Functional dissection of SIRT6: identification of domains that regulate histone deacetylase activity and chromatin localization. *Mech. Ageing Dev.* **131**, 185–192 [CrossRef Medline](#)
38. Borra, M. T., Langer, M. R., Slama, J. T., and Denu, J. M. (2004) Substrate specificity and kinetic mechanism of the Sir2 family of NAD $^{+}$ -dependent histone/protein deacetylases. *Biochemistry* **43**, 9877–9887 [CrossRef Medline](#)
39. Jackson, M. D., and Denu, J. M. (2002) Structural identification of 2'- and 3'-O-acetyl-ADP-ribose as novel metabolites derived from the Sir2 family of β -NAD $^{+}$ -dependent histone/protein deacetylases. *J. Biol. Chem.* **277**, 18535–18544 [CrossRef Medline](#)
40. Jin, L., Wei, W., Jiang, Y., Peng, H., Cai, J., Mao, C., Dai, H., Choy, W., Bemis, J. E., Jirousek, M. R., Milne, J. C., Westphal, C. H., and Perni, R. B. (2009) Crystal structures of human SIRT3 displaying substrate-induced conformational changes. *J. Biol. Chem.* **284**, 24394–24405 [CrossRef Medline](#)
41. Smith, B. C., and Denu, J. M. (2006) Sir2 protein deacetylases: evidence for chemical intermediates and functions of a conserved histidine. *Biochemistry* **45**, 272–282 [CrossRef Medline](#)
42. Morris, B. J. (2013) Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radic. Biol. Med.* **56**, 133–171 [CrossRef Medline](#)
43. Feldman, J. L., Baeza, J., and Denu, J. M. (2013) Activation of the protein deacetylase SIRT6 by long-chain fatty acids and widespread deacylation by mammalian sirtuins. *J. Biol. Chem.* **288**, 31350–31356 [CrossRef Medline](#)
44. Rahnasto-Rilla, M., Kokkola, T., Jarho, E., Lahtela-Kakkonen, M., and Moaddel, R. (2016) N-Acylethanolamines bind to SIRT6. *ChemBioChem* **17**, 77–81 [CrossRef Medline](#)
45. Rahnasto-Rilla, M., Tyni, J., Huovinen, M., Jarho, E., Kulikowicz, T., Ravichandran, S., A. Bohr, V., Ferrucci, L., Lahtela-Kakkonen, M., and Moaddel, R. (2018) Natural polyphenols as sirtuin 6 modulators. *Sci. Rep.* **8**, 4163 [CrossRef Medline](#)
46. You, W., Rotili, D., Li, T. M., Kambach, C., Meleshin, M., Schutkowski, M., Chua, K. F., Mai, A., and Steegborn, C. (2017) Structural basis of sirtuin 6 activation by synthetic small molecules. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **56**, 1007–1011 [CrossRef Medline](#)
47. Huang, Z., Zhao, J., Deng, W., Chen, Y., Shang, J., Song, K., Zhang, L., Wang, C., Lu, S., Yang, X., He, B., Min, J., Hu, H., Tan, M., Xu, J., *et al.* (2018) Identification of a cellularly active SIRT6 allosteric activator. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 1118–1126 [CrossRef Medline](#)
48. Klein, M. A., Liu, C., Kuznetsov, V. I., Feltenberger, J. B., Tang, W., and Denu, J. M. (2020) Mechanism of activation for the sirtuin 6 protein deacetylase. *J. Biol. Chem.* **295**, 1385–1399 [CrossRef Medline](#)
49. Delmastro-Greenwood, M., Hughan, K. S., Vitturi, D. A., Salvatore, S. R., Grimes, G., Potti, G., Shiva, S., Schopfer, F. J., Gladwin, M. T., Freeman, B. A., and Gelhaus Wendell, S. (2015) Nitrite and nitrate-dependent generation of anti-inflammatory fatty acid nitroalkenes. *Free Radic. Biol. Med.* **89**, 333–341 [CrossRef Medline](#)
50. Bonacci, G., Baker, P. R., Salvatore, S. R., Shores, D., Khoo, N. K., Koenitzer, J. R., Vitturi, D. A., Woodcock, S. R., Golin-Bisello, F., Cole, M. P., Watkins, S., St Croix, C., Batthyany, C. I., Freeman, B. A., and Schopfer, F. J. (2012) Conjugated linoleic acid is a preferential substrate for fatty acid nitration. *J. Biol. Chem.* **287**, 44071–44082 [CrossRef Medline](#)
51. Vitturi, D. A., Maynard, C., Olsufka, M., Straub, A. C., Krehel, N., Kudenchuk, P. J., Nichol, G., Sayre, M., Kim, F., and DeZulian, C. (2020) Nitrite elicits divergent NO-dependent signaling that associates with outcome in out of hospital cardiac arrest. *Redox Biol.* **32**, 101463 [CrossRef](#)
52. Schopfer, F. J., Cipollina, C., and Freeman, B. A. (2011) Formation and signaling actions of electrophilic lipids. *Chem. Rev.* **111**, 5997–6021 [CrossRef Medline](#)
53. Salvatore, S. R., Vitturi, D. A., Baker, P. R., Bonacci, G., Koenitzer, J. R., Woodcock, S. R., Freeman, B. A., and Schopfer, F. J. (2013) Characterization and quantification of endogenous fatty acid nitroalkene metabolites in human urine. *J. Lipid Res.* **54**, 1998–2009 [CrossRef Medline](#)
54. Baker, L. M., Baker, P. R., Golin-Bisello, F., Schopfer, F. J., Fink, M., Woodcock, S. R., Branchaud, B. P., Radi, R., and Freeman, B. A. (2007) Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine: Kinetic analysis of thiol alkylation by a Michael addition reaction. *J. Biol. Chem.* **282**, 31085–31093 [CrossRef Medline](#)
55. Buchan, G. J., Bonacci, G., Fazzari, M., Salvatore, S. R., and Gelhaus Wendell, S. (2018) Nitro-fatty acid formation and metabolism. *Nitric Oxide* **79**, 38–44 [CrossRef Medline](#)
56. Batthyany, C., Schopfer, F. J., Baker, P. R., Duran, R., Baker, L. M., Huang, Y., Cervenansky, C., Branchaud, B. P., and Freeman, B. A. (2006) Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **281**, 20450–20463 [CrossRef Medline](#)
57. Kansanen, E., Bonacci, G., Schopfer, F. J., Kuosmanen, S. M., Tong, K. I., Leinonen, H., Woodcock, S. R., Yamamoto, M., Carlberg, C., Ylä-Herttua, S., Freeman, B. A., and Levenon, A. L. (2011) Electrophilic nitro-fatty acids activate NRF2 by a KEAP1 cysteine 151-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* **286**, 14019–14027 [CrossRef Medline](#)
58. Cui, T., Schopfer, F. J., Zhang, J., Chen, K., Ichikawa, T., Baker, P. R., Batthyany, C., Chacko, B. K., Feng, X., Patel, R. P., Agarwal, A., Freeman, B. A., and Chen, Y. E. (2006) Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *J. Biol. Chem.* **281**, 35686–35698 [CrossRef Medline](#)
59. Villacorta, L., Minarrieta, L., Salvatore, S. R., Khoo, N. K., Rom, O., Gao, Z., Berman, R. C., Jobbagy, S., Li, L., Woodcock, S. R., Chen, Y. E., Freeman, B. A., Ferreira, A. M., Schopfer, F. J., and Vitturi, D. A. (2018) *In situ* generation, metabolism and immunomodulatory signaling actions of nitro-conjugated linoleic acid in a murine model of inflammation. *Redox Biol.* **15**, 522–531 [CrossRef Medline](#)
60. Kelley, E. E., Batthyany, C. I., Hundley, N. J., Woodcock, S. R., Bonacci, G., Del Rio, J. M., Schopfer, F. J., Lancaster, J. R., Jr., Freeman, B. A., and

Nitro-fatty acids as SIRT6 activators

- Tarpey, M. M. (2008) Nitro-oleic acid, a novel and irreversible inhibitor of xanthine oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **283**, 36176–36184 [CrossRef Medline](#)
61. Bonacci, G., Schopfer, F. J., Batthyany, C. L., Rudolph, T. K., Rudolph, V., Khoo, N. K., Kelley, E. E., and Freeman, B. A. (2011) Electrophilic fatty acids regulate matrix metalloproteinase activity and expression. *J. Biol. Chem.* **286**, 16074–16081 [CrossRef Medline](#)
62. Santos, L., Escande, C., and Denicola, A. (2016) Potential modulation of sirtuins by oxidative stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 9831825 [CrossRef Medline](#)
63. Yang, J., Gupta, V., Carroll, K. S., and Liebler, D. C. (2014) Site-specific mapping and quantification of protein S-sulphenylation in cells. *Nat. Commun.* **5**, 4776 [CrossRef Medline](#)
64. Long, D., Wu, H., Tsang, A. W., Poole, L. B., Yoza, B. K., Wang, X., Vachharajani, V., Furdai, C. M., and McCall, C. E. (2017) The oxidative state of cysteine thiol 144 regulates the SIRT6 glucose homeostat. *Sci. Rep.* **7**, 11005 [CrossRef Medline](#)
65. Kalous, K. S., Wynia-Smith, S. L., Summers, S. B., and Smith, B. C. (2020) Human sirtuins are differentially sensitive to inhibition by nitro-saturating agents and other cysteine oxidants. *J. Biol. Chem.* **295**, 8524–8536 [CrossRef Medline](#)
66. Gamber, R. M., Mould, D. R., Chieffo, C., and Jorkasky, D. K. (2019) Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of oral CXA-10, a nitro fatty acid, after single and multiple ascending doses in healthy and obese subjects. *Clin. Transl. Sci.* **12**, 667–676 [CrossRef Medline](#)
67. Villacorta, L., Chang, L., Salvatore, S. R., Ichikawa, T., Zhang, J., Petrovic-Djergovic, D., Jia, L., Carlsen, H., Schopfer, F. J., Freeman, B. A., and Chen, Y. E. (2013) Electrophilic nitro-fatty acids inhibit vascular inflammation by disrupting LPS-dependent TLR4 signalling in lipid rafts. *Cardiovasc. Res.* **98**, 116–124 [CrossRef Medline](#)
68. Kelley, E. E., Baust, J., Bonacci, G., Golin-Bisello, F., Devlin, J. E., St Croix, C. M., Watkins, S. C., Gor, S., Cantu-Medellin, N., Weidert, E. R., Frisbee, J. C., Gladwin, M. T., Champion, H. C., Freeman, B. A., and Khoo, N. K. (2014) Fatty acid nitroalkenes ameliorate glucose intolerance and pulmonary hypertension in high-fat diet-induced obesity. *Cardiovasc. Res.* **101**, 352–363 [CrossRef Medline](#)
69. Khoo, N. K. H., Fazzari, M., Chartoumpekis, D. V., Li, L., Guimaraes, D. A., Arteel, G. E., Shiva, S., and Freeman, B. A. (2019) Electrophilic nitro-oleic acid reverses obesity-induced hepatic steatosis. *Redox Biol.* **22**, 101132 [CrossRef Medline](#)
70. Rom, O., Khoo, N. K. H., Chen, Y. E., and Villacorta, L. (2018) Inflammatory signaling and metabolic regulation by nitro-fatty acids. *Nitric Oxide* **78**, 140–145 [CrossRef](#)
71. Schopfer, F. J., Cole, M. P., Groeger, A. L., Chen, C. S., Khoo, N. K., Woodcock, S. R., Golin-Bisello, F., Motanya, U. N., Li, Y., Zhang, J., Garcia-Barrio, M. T., Rudolph, T. K., Rudolph, V., Bonacci, G., Baker, P. R., et al. (2010) Covalent peroxisome proliferator-activated receptor γ adduction by nitro-fatty acids: selective ligand activity and anti-diabetic signaling actions. *J. Biol. Chem.* **285**, 12321–12333 [CrossRef Medline](#)
72. Woodcock, S. R., Bonacci, G., Gelhaus, S. L., and Schopfer, F. J. (2013) Nitrated fatty acids: synthesis and measurement. *Free Radic. Biol. Med.* **59**, 14–26 [CrossRef Medline](#)
73. Woodcock, S. R., Salvatore, S. R., Bonacci, G., Schopfer, F. J., and Freeman, B. A. (2014) Biomimetic nitration of conjugated linoleic acid: formation and characterization of naturally occurring conjugated nitrodienes. *J. Org. Chem.* **79**, 25–33 [CrossRef Medline](#)
74. Ghislain, M., Talla, E., and Francois, J. M. (2002) Identification and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* nicotinamidase gene, *PNC1*. *Yeast* **19**, 215–224 [CrossRef Medline](#)
75. Hunt, J. B., Neece, S. H., and Ginsburg, A. (1985) The use of 4-(2-pyridylazo)resorcinol in studies of zinc release from *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. *Anal. Biochem.* **146**, 150–157 [CrossRef Medline](#)
76. Smith, B. C., Hallows, W. C., and Denu, J. M. (2009) A continuous microplate assay for sirtuins and nicotinamide-producing enzymes. *Anal. Biochem.* **394**, 101–109 [CrossRef Medline](#)
77. Turell, L., Vitturi, D. A., Coitinho, E. L., Lebrato, L., Möller, M. N., Sagasti, C., Salvatore, S. R., Woodcock, S. R., Alvarez, B., and Schopfer, F. J. (2017) The chemical basis of thiol addition to nitro-conjugated linoleic acid, a protective cell-signaling lipid. *J. Biol. Chem.* **292**, 1145–1159 [CrossRef Medline](#)
78. Escande, C., Chini, C. C., Nin, V., Dykhouse, K. M., Novak, C. M., Levine, J., van Deursen, J., Gores, G. J., Chen, J., Lou, Z., and Chini, E. N. (2010) Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity and contributes to high-fat diet-induced liver steatosis in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 545–558 [CrossRef Medline](#)
79. Colman, L., Caggiani, M., Leyva, A., Bresque, M., Liechowski, S., Maya-Monteiro, C. M., Mazal, D., Batthyany, C., Calliari, A., Contreras, P., and Escande, C. (2020) The protein deleted in breast cancer-1 (DBC1) regulates vascular response and formation of aortic dissection during angiotensin II infusion. *Sci. Rep.* **10**, 6772 [CrossRef Medline](#)
80. You, W., and Steegborn, C. (2018) Structural basis of sirtuin 6 inhibition by the hydroxamate trichostatin A: implications for protein deacetylase drug development. *J. Med. Chem.* **61**, 10922–10928 [CrossRef Medline](#)
81. You, W., Zheng, W., Weiss, S., Chua, K. F., and Steegborn, C. (2019) Structural basis for the activation and inhibition of Sirtuin 6 by quercetin and its derivatives. *Sci. Rep.* **9**, 19176 [CrossRef Medline](#)
82. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38 [CrossRef Medline](#)
83. Trott, O., and Olson, A. J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455–461 [CrossRef Medline](#)
84. Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., and Olson, A. J. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785–2791 [CrossRef Medline](#)

Discusión

Durante varios años predominó la idea del rol anti-inflamatorio de las Sirtuinas, apareciendo SIRT1 y SIRT6 como las Sirtuinas reguladoras de la cromatina, que, mediante sus arreglos sobre diferentes sustratos, lograban silenciar la expresión de genes pro-inflamatorios^{53,103,133}. El surgimiento de los primeros indicios que mostraron un rol pro-inflamatorio de SIRT6^{53,110,135}, junto con descubrimiento de la capacidad de esta Sirtuina de hidrolizar ácidos grasos de cadena larga¹¹⁵, cambiaron el foco de atención. A pesar de ello, estos primeros trabajos no lograron descifrar completamente el rol pro-inflamatorio de SIRT6. En este contexto surgieron las interrogantes planteadas en esta tesis, las cuales intentamos abordar ampliamente, yendo desde lo celular hacia lo sistémico.

El papel protagonista de SIRT6 en el manejo de la glucosa, a través del control de la expresión de genes de la glucólisis, fue inicialmente descubierto en el modelo SIRT6 KO genérico. De hecho, los ratones SIRT6 KO mueren de hipoglucemia a edades tempranas y esta muerte puede ser evitada mediante inyecciones de glucosa⁹⁵. Con el paso del tiempo y gracias al desarrollo de diferentes modelos tejido-específicos se fueron descubriendo y entendiendo algunas de las funciones de SIRT6 en varios órganos, lo cual ha generado nuevas interrogantes que tomamos en este trabajo. Nuestro modelo transgénico, único en su especificidad y control temporal, nos permitió poder enfocarnos en el rol pro-inflamatorio de la enzima en macrófagos *in vivo* y comprender cuán importante es considerar el “timing” para modular la actividad de SIRT6 en un contexto inflamatorio. Este concepto puede contribuir a potenciar el uso de inhibidores específicos de la enzima para algunos contextos críticos. En este sentido y quizás ceñido a otros contextos, este rol protagonista de la enzima subraya también la necesidad de contar con activadores de esta. En este camino hemos desarrollado el Capítulo II de la tesis, donde encontramos a los NO₂OA, como excelentes activadores de SIRT6¹¹⁴.

Comenzaremos ahora a discutir los diferentes resultados obtenidos, que surgieron en el marco de los objetivos específicos planteados al inicio del trabajo y que permitieron el desarrollo de este. Durante el primer objetivo, pudimos determinar, que en respuesta a LPS ocurre un rápido y sostenido incremento de SIRT6, común en intensidad, rango temporal y mecanismo molecular entre las líneas utilizadas. El desfase en los incrementos de expresión de SIRT6 a nivel proteico y del ARNm de *Sirt6*, nos llevaron a proponer una primera fase de respuesta rápida, que estaría dada por un incremento en la estabilidad de la proteína y la inhibición de su degradación proteasomal (**Fig.11-13**). En los modelos celulares utilizados en esta tesis, encontramos un tiempo de vida de SIRT6 mucho menor al reportado previamente, donde se postulaba una reducción del 50% de la proteína a las 72 horas en células HEK293¹²⁶. Nuestros resultados muestran una reducción del 50% de la proteína en

aproximadamente 6 horas de incubación con CHX (**Fig.11**), lo cual sugiere que en las células en que nosotros trabajamos y que además son capaces de responder a estímulos inflamatorios, existe un mecanismo alternativo al que opera en las HEK293 (que expresan bajos niveles de receptores de tipo TLR4). El cambio en la estabilidad de SIRT6 que surge como consecuencia de la incubación con LPS, podría ocurrir a causa de una modificación post-traducciona que aún no hemos logrado identificar. Sin embargo, creemos que podría formar parte de la cadena de señalización generada por la activación del receptor TLR4, que hemos profundizado en la sección introductoria de este trabajo. En este sentido y dado los resultados con MG132, la ubiquitinación parece ser una modificación bastante probable de ocurrir sobre SIRT6 y más en el contexto inflamatorio. Dos candidatos surgen de la literatura como los posibles mediadores de esta estabilización, el primero es una ubiquitin-ligasa 3, **CHIP o STUB1**, la cual se ha visto que es capaz de ubiquitinar a SIRT6 en una lisina alternativa (K170) a la ubiquitinación canónica, y mediante esta adición, prevenir su degradación por vía proteosoma¹²⁶. El segundo candidato es la peptidasa **USP10**, supresor tumoral, la cual mediante su interacción específica con SIRT6 quita los residuos de ubiquitina de la enzima, inhibiendo así su degradación¹²⁷. Estudios actualmente en marcha nos permitirán determinar si alguno de estos candidatos son los mediadores de la estabilización de SIRT6.

Acompañando la estabilización de la proteína, logramos ubicar por primera vez a SIRT6 directamente en el citoplasma celular, mediante fraccionamiento subcelular e IF (**Fig.14A-B**). Clásicamente la ubicación de la Sirtuina, así como el lugar donde realiza sus funciones era el núcleo, sin embargo, los trabajos que proponen el rol de SIRT6 en la des-miristoilación del TNF α también la ubican en el RE, a pesar de no demostrar su presencia de forma clara¹¹⁰. El hallazgo de SIRT6 en el citoplasma podría deberse a una translocación núcleo-citoplasma. Esto permitiría en parte explicar los incrementos sobre la acetilación de H3K56 a nivel nuclear, donde se podría suponer que el abandono del núcleo determina un aumento en la acetilación de sus sustratos nucleares (**Fig.15**). Sin embargo, no parece que la translocalización de SIRT6 sea lo que ocurre durante la respuesta inflamatoria aguda, ya que los incrementos de SIRT6 que se ven en el citoplasma también se observan en el núcleo. De hecho, mientras en el núcleo la intensidad sigue incrementándose con las horas de LPS (**Fig.14C**), el incremento a nivel citoplasmático parece ser un evento más corto en términos temporales (**Fig.14D**), destinado a facilitar la secreción de TNF α . Contradictoriamente, el coeficiente de colocalización de Manders aumenta su solapamiento hacia las 24 horas, pero esto puede deberse también a una retracción reticular, más que un incremento en el área de retículo ocupada por SIRT6 (**Fig.14H**).

Retomando la función nuclear clásica de SIRT6, en apoyo al incremento de la señal nuclear de SIRT6, que mencionamos recién, otros autores han propuesto un rol de esta Sirtuina en la fase anti-inflamatoria y resolutive de la respuesta inflamatoria y quizás en nuestros resultados estemos viendo el inicio de esta fase. A pesar de que no se ha señalado que para ejercer este rol la proteína deba incrementarse, si está

establecido que participa en los procesos de silenciado de la transcripción de genes, mediante la desacetilación sobre la H3K9, reprimiendo la expresión de genes inflamatorios regulados por NFkB¹⁰³ y c-Jun¹³³. En ese contexto, es lógico pensar que, en fases tempranas de la respuesta inflamatoria, aunque aumente su expresión, la actividad enzimática de SIRT6 sea inhibida, para que luego en etapas de resolución de la respuesta inflamatoria, su activación permita el silenciamiento de genes pro-inflamatorios. Los mecanismos involucrados en esta posible regulación nuclear deberían ser estudiados en el futuro. Datos preliminares que obtuvimos en nuestro trabajo de tesis, y que no presentamos, apuntaban a que el agregado exógeno de NAD⁺, sustrato de SIRT6, revertía la inhibición nuclear. Es posible que la disponibilidad de NAD⁺ nuclear sea un mecanismo vinculado a este fenómeno de inhibición temprana de SIRT6. En apoyo a esto, se ha propuesto que el pasaje de la fase temprana a la fase tardía de la respuesta inflamatoria requiere la producción de NAD⁺ y la activación de la SIRT6, para que ocurran los ajustes metabólicos necesarios de reducción de la fase de glucólisis que ocurre en la fase temprana de la respuesta inflamatoria¹⁵⁵.

Utilizando el inhibidor farmacológico específico de SIRT6¹⁴¹, verificamos que su actividad enzimática temprana es mayormente deacilasa sobre ácidos grasos de cadena larga, regulando la secreción de TNFα (**Fig.16D**). Cabe destacar que la menor secreción de TNFα no solo disminuye la señalización, sino que además contribuye a una menor activación. La producción de TNFα inducida por la estimulación de LPS es crucial para la señalización autocrina y la inducción de la segunda ronda activación de NFkB^{31,33,34}. De esta forma, SIRT6 no solo estaría regulando la magnitud de la respuesta inflamatoria en primer orden, sino que además regula la respuesta en sí, disminuyendo la segunda ronda de activación de NFkB.

Haciendo un breve paréntesis, antes de comenzar a analizar los resultados obtenidos en ratones, queremos mencionar que, así como SIRT6 es capaz de regular la respuesta inflamatoria modulando la secreción de TNFα, es posible que NFkB sea capaz de regular la síntesis de *Sirt6*. Esta afirmación se apoya en los resultados obtenidos del estudio de la expresión (mRNA y proteína) de SIRT6 en el modelo de senescencia con fenotipo secretor SASP inducida por RAS. En este modelo de senescencia p65/RelA cumple un rol fundamental en el establecimiento y mantenimiento del fenotipo pro-inflamatorio. De hecho, una población de p65/RelA se mantiene residente en el núcleo, promoviendo la expresión de genes pro-inflamatorios^{146,147,153}. En este modelo, observamos que los niveles del transcrito y la proteína SIRT6 se ven incrementados junto con citoquinas pro-inflamatorias (**Fig.20**). Basados en estos antecedentes y en nuestros resultados, analizamos el promotor de SIRT6, encontrando a NFkB como un posible factor de transcripción capaz de regular la síntesis de *Sirt6*. Este vínculo entre *Sirt6* y NFkB aún no ha sido documentado, aunque otros autores también señalan a SIRT6 como dentro de la cascada antiviral de macrófagos y posiblemente regulada por FT inmunoreguladores¹⁵⁴. Comprobamos esta predicción, mediante los análisis de las Chip-seq para p65/RelA, donde vimos un

enriquecimiento del factor sobre el promotor de la Sirtuina en respuesta a estímulos pro-inflamatorios, tanto en células humanas como de ratón (**Fig.21**). Si bien no continuamos con estos estudios, y sin duda nuestros hallazgos deben ser corroborados experimentalmente, consideramos que pueden ser por demás interesantes para comprender procesos vinculados a la inflamación crónica y envejecimiento. Las células senescentes con SASP no solo poseen actividad pro-inflamatoria prominente, sino que además muestran cambios metabólicos importantes en genes, muchos de los cuales son regulados por SIRT6¹⁵⁵. Comprender cabalmente el rol de SIRT6 durante la senescencia y el envejecimiento, es un tema por demás interesante y que será sin duda abordado en el futuro.

Retomando el rol pro-inflamatorio de SIRT6 durante la respuesta inflamatoria aguda, discutiremos a continuación los resultados obtenidos *in vivo*. Los datos obtenidos en los modelos celulares fueron analizados en la cavidad peritoneal, la cual provee un sitio accesible para obtener macrófagos residentes no manipulados así como macrófagos activados, derivados de la utilización de algún activador, como por ejemplo el LPS. Al igual que lo realizado *in vitro*, en este modelo *in vivo*, nos centramos en estímulos agudos (1-3 horas), coincidente con los tiempos de estabilización de la proteína. Cuando analizamos la población aislada del peritoneo por citometría de flujo, pudimos determinar un predominio de macrófagos CD11b⁺F4/80^{hi}, que engloba a los macrófagos residentes¹⁵⁹, tanto en condiciones control como en condiciones de activación. La cantidad de macrófagos SIRT6⁺, así como la cuantificación de la media geométrica de intensidad de fluorescencia de la población CD11b⁺F4/80^{hi} muestran mayores niveles de SIRT6 en respuesta a LPS, lo cual recapitula lo observado en los macrófagos en cultivo (**Fig.18**). Apoyando lo mencionado, en las IF realizadas del lavado, se pudo observar este incremento. Es importante destacar que, al igual que observamos con los macrófagos *in vitro*, también existe un aumento en la expresión de SIRT6 en el citoplasma de los macrófagos peritoneales, apoyando la hipótesis de que *in vivo*, también existe una estabilización rápida de SIRT6 en el citoplasma, con el objetivo de facilitar la rápida secreción de TNF α (**Fig.17F-H**). En concordancia con esto, la utilización del inhibidor farmacológico administrado en el peritoneo, el cual es bien tolerado por los ratones *in vivo*^{141,144}, ocasionó una disminución en la secreción de TNF α en respuesta a LPS, en comparación con los niveles que vemos en el peritoneo activado sin el inhibidor (**Fig.19A**). Esta disminución en la secreción de TNF α disminuirá la inflamación local de los macrófagos residentes, los cuales también al secretar menos TNF α generarán una menor infiltración del peritoneo en respuesta a un estímulo. De hecho, esto puede observarse mediante la menor secreción de IL6 (**Fig.19B**). No podemos descartar que la contribución a esta menor secreción de TNF α pueda también estar mediada por otras células presentes en el peritoneo. En respuesta a la inyección letal de LPS, cuando se administra previamente el inhibidor, vemos una disminución en la mortalidad (**Fig.19D**). Esta respuesta podría explicarse considerando que ocurre una disminución de la tormenta de citoquinas descontrolada característica del shock séptico, lo cual otorga tiempo adicional al organismo para poder resolver este último. De ser así, la inhibición temporal de SIRT6 en estos

contextos puede resultar sumamente útil para prevenir el shock séptico y eventualmente la muerte inducida por éste.

Continuamos con los análisis de inflamación crónica en modelo *in vivo* de obesidad inducida por dieta, donde estudiamos la grasa visceral de ratones sometidos a WD durante 10 semanas. Estos ratones incrementaron rápidamente su peso y presentaron algunos signos primarios de inflamación sistémica, registrados mediante hemograma, acompañados de hiperglucemia, alterada actividad de ALT y concentración de Creatinina (**Fig.22A-D**). En la FEV encontramos mayores niveles de *Sirt6* y de TNF α (**Fig.22F**). Cuando profundizamos en esta fracción, y analizamos diferentes sub-poblaciones mediante citometría de flujo, hallamos un incremento de la media geométrica de intensidad de fluorescencia de SIRT6 fruto de la dieta en la población definida por CD11b⁺F4/80⁺, la cual incluye principalmente macrófagos (**Fig.23**). Estos niveles incrementados de SIRT6 en macrófagos durante la obesidad e inflamación sistémica podrían favorecer la secreción de TNF α y colaborar con la inflamación local del tejido adiposo. Como se mencionó en la introducción, TNF α ha sido identificado como un mediador entre la inflamación, obesidad y la resistencia a la insulina, observándose grandes cantidades de TNF α en el tejido adiposo de animales obesos, lo cual promueve la resistencia a la insulina⁷¹⁻⁷³. En humanos, también se ha observado que los elevados niveles de TNF α se asocian con resistencia a insulina¹⁵⁷. Esto nos sugirió, que la inhibición temporal de la Sirtuina 6 en este contexto también podría ser beneficioso, a la hora de disminuir tanto la inflamación local del tejido adiposo, así como la inflamación estéril y de bajo ruido característica de la obesidad y que esto redunde un menor desarrollo de resistencia a insulina. Si bien nuestros ratones no fueron testeados para el desarrollo de resistencia a insulina, si detectamos un manejo alterado de la glucosa, que podría incidir, de caso de sostenerse en el tiempo la dieta WD, en el desarrollo de resistencia a insulina. El análisis de los tejidos metabólicos obtenidos de los animales analizados podría brindarnos más información acerca del estado metabólico de los mismos, lo cual nos permitirá comprender en detalle las causas de los efectos benéficos de la escisión de SIRT6 en una ventana temporal corta.

Dado el hecho de las múltiples funciones que presenta la Sirtuina 6 en el organismo, que ya fueron mencionadas en la introducción de este trabajo, así como los efectos deletéreos que presentó el modelo KO genérico de SIRT6⁹⁵, la administración del inhibidor específico de SIRT6, no constituía una buena ni novedosa aproximación. De hecho, apoyando nuestra hipótesis la administración de este compuesto durante 11 días, reduce la glucemia en ayuno de animales en dieta rica en grasas (HFD, *del inglés High Fat Diet*), sin embargo, también genera una menor ganancia de peso, lo cual dificulta la interpretación de los datos de glucemia¹⁴¹. Por todos estos motivos, para evaluar la inhibición de SIRT6 en la inflamación crónica, nos embarcamos en la generación de un modelo transgénico KO para SIRT6 en macrófagos. Este modelo efectivamente presentó macrófagos de médula ósea (**Fig.24**) así también a los macrófagos peritoneales SIRT6-KO (**Fig.25**).

La selección del modelo murino pasó principalmente por la elección del ratón que expresaba la iCre recombinasa en macrófagos bajo la expresión del receptor *Csf1R*. Este último se expresaría en aquellos macrófagos derivados del saco vitelino y de la médula ósea, por lo cual, según detallamos en la introducción incluiría a la gran mayoría de los macrófagos residentes de tejidos (excluyendo a las células de Kupffer y los macrófagos alveolares), microglía y los monocitos circulantes de la sangre^{43,44}. En este sentido, si bien era un modelo célula-específico, los efectos del silenciamiento del gen estarían distribuidos en varios órganos del organismo y en los monocitos circulantes. Otra ventaja que presenta nuestro modelo es la posibilidad de realizar la escisión del gen en el momento que deseamos, en respuesta a Tamoxifeno.

De esta forma, una vez generado y confirmado el modelo (**Fig. 24 y 25**) decidimos analizar el efecto de deletar SIRT6 en macrófagos de ratones obesos, donde el proceso inflamatorio crónico ya había comenzado a establecerse. Para ello inyectamos tamoxifeno a ratones con 8 semanas de dieta WD y estudiamos sus parámetros metabólicos e inflamatorios (**Fig. 27**) luego de dos semanas de tratamiento con tamoxifeno. El tratamiento con tamoxifeno generó una mejora en la glucemia de los ratones *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* comparados los controles (*Sirt6^{loxP/loxP};Cre-*), así como una menor inflamación sistémica (mediada por la cantidad de leucocitos en sangre) y los niveles de TNF α en el peritoneo. En este punto es importante resaltar que los niveles tanto de leucocitos en sangre como de glucemia basal en ayuno y TNF α en el peritoneo de ratones en ND eran normales e iguales tanto en *Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* como en su control *Sirt6^{loxP/loxP};Cre-* (**Fig. 25 y 26**), ambos tratados con tamoxifeno. Esto quiere decir que, en nuestro modelo, la delección de SIRT6 en macrófagos no causó efectos inflamatorios *per se*, ni repercutió en el manejo de la glucemia. El hecho de que la delección de SIRT6 en macrófagos de ratones obesos (*Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* tratados con tamoxifeno) haya protegido contra la hiperglucemia y tomando en cuenta la diferencia en los niveles de TNF α peritoneales, nos permiten aventurar de que efectivamente el noqueo de SIRT6 en macrófagos de ratones obesos ocasiona un bloqueo en la secreción de TNF α , y que esto termina repercutiendo directamente en el manejo sistémico de la glucosa. En concordancia con esto, datos previos han mostrado que tanto la neutralización de TNF α en ratones obesos, como ratones KO para TNF α muestran una mejor sensibilidad a la insulina bajo una dieta rica en grasas, al igual que lo que muestran nuestros resultados. Adicionalmente, el silenciamiento de SIRT6 en macrófagos de ratones obesos (*Sirt6^{loxP/loxP};Cre+* tratados con tamoxifeno) no solo repercutió la glucemia, sino que también mejoró los niveles de ALT y Creatinina en plasma (**Fig. 22 y 27**), marcadores de daño hepático y renal, respectivamente. Esto sugiere un efecto protector sistémico del silenciamiento de SIRT6 en macrófagos, aunque sin duda serán necesarios más estudios para determinar esto con profundidad. Además, debemos determinar la contribución de cada uno de los macrófagos residentes de tejido o de los monocitos, a los efectos observados.

Varios modelos tejido-específicos SIRT6 KO se han estudiado en combinación con dietas ricas en grasas, en particular, en un trabajo publicado en el 2017 por Lee *et al.*, realizan un modelo muy parecido al nuestro, usando el ratón LysM-Cre, también de la línea mieloide. A diferencia de nuestro modelo, este ratón presenta silenciado el gen de *Sirt6*, no solo en los macrófagos, sino que también los granulocitos que incluyen neutrófilos, basófilos y eosinófilos (<https://www.jax.org/strain/004781>). En contraposición con nuestros resultados, ellos no logran ver los efectos benéficos de la escisión de SIRT6. Por el contrario, los ratones SIRT6 KO en la línea mieloide son más sensibles a la dieta y desarrollan una mayor inflamación en tejido adiposo e hígado, además de presentar una mayor proporción de macrófagos de tipo M1 pro-inflamatorios¹⁵⁰. Sin embargo, a causa del modelo transgénico utilizado, no es posible descartar el posible involucramiento de otras células mieloides además de macrófagos en el fenotipo observado por estos investigadores. Además, es importante considerar que, incluso si fuesen los macrófagos los responsables del fenotipo de mayor intolerancia a la glucosa, en este modelo *Sirt6* fue escindido de forma constitutiva en la línea mieloide, por lo que otros efectos crónicos no ligados a la dieta deberían ser descartados. Nuestro modelo, si bien también tiene limitaciones (entre ellas que no conseguimos un silenciamiento completo de la proteína en macrófagos CD11b⁺F4/80⁺), es en principio más acertado con respecto a la pregunta que se deseaba responder. Quizás los efectos contrapuestos observados en ambos modelos nos sirvan como ejemplo para visualizar los efectos del silenciamiento de SIRT6 a largo plazo en la línea mieloide versus el silenciamiento temporalmente controlado. Es posible también que estudiar el efecto pro-inflamatorio de SIRT6 requiera de abordajes agudos, tanto farmacológicos como genéticos, y que en situaciones prolongadas en el tiempo termine siendo la función nuclear anti-inflamatoria la que termina preponderando. Esperamos en la brevedad poder sumar nuestro modelo y los resultados obtenidos de este trabajo al conjunto de artículos científicos que se han desarrollado en los últimos 10 años y han contribuido a la comprensión de la delicada relación entre SIRT6 y el metabolismo. Además, el poder contar con el modelo nos permitirá continuar probando diferentes protocolos de administración del Tamoxifeno que quizás nos permitan tener un porcentaje mayor de silenciamiento en nuestros macrófagos, lo cual puede redundar en mejores resultados.

En resumen, en este trabajo de tesis creemos haber contribuido a comprender con mayor cabalidad el rol de SIRT6 en la respuesta inflamatoria, tanto aguda como crónica. Estudiamos aspectos vinculados a su regulación temporal y espacial y su implicancia en la secreción de TNF α , tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, desarrollamos un modelo animal que permite estudiar de forma controlada la función de SIRT6 en macrófagos, obteniendo resultados que permiten comprender de mejor manera el rol de esta proteína durante la inflamación crónica y daño metabólico ocasionado por la obesidad. Finalmente, demostramos que SIRT6 es también modulada por ácidos grasos nitrados, compuestos ampliamente conocidos por su rol anti-inflamatorio. Cómo afectan estos compuestos SIRT6 *in vivo* y cuánto de su efecto anti-inflamatorio puede estar mediado por esta Sirtuina, resta por ser estudiado.

Conclusiones y perspectivas

Los conocimientos generados en esta tesis permiten contestar varias de las preguntas inicialmente planteadas, a continuación, detallaremos algunas de las conclusiones a las que llegamos:

- La participación de SIRT6 en la respuesta inflamatoria aguda involucra un aumento en su expresión.
- El aumento en la expresión de SIRT6 durante la respuesta inflamatoria se genera por una estabilización de esta y un cambio de su vida media que estaría regulado en células de respuesta inmune.
- Durante la respuesta inflamatoria, la proteína se acumula a nivel citoplasmático, específicamente en el RE, donde se encarga de regular la secreción de TNF α .
- Durante la estimulación con LPS, la actividad deacilasa de SIRT6 nuclear, medida por acetilación sobre H3K56, disminuye. Sin embargo, su actividad demiristoilasa citoplasmática aumenta, facilitando la secreción de TNF α .
- En macrófagos peritoneales estimulados *in vivo* SIRT6 se comporta de forma similar a lo que lo hace *in vitro*, participando también en la secreción de TNF α .
- La inhibición de la proteína en el contexto de shock séptico disminuye la mortalidad.
- En un modelo de inflamación crónica en cultivo, la proteína y el mensajero de SIRT6 se encuentran incrementados. Análisis *in silico* apuntan a que SIRT6 podría estar bajo el control transcripcional de NFkB, factor de transcripción clave en el establecimiento y mantenimiento del fenotipo pro-inflamatorio en este modelo. Esto podría tener implicancias también en fases tardías de la respuesta inflamatoria aguda, donde en ARNm de SIRT6 también aumenta, al menos en MEFs.
- En ratones obesos, con inflamación crónica sistémica e intolerancia a la glucosa, los macrófagos presentan mayor expresión de SIRT6.
- El silenciamiento de SIRT6 en macrófagos de ratones obesos disminuye la secreción de TNF α *in vivo* y disminuye la inflamación sistémica promovida por la obesidad.
- La disminución en la inflamación sistémica crónica fue acompañada de una mejora significativa de la hiperglucemia desencadenada por la obesidad, en la que TNF α juega un papel determinante.
- Esta mejora en la inflamación sistémica e hiperglucemia se correlacionó con una mejora de los daños hepáticos y renales, subrayando las implicancias de esta enzima en la regulación del daño crónico asociado a la obesidad.

Finalizada esta etapa del trabajo, del mismo han surgido varias líneas en las que nos gustaría profundizar, así como también nos han quedado varias preguntas sin contestar. A continuación, desarrollaremos algunas de ellas:

- Dada la estabilización de SIRT6 observada en cultivo, nos interesa identificar al mediador de los efectos del LPS sobre la enzima. Sería interesante identificar donde ocurre la modificación post-traducciona que genera la estabilización de la proteína. La identificación del mediador de los efectos del LPS nos brindaría un blanco molecular nuevo, para poder regular la actividad de SIRT6 y por ende la secreción de TNF α . Para poder ahondar en esta perspectiva, contamos con un plásmido con hSIRT6 para sobreexpresar en algún sistema celular que responda a estímulos pro-inflamatorios y además nos permita aislar SIRT6 modificada, para luego evaluarla mediante espectrometría de masas.
- Considerando la inhibición de la Sirtuina a nivel nuclear, sería bueno identificar cómo ocurre la misma, ¿está dada por la estabilización de SIRT6? ¿Se favorece su actividad de hidrólisis de ácidos grasos de cadena larga por sobre los grupos acetilos de las Histonas? El entendimiento de este cambio de actividad abrupto y modulable permitiría favorecer una situación u otra en función de diferentes requerimientos y necesidades.
- Determinar si la expresión de *Sirt6* es efectivamente regulada por NF κ B, como predijo nuestro análisis *in silico*. Esto podría tener importantes implicancias en el mantenimiento del fenotipo secretor y pro-inflamatorio de células senescentes y cambios metabólicos asociados al mismo. Para ello contamos con algunos inhibidores de NF κ B que podríamos implementar en cultivo con el fin de evaluar si esta regulación ocurre. Con la información que contamos hasta el momento, deberíamos considerar para nuestro diseño experimental que la primera etapa de la regulación quizás sea necesaria para que luego suceda la fase de regulación transcripcional.
- ¿En vista de la activación de la enzima en respuesta a NO₂OA, es posible activar la actividad desmiristoilasa de la enzima con NO₂OA? ¿Podemos emplear estos compuestos en los modelos inflamatorios que hemos utilizado y ver un efecto específico sobre SIRT6? Sería importante, además, determinar si los NO₂OA son capaces de regular la actividad de SIRT6 *in vivo*, especialmente si promueven la actividad anti-inflamatoria nuclear de la proteína. Esto podría agregar un nuevo blanco terapéutico a los efectos pleiotrópicos de los nitrolípidos.
- ¿Es posible mejorar e incluso evitar la inhibición de la mortalidad en el ensayo de sepsis? ¿Un tratamiento más prolongado y sostenido con el Inhibidor podría mejorar la respuesta de los ratones a la inyección de LPS? ¿Su combinación con otros inhibidores utilizados en sepsis es posible? Considerando los

resultados obtenidos, podríamos diseñar nuevos experimentos *in vivo* que nos permitan contestar estas preguntas, cambiando la frecuencia de administración del inhibidor y/o utilizando inhibidores adicionales.

- El efecto anti-inflamatorio y metabólicamente beneficioso generado en los ratones obesos *Sirt6*^{loxP/loxP};Cre+ tratados con tamoxifeno, es solo un fenómeno transitorio o se sostiene en el tiempo? ¿Qué sucedería si la administración de tamoxifeno en el modelo bajo WD se mantuviera por más tiempo, repetiríamos el fenotipo observado en el modelo animal diseñado por Lee *et al.*, 2017, opuesto al fenotipo presente en nuestro modelo? Para evaluar lo propuesto, contando con el modelo animal transgénico, se abren un abanico de posibilidades experimentales *in vivo* que se podrían explorar.
- ¿Cómo se encuentran en términos inflamatorios y funcionales los órganos metabólicos de los ratones *Sirt6*^{loxP/loxP};Cre+ sometidos a WD y tamoxifeno? Para esta parte contamos con el material obtenido del primer abordaje experimental *in vivo* que realizamos con los ratones y en los cuales podríamos estudiar marcadores de daño e inflamación.

Como es normal en ciencia, cada nuevo abordaje y cada resultado, genera más preguntas que serán necesarias responder. En este sentido, nuestro trabajo cumplió la regla previamente mencionada, resolviendo algunas interrogantes respecto al rol de SIRT6 en la inflamación y el metabolismo, dejando algunas herramientas que para contestarlas y generando nuevas preguntas que permitirán continuar esta línea de investigación del Laboratorio de Patologías del Metabolismo y el Envejecimiento del Institut Pasteur Montevideo.

Referencias Bibliográficas

1. Chaplin, David D. «Overview of the Immune Response». *The Journal of allergy and clinical immunology* 125, n.º 2 Suppl 2 (febrero de 2010): S3-23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>.
2. Rodríguez, Ramón M., Antonio López-Vázquez, y Carlos López-Larrea. «Immune Systems Evolution». En *Sensing in Nature*, editado por Carlos López-Larrea, 237-51. Advances in Experimental Medicine and Biology. New York, NY: Springer US, 2012. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1704-0_15.
3. Turvey, Stuart E., y David H. Broide. «Innate Immunity». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125, n.º 2 Suppl 2 (febrero de 2010): S24-32. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>.
4. Marshall, Jean S., Richard Warrington, Wade Watson, y Harold L. Kim. «An introduction to immunology and immunopathology». *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 14, n.º 2 (12 de septiembre de 2018): 49. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>.
5. Vivier, Eric, y Bernard Malissen. «Innate and Adaptive Immunity: Specificities and Signaling Hierarchies Revisited». *Nature Immunology* 6, n.º 1 (enero de 2005): 17-21. <https://doi.org/10.1038/ni1153>.
6. Bianchi, Marco E. «DAMPs, PAMPs and Alarmins: All We Need to Know about Danger». *Journal of Leukocyte Biology* 81, n.º 1 (enero de 2007): 1-5. <https://doi.org/10.1189/jlb.0306164>.
7. Joncker, Nathalie T., y David H. Raulet. «Regulation of NK Cell Responsiveness to Achieve Self-Tolerance and Maximal Responses to Diseased Target Cells». *Immunological Reviews* 224, n.º 1 (2008): 85-97. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00658.x>.
8. Abbas, Abul K., Andrew H. Lichtman, y Shiv Pillai. *Inmunología Celular y Molecular 8º Ed.* Octava., 2015. <https://www.edicionesjournal.com/Papel/9788490228944/Inmunología+Celular+y+Molecular+8º+Ed>.
9. El-Zayat, Salwa Refat, Hiba Sibaii, y Fathia A. Mannaa. «Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview». *Bulletin of the National Research Centre* 43, n.º 1 (12 de diciembre de 2019): 187. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0227-2>.
10. Anderson, K. V., G. Jürgens, y C. Nüsslein-Volhard. «Establishment of Dorsal-Ventral Polarity in the Drosophila Embryo: Genetic Studies on the Role of the Toll Gene Product». *Cell* 42, n.º 3 (octubre de 1985): 779-89. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90274-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90274-0).
11. Takeda, Kiyoshi, Tsuneyasu Kaisho, y Shizuo Akira. «Toll-like Receptors». *Annual Review of Immunology* 21 (2003): 335-76. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126>.

12. Kawai, Taro, y Shizuo Akira. «Signaling to NF-KappaB by Toll-like Receptors». *Trends in Molecular Medicine* 13, n.º 11 (noviembre de 2007): 460-69. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.09.002>.
13. Delneste, Yves, Céline Beauvillain, y Pascale Jeannin. «[Innate immunity: structure and function of TLRs]». *Medecine Sciences: M/S* 23, n.º 1 (enero de 2007): 67-73. <https://doi.org/10.1051/medsci/200723167>.
14. Zarembek, Kol A., y Paul J. Godowski. «Tissue Expression of Human Toll-like Receptors and Differential Regulation of Toll-like Receptor MRNAs in Leukocytes in Response to Microbes, Their Products, and Cytokines». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168, n.º 2 (15 de enero de 2002): 554-61. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.2.554>.
15. Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, et al. «Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene». *Science (New York, N.Y.)* 282, n.º 5396 (11 de diciembre de 1998): 2085-88. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2085>.
16. Qureshi, S. T., L. Larivière, G. Leveque, S. Clermont, K. J. Moore, P. Gros, y D. Malo. «Endotoxin-Tolerant Mice Have Mutations in Toll-like Receptor 4 (Tlr4)». *The Journal of Experimental Medicine* 189, n.º 4 (15 de febrero de 1999): 615-25. <https://doi.org/10.1084/jem.189.4.615>.
17. Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, y S. Akira. «Cutting Edge: Toll-like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162, n.º 7 (1 de abril de 1999): 3749-52.
18. Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Janeway, y R. A. Ezekowitz. «Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity». *Science (New York, N.Y.)* 284, n.º 5418 (21 de mayo de 1999): 1313-18. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1313>.
19. Kimoto, Masao, Kohei Nagasawa, y Kensuke Miyake. «Role of TLR4/MD-2 and RP105/MD-1 in Innate Recognition of Lipopolysaccharide». *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 35, n.º 9 (2003): 568-72. <https://doi.org/10.1080/00365540310015700>.
20. Guha, M., y N. Mackman. «LPS Induction of Gene Expression in Human Monocytes». *Cellular Signalling* 13, n.º 2 (febrero de 2001): 85-94. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(00\)00149-2](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(00)00149-2).
21. Kitchens, R. L. «Role of CD14 in Cellular Recognition of Bacterial Lipopolysaccharides». *Chemical Immunology* 74 (2000): 61-82. <https://doi.org/10.1159/000058750>.
22. Wright, S. D., R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch, y J. C. Mathison. «CD14, a Receptor for Complexes of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS Binding Protein». *Science (New York, N.Y.)* 249, n.º 4975 (21 de septiembre de 1990): 1431-33. <https://doi.org/10.1126/science.1698311>.

23. Takeda, Kiyoshi, y Shizuo Akira. «TLR Signaling Pathways». *Seminars in Immunology* 16, n.º 1 (febrero de 2004): 3-9. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2003.10.003>.
24. Kawai, Taro, y Shizuo Akira. «Signaling to NF-KappaB by Toll-like Receptors». *Trends in Molecular Medicine* 13, n.º 11 (noviembre de 2007): 460-69. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.09.002>.
25. Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, y S. Akira. «Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin». *Immunity* 11, n.º 1 (julio de 1999): 115-22. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80086-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80086-2).
26. Li, Shyun, Astrid Strelow, Elizabeth J. Fontana, y Holger Wesche. «IRAK-4: A novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, n.º 8 (16 de abril de 2002): 5567-72.
27. Arch, R. H., R. W. Gedrich, y C. B. Thompson. «Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factors (TRAFs)--a Family of Adapter Proteins That Regulates Life and Death». *Genes & Development* 12, n.º 18 (15 de septiembre de 1998): 2821-30. <https://doi.org/10.1101/gad.12.18.2821>.
28. Deng, L., C. Wang, E. Spencer, L. Yang, A. Braun, J. You, C. Slaughter, C. Pickart, y Z. J. Chen. «Activation of the IkappaB Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex and a Unique Polyubiquitin Chain». *Cell* 103, n.º 2 (13 de octubre de 2000): 351-61. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00126-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00126-4).
29. Rosadini, Charles V., y Jonathan C. Kagan. «Early innate immune responses to bacterial LPS». *Current opinion in immunology* 44 (febrero de 2017): 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.10.005>.
30. Smale, Stephen T. «Transcriptional Regulation in the Innate Immune System». *Current Opinion in Immunology* 24, n.º 1 (febrero de 2012): 51-57. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.12.008>.
31. Medzhitov, Ruslan, y Tiffany Horng. «Transcriptional Control of the Inflammatory Response». *Nature Reviews. Immunology* 9, n.º 10 (octubre de 2009): 692-703. <https://doi.org/10.1038/nri2634>.
32. Sen, R., y D. Baltimore. «Multiple Nuclear Factors Interact with the Immunoglobulin Enhancer Sequences». *Cell* 46, n.º 5 (29 de agosto de 1986): 705-16. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90346-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90346-6).
33. Hoffmann, Alexander, y David Baltimore. «Circuitry of Nuclear Factor KappaB Signaling». *Immunological Reviews* 210 (abril de 2006): 171-86. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00375.x>.
34. Liu, Ting, Lingyun Zhang, Donghyun Joo, y Shao-Cong Sun. «NF-KB Signaling in Inflammation». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2 (2017): 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.
35. Doyle, Sarah L., y Luke A. J. O'Neill. «Toll-like Receptors: From the Discovery of NFkappaB to New Insights into Transcriptional Regulations in Innate Immunity».

- Biochemical Pharmacology* 72, n.º 9 (30 de octubre de 2006): 1102-13.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.07.010>.
36. Schmitz, M. L., S. Bacher, y M. Kracht. «I Kappa B-Independent Control of NF-Kappa B Activity by Modulatory Phosphorylations». *Trends in Biochemical Sciences* 26, n.º 3 (marzo de 2001): 186-90. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)01753-9](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01753-9).
 37. Anrather, Josef, Gianfranco Racchumi, y Costantino Iadecola. «Cis-Acting Element-Specific Transcriptional Activity of Differentially Phosphorylated Nuclear Factor-KB*». *Journal of Biological Chemistry* 280, n.º 1 (7 de enero de 2005): 244-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409344200>.
 38. Hashimoto, Daigo, Jennifer Miller, y Miriam Merad. «Dendritic Cell and Macrophage Heterogeneity In Vivo». *Immunity* 35, n.º 3 (23 de septiembre de 2011): 323-35. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.09.007>.
 39. Gordon, Siamon, y Philip R. Taylor. «Monocyte and Macrophage Heterogeneity». *Nature Reviews. Immunology* 5, n.º 12 (diciembre de 2005): 953-64. <https://doi.org/10.1038/nri1733>.
 40. Theret, Marine, Remi Mounier, y Fabio Rossi. «The Origins and Non-Canonical Functions of Macrophages in Development and Regeneration». *Development (Cambridge, England)* 146, n.º 9 (2 de mayo de 2019): dev156000. <https://doi.org/10.1242/dev.156000>.
 41. Amit, Ido, Deborah R. Winter, y Steffen Jung. «The Role of the Local Environment and Epigenetics in Shaping Macrophage Identity and Their Effect on Tissue Homeostasis». *Nature Immunology* 17, n.º 1 (enero de 2016): 18-25. <https://doi.org/10.1038/ni.3325>.
 42. Perdiguero, Elisa Gomez, y Frederic Geissmann. «The Development and Maintenance of Resident Macrophages». *Nature Immunology* 17, n.º 1 (enero de 2016): 2-8. <https://doi.org/10.1038/ni.3341>.
 43. Zhang, Xia, Ricardo Goncalves, y David M. Mosser. «The Isolation and Characterization of Murine Macrophages». *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* CHAPTER (noviembre de 2008): Unit-14.1. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1401s83>.
 44. Epelman, Slava, Kory J. Lavine, y Gwendalyn J. Randolph. «Origin and Functions of Tissue Macrophages». *Immunity* 41, n.º 1 (17 de julio de 2014): 21-35. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.013>.
 45. Wynn, Thomas A., Ajay Chawla, y Jeffrey W. Pollard. «Macrophage Biology in Development, Homeostasis and Disease». *Nature* 496, n.º 7446 (25 de abril de 2013): 445-55. <https://doi.org/10.1038/nature12034>.
 46. Wajant, H., K. Pfizenmaier, y P. Scheurich. «Tumor Necrosis Factor Signaling». *Cell Death and Differentiation* 10, n.º 1 (enero de 2003): 45-65. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401189>.
 47. Zhou, Tong, John D. Mountz, y Robert P. Kimberly. «Immunobiology of Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily». *Immunologic Research* 26, n.º 1-3 (2002): 323-36. <https://doi.org/10.1385/IR:26:1-3:323>.

48. Zelová, Hana, y Jan Hošek. «TNF- α Signalling and Inflammation: Interactions between Old Acquaintances». *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]* 62, n.º 7 (julio de 2013): 641-51. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0633-0>.
49. Stow, Jennifer L., Pei Ching Low, Carolin Offenhäuser, y Daniele Sangermani. «Cytokine Secretion in Macrophages and Other Cells: Pathways and Mediators». *Immunobiology, Vesicular trafficking in immune cells*, 214, n.º 7 (1 de julio de 2009): 601-12. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.11.005>.
50. Murray, Rachael Zoe, y Jennifer Lea Stow. «Cytokine Secretion in Macrophages: SNAREs, Rabs, and Membrane Trafficking». *Frontiers in Immunology* 5 (2014): 538. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00538>.
51. Falvo, James V., Alla V. Tsytyskova, y Anne E. Goldfeld. «Transcriptional Control of the TNF Gene». *Current directions in autoimmunity* 11 (2010): 27-60. <https://doi.org/10.1159/000289196>.
52. Friedmann, Elena, Ehud Hauben, Kerstin Maylandt, Simone Schleegeer, Sarah Vreugde, Stefan F. Lichtenthaler, Peer-Hendrik Kuhn, Daniela Stauffer, Giorgio Rovelli, y Bruno Martoglio. «SPPL2a and SPPL2b Promote Intramembrane Proteolysis of TNF α in Activated Dendritic Cells to Trigger IL-12 Production». *Nature Cell Biology* 8, n.º 8 (agosto de 2006): 843-48. <https://doi.org/10.1038/ncb1440>.
53. Jiang, Hong, Xiaoyu Zhang, y Hening Lin. «Lysine Fatty Acylation Promotes Lysosomal Targeting of TNF- α ». *Scientific Reports* 6, n.º 1 (15 de abril de 2016): 24371. <https://doi.org/10.1038/srep24371>.
54. Varfolomeev, Eugene, y Domagoj Vucic. «Intracellular Regulation of TNF Activity in Health and Disease». *Cytokine* 101 (enero de 2018): 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.08.035>.
55. Kalliolias, George D., y Lionel B. Ivashkiv. «TNF Biology, Pathogenic Mechanisms and Emerging Therapeutic Strategies». *Nature Reviews Rheumatology* 12, n.º 1 (enero de 2016): 49-62. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.169>.
56. Taylor, P. C., A. M. Peters, E. Paleolog, P. T. Chapman, M. J. Elliott, R. McCloskey, M. Feldmann, y R. N. Maini. «Reduction of Chemokine Levels and Leukocyte Traffic to Joints by Tumor Necrosis Factor Alpha Blockade in Patients with Rheumatoid Arthritis». *Arthritis and Rheumatism* 43, n.º 1 (enero de 2000): 38-47. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200001\)43:1<38::AID-ANR6>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200001)43:1<38::AID-ANR6>3.0.CO;2-L).
57. Ohshima, S., Y. Saeki, T. Mima, M. Sasai, K. Nishioka, H. Ishida, M. Shimizu, M. Suemura, R. McCloskey, y T. Kishimoto. «Long-Term Follow-up of the Changes in Circulating Cytokines, Soluble Cytokine Receptors, and White Blood Cell Subset Counts in Patients with Rheumatoid Arthritis (RA) after Monoclonal Anti-TNF Alpha Antibody Therapy». *Journal of Clinical Immunology* 19, n.º 5 (septiembre de 1999): 305-13. <https://doi.org/10.1023/a:1020543625282>.

58. Werner, S. L. «Stimulus Specificity of Gene Expression Programs Determined by Temporal Control of IKK Activity». *Science* 309, n.º 5742 (16 de septiembre de 2005): 1857-61. <https://doi.org/10.1126/science.1113319>.
59. Abbas, Abul K., Andrew H. Lichtman, y Shiv Pillai. *Inmunología Celular y Molecular 8º Ed.* Octava., 2015. <https://www.edicionesjournal.com/Papel/9788490228944/Inmunología+Celular+y+Molecular+8º+Ed>.
60. Feghali, C. A., y T. M. Wright. «Cytokines in Acute and Chronic Inflammation». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 2 (1 de enero de 1997): d12-26. <https://doi.org/10.2741/a171>.
61. McNelis, Joanne C., y Jerrold M. Olefsky. «Macrophages, Immunity, and Metabolic Disease». *Immunity* 41, n.º 1 (17 de julio de 2014): 36-48. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.05.010>.
62. Ogden, Cynthia L., Margaret D. Carroll, Brian K. Kit, y Katherine M. Flegal. «Prevalence of Childhood and Adult Obesity in the United States, 2011-2012». *JAMA* 311, n.º 8 (26 de febrero de 2014): 806-14. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.732>.
63. «Obesidad y sobrepeso». Accedido 5 de agosto de 2021. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
64. Kaufmann, Ricardo, y Norma Pontet-Ubal. «The Challenge of Tackling the Obesity Economic Burden: The Case of Uruguay». *Emerald Open Research* 1 (17 de abril de 2019): 11. <https://doi.org/10.12688/emeraldopenres.12869.1>.
65. Senthilingam, Meera. «Covid-19 Has Made the Obesity Epidemic Worse, but Failed to Ignite Enough Action». *BMJ*, 4 de marzo de 2021, n411. <https://doi.org/10.1136/bmj.n411>.
66. Engl, Public Health. «Excess Weight Can Increase Risk of Serious Illness and Death from COVID-19». GOV.UK. Accedido 5 de agosto de 2021. <https://www.gov.uk/government/news/excess-weight-can-increase-risk-of-serious-illness-and-death-from-covid-19>.
67. Hotamisligil, G. S., P. Peraldi, A. Budavari, R. Ellis, M. F. White, y B. M. Spiegelman. «IRS-1-Mediated Inhibition of Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity in TNF-Alpha and Obesity-Induced Insulin Resistance». *Science (New York, N.Y.)* 271, n.º 5249 (2 de febrero de 1996): 665-68. <https://doi.org/10.1126/science.271.5249.665>.
68. Chawla, Ajay, Khoa D. Nguyen, y Y. P. Sharon Goh. «Macrophage-Mediated Inflammation in Metabolic Disease». *Nature Reviews. Immunology* 11, n.º 11 (10 de octubre de 2011): 738-49. <https://doi.org/10.1038/nri3071>.
69. Strissel, Katherine J., Zlatina Stancheva, Hideaki Miyoshi, James W. Perfield, Jason DeFuria, Zoe Jick, Andrew S. Greenberg, y Martin S. Obin. «Adipocyte Death, Adipose Tissue Remodeling, and Obesity Complications». *Diabetes* 56, n.º 12 (diciembre de 2007): 2910-18. <https://doi.org/10.2337/db07-0767>.
70. Weisberg, Stuart P., Daniel McCann, Manisha Desai, Michael Rosenbaum, Rudolph L. Leibel, y Anthony W. Ferrante. «Obesity Is Associated with Macrophage

- Accumulation in Adipose Tissue». *The Journal of Clinical Investigation* 112, n.º 12 (diciembre de 2003): 1796-1808. <https://doi.org/10.1172/JCI19246>.
71. Odegaard, Justin I., Roberto R. Ricardo-Gonzalez, Alex Red Eagle, Divya Vats, Christine R. Morel, Matthew H. Goforth, Vidya Subramanian, Lata Mukundan, Anthony W. Ferrante, y Ajay Chawla. «Alternative M2 Activation of Kupffer Cells by PPARdelta Ameliorates Obesity-Induced Insulin Resistance». *Cell Metabolism* 7, n.º 6 (junio de 2008): 496-507. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.04.003>.
 72. Olefsky, Jerrold M., y Christopher K. Glass. «Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance». *Annual Review of Physiology* 72 (2010): 219-46. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135846>.
 73. Lumeng, Carey N., Stephanie M. Deyoung, Jennifer L. Bodzin, y Alan R. Saltiel. «Increased Inflammatory Properties of Adipose Tissue Macrophages Recruited during Diet-Induced Obesity». *Diabetes* 56, n.º 1 (enero de 2007): 16-23. <https://doi.org/10.2337/db06-1076>.
 74. Gao, Zhanguo, Daniel Hwang, Fredly Bataille, Michael Lefevre, David York, Michael J. Quon, y Jianping Ye. «Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate 1 by Inhibitor Kappa B Kinase Complex». *The Journal of Biological Chemistry* 277, n.º 50 (13 de diciembre de 2002): 48115-21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209459200>.
 75. Emanuelli, B., P. Peraldi, C. Filloux, D. Sawka-Verhelle, D. Hilton, y E. Van Obberghen. «SOCS-3 Is an Insulin-Induced Negative Regulator of Insulin Signaling». *The Journal of Biological Chemistry* 275, n.º 21 (26 de mayo de 2000): 15985-91. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.21.15985>.
 76. Chen, C. Y., R. Gherzi, J. S. Andersen, G. Gaietta, K. Jürchott, H. D. Royer, M. Mann, y M. Karin. «Nucleolin and YB-1 Are Required for JNK-Mediated Interleukin-2 mRNA Stabilization during T-Cell Activation». *Genes & Development* 14, n.º 10 (15 de mayo de 2000): 1236-48.
 77. Chen, Airu, Sheena Mumick, Chunsheng Zhang, John Lamb, Hongyue Dai, Drew Weingarh, John Mudgett, et al. «Diet Induction of Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Its Impact on Obesity». *Obesity Research* 13, n.º 8 (agosto de 2005): 1311-20. <https://doi.org/10.1038/oby.2005.159>.
 78. Chen, Lei, Yu Feng, Yinqiu Zhou, Weiliang Zhu, Xu Shen, Kaixian Chen, Hualiang Jiang, y Dongxiang Liu. «Dual Role of Zn²⁺ in Maintaining Structural Integrity and Suppressing Deacetylase Activity of SIRT1». *Journal of Inorganic Biochemistry* 104, n.º 2 (febrero de 2010): 180-85. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.10.021>.
 79. Shore, D., M. Squire, y K. A. Nasmyth. «Characterization of Two Genes Required for the Position-Effect Control of Yeast Mating-Type Genes». *The EMBO Journal* 3, n.º 12 (1 de diciembre de 1984): 2817-23.
 80. Choi, Jee-Eun, y Raul Mostoslavsky. «Sirtuins, Metabolism, and DNA repair». *Current opinion in genetics & development* 0 (junio de 2014): 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2014.05.005>.

81. Hall, Jessica A., John E. Dominy, Yoonjin Lee, y Pere Puigserver. «The Sirtuin Family's Role in Aging and Age-Associated Pathologies». *The Journal of Clinical Investigation* 123, n.º 3 (1 de marzo de 2013): 973-79. <https://doi.org/10.1172/JCI64094>.
82. Satoh, Akiko, Liana Stein, y Shin Imai. «The Role of Mammalian Sirtuins in the Regulation of Metabolism, Aging, and Longevity». *Handbook of experimental pharmacology* 206 (2011): 125-62. https://doi.org/10.1007/978-3-642-21631-2_7.
83. Haigis, Marcia C., y David A. Sinclair. «Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance». *Annual review of pathology* 5 (2010): 253-95. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092250>.
84. Favero, Gaia, Lorenzo Franceschetti, Luigi Fabrizio Rodella, y Rita Rezzani. «Sirtuins, aging, and cardiovascular risks». *Age* 37, n.º 4 (agosto de 2015): 65. <https://doi.org/10.1007/s11357-015-9804-y>.
85. Finkel, Toren, Chu-Xia Deng, y Raul Mostoslavsky. «Recent Progress in the Biology and Physiology of Sirtuins». *Nature* 460, n.º 7255 (30 de julio de 2009): 587-91. <https://doi.org/10.1038/nature08197>.
86. Iwahara, Toshinori, Roberto Bonasio, Varun Narendra, y Danny Reinberg. «SIRT3 Functions in the Nucleus in the Control of Stress-Related Gene Expression». *Molecular and Cellular Biology* 32, n.º 24 (diciembre de 2012): 5022-34. <https://doi.org/10.1128/MCB.00822-12>.
87. Scher, Michael B., Alejandro Vaquero, y Danny Reinberg. «SirT3 Is a Nuclear NAD⁺-Dependent Histone Deacetylase That Translocates to the Mitochondria upon Cellular Stress». *Genes & Development* 21, n.º 8 (15 de abril de 2007): 920-28. <https://doi.org/10.1101/gad.1527307>.
88. Anderson, Kristin A., Frank K. Huynh, Kelsey Fisher-Wellman, J. Darren Stuart, Brett S. Peterson, Jonathan D. Douros, Gregory R. Wagner, et al. «SIRT4 Is a Lysine Deacylase That Controls Leucine Metabolism and Insulin Secretion». *Cell Metabolism* 25, n.º 4 (4 de abril de 2017): 838-855.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.003>.
89. Ahuja, Nidhi, Bjoern Schwer, Stefania Carobbio, David Waltregny, Brian J. North, Vincenzo Castronovo, Pierre Maechler, y Eric Verdin. «Regulation of Insulin Secretion by SIRT4, a Mitochondrial ADP-Ribosyltransferase». *The Journal of Biological Chemistry* 282, n.º 46 (16 de noviembre de 2007): 33583-92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705488200>.
90. Ford, Ethan, Renate Voit, Gregory Liszt, Cornelia Magin, Ingrid Grummt, y Leonard Guarente. «Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription». *Genes & Development* 20, n.º 9 (1 de mayo de 2006): 1075-80. <https://doi.org/10.1101/gad.1399706>.
91. Barber, Matthew F., Eriko Michishita-Kioi, Yuanxin Xi, Luisa Tasselli, Mitomu Kioi, Zarmik Moqtaderi, Ruth I. Tennen, et al. «SIRT7 Links H3K18 Deacetylation to Maintenance of Oncogenic Transformation». *Nature* 487, n.º 7405 (5 de julio de 2012): 114-18. <https://doi.org/10.1038/nature11043>.

92. Chang, Andrew R., Christina M. Ferrer, y Raul Mostoslavsky. «SIRT6, a Mammalian Deacetylase with Multitasking Abilities». *Physiological Reviews* 100, n.º 1 (1 de enero de 2020): 145-69. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2018>.
93. Kanfi, Yariv, Shoshana Naiman, Gail Amir, Victoria Peshti, Guy Zinman, Liat Nahum, Ziv Bar-Joseph, y Haim Y. Cohen. «The Sirtuin SIRT6 Regulates Lifespan in Male Mice». *Nature* 483, n.º 7388 (22 de febrero de 2012): 218-21. <https://doi.org/10.1038/nature10815>.
94. Kanfi, Yariv, Victoria Peshti, Reuven Gil, Shoshana Naiman, Liat Nahum, Eran Levin, Noga Kronfeld-Schor, y Haim Y. Cohen. «SIRT6 Protects against Pathological Damage Caused by Diet-Induced Obesity». *Aging Cell* 9, n.º 2 (abril de 2010): 162-73. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00544.x>.
95. Mostoslavsky, Raul, Katrin F. Chua, David B. Lombard, Wendy W. Pang, Miriam R. Fischer, Lionel Gellon, Pingfang Liu, et al. «Genomic Instability and Aging-like Phenotype in the Absence of Mammalian SIRT6». *Cell* 124, n.º 2 (27 de enero de 2006): 315-29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.044>.
96. Tennen, Ruth I., Elisabeth Berber, y Katrin F. Chua. «Functional Dissection of SIRT6: Identification of Domains That Regulate Histone Deacetylase Activity and Chromatin Localization». *Mechanisms of Ageing and Development* 131, n.º 3 (marzo de 2010): 185-92. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2010.01.006>.
97. Liszt, Gregory, Ethan Ford, Martin Kurtev, y Leonard Guarente. «Mouse Sir2 Homolog SIRT6 Is a Nuclear ADP-Ribosyltransferase». *The Journal of Biological Chemistry* 280, n.º 22 (3 de junio de 2005): 21313-20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413296200>.
98. Mao, Zhiyong, Christopher Hine, Xiao Tian, Michael Van Meter, Matthew Au, Amita Vaidya, Andrei Seluanov, y Vera Gorbunova. «SIRT6 Promotes DNA Repair under Stress by Activating PARP1». *Science (New York, N.Y.)* 332, n.º 6036 (17 de junio de 2011): 1443-46. <https://doi.org/10.1126/science.1202723>.
99. Van Meter, Michael, Zhiyong Mao, Vera Gorbunova, y Andrei Seluanov. «Repairing Split Ends: SIRT6, Mono-ADP Ribosylation and DNA Repair». *Aging* 3, n.º 9 (septiembre de 2011): 829-35. <https://doi.org/10.18632/aging.100389>.
100. Michishita, Eriko, Ronald A. McCord, Elisabeth Berber, Mitomu Kioi, Hesed Padilla-Nash, Mara Damian, Peggie Cheung, et al. «SIRT6 Is a Histone H3 Lysine 9 Deacetylase That Modulates Telomeric Chromatin». *Nature* 452, n.º 7186 (27 de marzo de 2008): 492-96. <https://doi.org/10.1038/nature06736>.
101. Chen, Chin-Chuan, Joshua J. Carson, Jason Feser, Beth Tamburini, Susan Zabaronick, Jeffrey Linger, y Jessica K. Tyler. «Acetylated Lysine 56 on Histone H3 Drives Chromatin Assembly after Repair and Signals for the Completion of Repair». *Cell* 134, n.º 2 (25 de julio de 2008): 231-43. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.035>.
102. Kugel, Sita, y Raul Mostoslavsky. «Chromatin and beyond: The Multitasking Roles for SIRT6». *Trends in Biochemical Sciences* 39, n.º 2 (febrero de 2014): 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.12.002>.

103. Kawahara, Tiara L. A., Eriko Michishita, Adam S. Adler, Mara Damian, Elisabeth Berber, Meihong Lin, Ron A. McCord, et al. «SIRT6 Links Histone H3 Lysine 9 Deacetylation to NF-KappaB-Dependent Gene Expression and Organismal Life Span». *Cell* 136, n.º 1 (9 de enero de 2009): 62-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.052>.
104. Zhong, Lei, Agustina D'Urso, Debra Toiber, Carlos Sebastian, Ryan E. Henry, Douangsone D. Vadysirisack, Alexander Guimaraes, et al. «The Histone Deacetylase Sirt6 Regulates Glucose Homeostasis via Hif1alpha». *Cell* 140, n.º 2 (22 de enero de 2010): 280-93. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.041>.
105. Sebastián, Carlos, Bernadette M. M. Zwaans, Dafne M. Silberman, Melissa Gymrek, Alon Goren, Lei Zhong, Oren Ram, et al. «The Histone Deacetylase SIRT6 Is a Tumor Suppressor That Controls Cancer Metabolism». *Cell* 151, n.º 6 (7 de diciembre de 2012): 1185-99. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.047>.
106. Tasselli, Luisa, Yuanxin Xi, Wei Zheng, Ruth I. Tennen, Zaneta Odrowaz, Federica Simeoni, Wei Li, y Katrin F. Chua. «SIRT6 Deacetylates H3K18ac at Pericentric Chromatin to Prevent Mitotic Errors and Cellular Senescence». *Nature Structural & Molecular Biology* 23, n.º 5 (mayo de 2016): 434-40. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3202>.
107. Dominy, John E., Yoonjin Lee, Mark P. Jedrychowski, Helen Chim, Michael J. Jurczak, Joao Paulo Camporez, Hai-Bin Ruan, et al. «The Deacetylase Sirt6 Activates the Acetyltransferase GCN5 and Suppresses Hepatic Gluconeogenesis». *Molecular Cell* 48, n.º 6 (28 de diciembre de 2012): 900-913. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.030>.
108. Bhardwaj, Abhishek, y Sanjeev Das. «SIRT6 Deacetylates PKM2 to Suppress Its Nuclear Localization and Oncogenic Functions». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, n.º 5 (2 de febrero de 2016): E538-547. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520045113>.
109. Pan, Patricia W., Jessica L. Feldman, Mark K. Devries, Aiping Dong, Aled M. Edwards, y John M. Denu. «Structure and Biochemical Functions of SIRT6». *The Journal of Biological Chemistry* 286, n.º 16 (22 de abril de 2011): 14575-87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.218990>.
110. Jiang, Hong, Saba Khan, Yi Wang, Guillaume Charron, Bin He, Carlos Sebastian, Jintang Du, et al. «SIRT6 Regulates TNF- α Secretion through Hydrolysis of Long-Chain Fatty Acyl Lysine». *Nature* 496, n.º 7443 (4 de abril de 2013): 110-13. <https://doi.org/10.1038/nature12038>.
111. Zhang, Xiaoyu, Saba Khan, Hong Jiang, Marc A. Antonyak, Xiao Chen, Nicole A. Spiegelman, Jonathan H. Shrimp, Richard A. Cerione, y Hening Lin. «Identifying the functional contribution of the defatty-acylase activity of SIRT6». *Nature chemical biology* 12, n.º 8 (agosto de 2016): 614-20. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2106>.

112. Zhang, Xiaoyu, Nicole A Spiegelman, Ornella D Nelson, Hui Jing, y Hening Lin. «SIRT6 Regulates Ras-Related Protein R-Ras2 by Lysine Defatty-Acylation». *ELife* 6 (13 de abril de 2017): e25158. <https://doi.org/10.7554/eLife.25158>.
113. Wang, Wesley Wei, Yu Zeng, Bo Wu, Alexander Deiters, y Wenshe R. Liu. «A Chemical Biology Approach to Reveal Sirt6-targeted Histone H3 Sites in Nucleosomes». *ACS chemical biology* 11, n.º 7 (15 de julio de 2016): 1973-81. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00243>.
114. Carreño, Mara, Mariana Bresque, Matías R. Machado, Leonardo Santos, Rosario Durán, Darío A. Vitturi, Carlos Escande, y Ana Denicola. «Nitro-Fatty Acids as Activators of HSIRT6 Deacetylase Activity». *The Journal of Biological Chemistry* 295, n.º 52 (25 de diciembre de 2020): 18355-66. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014883>.
115. Feldman, Jessica L., Josue Baeza, y John M. Denu. «Activation of the Protein Deacetylase SIRT6 by Long-Chain Fatty Acids and Widespread Deacylation by Mammalian Sirtuins». *The Journal of Biological Chemistry* 288, n.º 43 (25 de octubre de 2013): 31350-56. <https://doi.org/10.1074/jbc.C113.511261>.
116. Gil, Reuven, Shaul Barth, Yariv Kanfi, y Haim Y. Cohen. «SIRT6 Exhibits Nucleosome-Dependent Deacetylase Activity». *Nucleic Acids Research* 41, n.º 18 (octubre de 2013): 8537-45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt642>.
117. Cai, J., Y. Zuo, T. Wang, Y. Cao, R. Cai, F.-L. Chen, J. Cheng, y J. Mu. «A Crucial Role of SUMOylation in Modulating Sirt6 Deacetylation of H3 at Lysine 56 and Its Tumor Suppressive Activity». *Oncogene* 35, n.º 37 (15 de septiembre de 2016): 4949-56. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.24>.
118. Min, Lihua, Yuan Ji, Latifa Bakiri, Zhixin Qiu, Jin Cen, Xiaotao Chen, Lingli Chen, et al. «Liver cancer initiation is controlled by AP-1 through SIRT6-dependent inhibition of survivin». *Nature cell biology* 15 (7 de octubre de 2012). <https://doi.org/10.1038/ncb2590>.
119. Wencel, Przemysław L., Walter J. Lukiw, Joanna B. Strosznajder, y Robert Piotr Strosznajder. «Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Enhances Gene Expression of Selected Sirtuins and APP Cleaving Enzymes in Amyloid Beta Cytotoxicity». *Molecular Neurobiology* 55, n.º 6 (junio de 2018): 4612-23. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0646-8>.
120. Wu, Minghui, Edward Seto, y Jingsong Zhang. «E2F1 enhances glycolysis through suppressing Sirt6 transcription in cancer cells». *Oncotarget* 6, n.º 13 (14 de marzo de 2015): 11252-63.
121. Yu, Jingwen, Yanqing Wu, y Peixin Yang. «High glucose-induced oxidative stress represses sirtuin deacetylase expression and increases histone acetylation leading to neural tube defects». *Journal of neurochemistry* 137, n.º 3 (mayo de 2016): 371-83. <https://doi.org/10.1111/jnc.13587>.
122. Baker, J. R., C. Vuppusetty, T. Colley, Andriana I. Papaioannou, P. Fenwick, Louise Donnelly, K. Ito, y P. J. Barnes. «Oxidative Stress Dependent MicroRNA-34a

- Activation via PI3K α Reduces the Expression of Sirtuin-1 and Sirtuin-6 in Epithelial Cells». *Scientific Reports* 6, n.º 1 (21 de octubre de 2016): 35871. <https://doi.org/10.1038/srep35871>.
123. Lefort, Karine, Yang Brooks, Paola Ostano, Muriel Cario-André, Valérie Calpini, Juan Guinea-Viniegra, Andrea Albinger-Hegyí, et al. «A miR-34a-SIRT6 axis in the squamous cell differentiation network». *The EMBO Journal* 32, n.º 16 (14 de agosto de 2013): 2248-63. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.156>.
 124. Elhanati, Sivan, Rotem Ben-Hamo, Yariv Kanfi, Alexander Varvak, Renana Glazz, Batia Lerrer, Sol Efroni, y Haim Y. Cohen. «Reciprocal Regulation between SIRT6 and MiR-122 Controls Liver Metabolism and Predicts Hepatocarcinoma Prognosis». *Cell Reports* 14, n.º 2 (12 de enero de 2016): 234-42. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.023>.
 125. Thirumurthi, Umadevi, Jia Shen, Weiya Xia, Adam M. LaBaff, Yongkun Wei, Chia-Wei Li, Wei-Chao Chang, et al. «MDM2-Mediated Degradation of SIRT6 Phosphorylated by AKT1 Promotes Tumorigenesis and Trastuzumab Resistance in Breast Cancer». *Science Signaling* 7, n.º 336 (29 de julio de 2014): ra71. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005076>.
 126. Ronnebaum, Sarah M., Yaxu Wu, Holly McDonough, y Cam Patterson. «The Ubiquitin Ligase CHIP Prevents SirT6 Degradation through Noncanonical Ubiquitination». *Molecular and Cellular Biology* 33, n.º 22 (noviembre de 2013): 4461-72. <https://doi.org/10.1128/MCB.00480-13>.
 127. Lin, Zhenghong, Heeyoung Yang, Can Tan, Jinping Li, Zhaojian Liu, Qiu Quan, Sinyi Kong, Junsheng Ye, Beixue Gao, y Deyu Fang. «USP10 Antagonizes C-Myc Transcriptional Activation through SIRT6 Stabilization to Suppress Tumor Formation». *Cell Reports* 5, n.º 6 (26 de diciembre de 2013): 1639-49. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.11.029>.
 128. Kanfi, Yariv, Ronnie Shalman, Victoria Peshti, Shmuel N. Pilosof, Yosi M. Gozlan, Kevin J. Pearson, Batya Lerrer, et al. «Regulation of SIRT6 Protein Levels by Nutrient Availability». *FEBS Letters* 582, n.º 5 (5 de marzo de 2008): 543-48. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.01.019>.
 129. Kim, Hyun-Seok, Cuiying Xiao, Rui-Hong Wang, Tyler Lahusen, Xiaoling Xu, Athanassios Vassilopoulos, Guelaguetza Vazquez-Ortiz, et al. «Hepatic-Specific Disruption of SIRT6 in Mice Results in Fatty Liver Formation Due to Enhanced Glycolysis and Triglyceride Synthesis». *Cell Metabolism* 12, n.º 3 (8 de septiembre de 2010): 224-36. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.06.009>.
 130. Ciccia, Alberto, y Stephen J. Elledge. «The DNA Damage Response: Making it safe to play with knives». *Molecular cell* 40, n.º 2 (22 de octubre de 2010): 179-204. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>.
 131. McCord, Ronald A., Eriko Michishita, Tao Hong, Elisabeth Berber, Lisa D. Boxer, Rika Kusumoto, Shenheng Guan, et al. «SIRT6 Stabilizes DNA-Dependent

- Protein Kinase at Chromatin for DNA Double-Strand Break Repair». *Aging* 1, n.º 1 (15 de enero de 2009): 109-21. <https://doi.org/10.18632/aging.100011>.
132. Baur, J. A., Y. Zou, J. W. Shay, y W. E. Wright. «Telomere Position Effect in Human Cells». *Science (New York, N.Y.)* 292, n.º 5524 (15 de junio de 2001): 2075-77. <https://doi.org/10.1126/science.1062329>.
 133. Xiao, Cuiying, Rui-Hong Wang, Tyler J. Lahusen, Ogyi Park, Adeline Bertola, Takashi Maruyama, Della Reynolds, et al. «Progression of Chronic Liver Inflammation and Fibrosis Driven by Activation of C-JUN Signaling in Sirt6 Mutant Mice». *The Journal of Biological Chemistry* 287, n.º 50 (7 de diciembre de 2012): 41903-13. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.415182>.
 134. Yeung, Fan, Jamie E Hoberg, Catherine S Ramsey, Michael D Keller, David R Jones, Roy A Frye, y Marty W Mayo. «Modulation of NF-κB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase». *The EMBO Journal* 23, n.º 12 (16 de junio de 2004): 2369-80. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600244>.
 135. Van Gool, Frédéric, Mara Gallí, Cyril Gueydan, Véronique Kruys, Pierre-Paul Prevot, Antonio Bedalov, Raul Mostoslavsky, Frederick W. Alt, Thibaut De Smedt, y Oberdan Leo. «Intracellular NAD Levels Regulate Tumor Necrosis Factor Protein Synthesis in a Sirtuin-Dependent Manner». *Nature Medicine* 15, n.º 2 (febrero de 2009): 206-10. <https://doi.org/10.1038/nm.1906>.
 136. Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Sebastian C, Henry RE, Vadysirisack DD, Guimaraes A, Marinelli B, Wikstrom JD, Nir T, Clish CB, Vaitheesvaran B, Iliopoulos O, Kurland I, Dor Y, Weissleder R, Shrihari OS, Ellisen LW, Espinosa JM, Mostoslavsky R. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha. *Cell* 140, n.º 2 (22 de enero de 2010): 280-93. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.041>.
 137. Xiong, Xiwen, Xupeng Sun, Qingzhi Wang, Xinlai Qian, Yang Zhang, Xiaoyan Pan, y X. Charlie Dong. «SIRT6 Protects against Palmitate-Induced Pancreatic β-Cell Dysfunction and Apoptosis». *The Journal of Endocrinology* 231, n.º 2 (noviembre de 2016): 159-65. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0317>.
 138. Ka, Sun-O., In Hyuk Bang, Eun Ju Bae, y Byung-Hyun Park. «Hepatocyte-Specific Sirtuin 6 Deletion Predisposes to Nonalcoholic Steatohepatitis by up-Regulation of Bach1, an Nrf2 Repressor». *The FASEB Journal* 31, n.º 9 (2017): 3999-4010. <https://doi.org/10.1096/fj.201700098RR>.
 139. Kuang, Jiangying, Yuwei Zhang, Qinhui Liu, Jing Shen, Shiyun Pu, Shihai Cheng, Lei Chen, et al. «Fat-Specific Sirt6 Ablation Sensitizes Mice to High-Fat Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance by Inhibiting Lipolysis». *Diabetes* 66, n.º 5 (mayo de 2017): 1159-71. <https://doi.org/10.2337/db16-1225>.
 140. Xu, Jianming. «Preparation, Culture, and Immortalization of Mouse Embryonic Fibroblasts». *Current Protocols in Molecular Biology* 70, n.º 1 (2005): 28.1.1-28.1.8. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2801s70>.

141. Sociali, Giovanna, Mirko Magnone, Silvia Ravera, Patrizia Damonte, Tiziana Vigliarolo, Maria Von Holtey, Valerio G. Vellone, et al. «Pharmacological Sirt6 Inhibition Improves Glucose Tolerance in a Type 2 Diabetes Mouse Model». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 31, n.º 7 (julio de 2017): 3138-49. <https://doi.org/10.1096/fj.201601294R>.
142. Farré, Domènec, Romà Roset, Mario Huerta, José E. Adsuara, Llorenç Roselló, M. Mar Albà, y Xavier Messeguer. «Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN». *Nucleic Acids Research* 31, n.º 13 (1 de julio de 2003): 3651-53. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq605>.
143. Matys, V., O. V. Kel-Margoulis, E. Fricke, I. Liebich, S. Land, A. Barre-Dirrie, I. Reuter, et al. «TRANSFAC® and its module TRANSCompel®: transcriptional gene regulation in eukaryotes». *Nucleic Acids Research* 34, n.º Database issue (1 de enero de 2006): D108-10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj143>.
144. Parenti, Marco Daniele, Alessia Grozio, Inga Bauer, Lauretta Galeno, Patrizia Damonte, Enrico Millo, Giovanna Sociali, et al. «Discovery of Novel and Selective SIRT6 Inhibitors». *Journal of Medicinal Chemistry* 57, n.º 11 (12 de junio de 2014): 4796-4804. <https://doi.org/10.1021/jm500487d>.
145. Korneev, K. V. «Mouse Models of Sepsis and Septic Shock». *Molecular Biology* 53, n.º 5 (1 de septiembre de 2019): 704-17. <https://doi.org/10.1134/S0026893319050108>.
146. Lopes-Paciencia, Stéphane, Emmanuelle Saint-Germain, Marie-Camille Rowell, Ana Fernández Ruiz, Paloma Kalegari, y Gerardo Ferbeyre. «The Senescence-Associated Secretory Phenotype and Its Regulation». *Cytokine* 117 (mayo de 2019): 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.01.013>.
147. Martínez, Jennyfer, Doménica Tarallo, Laura Martínez-Palma, Sabina Victoria, Mariana Bresque, Sebastián Rodríguez-Bottero, Inés Marmisolle, et al. «Mitofusins Modulate the Increase in Mitochondrial Length, Bioenergetics and Secretory Phenotype in Therapy-Induced Senescent Melanoma Cells». *The Biochemical Journal* 476, n.º 17 (10 de septiembre de 2019): 2463-86. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190405>.
148. Park, Sung Ho, Kyuho Kang, Eugenia Giannopoulou, Yu Qiao, Keunsoo Kang, Geonho Kim, Kyung-Hyun Park-Min, y Lionel B. Ivashkiv. «Type I IFNs and TNF cooperatively reprogram the macrophage epigenome to promote inflammatory activation». *Nature immunology* 18, n.º 10 (octubre de 2017): 1104-16. <https://doi.org/10.1038/ni.3818>.
149. Oishi, Yumiko, Nathanael J. Spann, Verena M. Link, Evan D. Muse, Tobias Strid, Chantle Edillor, Matthew J. Kolar, et al. «SREBP1 Contributes to Resolution of Pro-Inflammatory TLR4 Signaling by Reprogramming Fatty Acid Metabolism». *Cell Metabolism* 25, n.º 2 (7 de febrero de 2017): 412-27. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.11.009>.

150. Lee, Youngyi, Sun-O. Ka, Hye-Na Cha, Yu-Na Chae, Mi-Kyung Kim, So-Young Park, Eun Ju Bae, y Byung-Hyun Park. «Myeloid Sirtuin 6 Deficiency Causes Insulin Resistance in High-Fat Diet-Fed Mice by Eliciting Macrophage Polarization Toward an M1 Phenotype». *Diabetes* 66, n.º 10 (octubre de 2017): 2659-68. <https://doi.org/10.2337/db16-1446>.
151. Hornung, Veit, Simon Rothenfusser, Stefanie Britsch, Anne Krug, Bernd Jahrsdörfer, Thomas Giese, Stefan Endres, y Gunther Hartmann. «Quantitative Expression of Toll-Like Receptor 1–10 mRNA in Cellular Subsets of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides». *The Journal of Immunology* 168, n.º 9 (1 de mayo de 2002): 4531-37. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.9.4531>.
152. Liu, Tie Fu, Vidula T. Vachharajani, Barbara K. Yoza, y Charles E. McCall. «NAD⁺-Dependent Sirtuin 1 and 6 Proteins Coordinate a Switch from Glucose to Fatty Acid Oxidation during the Acute Inflammatory Response». *The Journal of Biological Chemistry* 287, n.º 31 (27 de julio de 2012): 25758-69. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.362343>.
153. Chien, Yuchen, Claudio Scoppo, Xiaowo Wang, Xueping Fang, Brian Balgley, Jessica E. Bolden, Prem Premrur, et al. «Control of the Senescence-Associated Secretory Phenotype by NF- κ B Promotes Senescence and Enhances Chemosensitivity». *Genes & Development* 25, n.º 20 (15 de octubre de 2011): 2125-36. <https://doi.org/10.1101/gad.17276711>.
154. Dantoft, Widad, Kevin A. Robertson, W. John Watkins, Birgit Strobl, y Peter Ghazal. «Metabolic Regulators Nampt and Sirt6 Serially Participate in the Macrophage Interferon Antiviral Cascade». *Frontiers in Microbiology* 10 (2019): 355. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00355>.
155. Wiley, Christopher D., y Judith Campisi. «From ancient pathways to aging cells - Connecting metabolism and cellular senescence». *Cell metabolism* 23, n.º 6 (14 de junio de 2016): 1013-21. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.010>.
156. Cassado, Alexandra Dos Anjos, Maria Regina D'Império Lima, y Karina Ramalho Bortoluci. «Revisiting Mouse Peritoneal Macrophages: Heterogeneity, Development, and Function». *Frontiers in Immunology* 6 (2015): 225. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00225>.
157. Olson, Nels C., Peter W. Callas, Anthony J. G. Hanley, Andreas Festa, Steven M. Haffner, Lynne E. Wagenknecht, y Russell P. Tracy. «Circulating Levels of TNF- α Are Associated with Impaired Glucose Tolerance, Increased Insulin Resistance, and Ethnicity: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 97, n.º 3 (1 de marzo de 2012): 1032-40. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-2155>.
158. Rubbo H. «Nitro-fatty acids: novel anti-inflammatory lipid mediators.» *Braz J Med Biol Res.* Sep;46(9):728-34 (2013). <https://doi.org/10.1590/1414-431X20133202>.

159. Lamas Bervejillo M, Bonanata J, Franchini GR, Richeri A, Marqués JM, Freeman BA, Schopfer FJ, Coitiño EL, Córscico B, Rubbo H, Ferreira AM. «A FABP4-PPAR γ signaling axis regulates human monocyte responses to electrophilic fatty acid nitroalkenes». *Redox Biology*. Jan;29:101376. (2020). [https://doi:10.1016/j.redox.2019.101376](https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101376).