

Índice

1. Introducción	2
1.1. Hipótesis de trabajo y objetivos.	
2. Materiales y métodos	11
2.1. Reactivos.	
2.2. Animales.	
2.3. Cultivos de líneas celulares.	
2.4. Obtención de macrófagos perioteneales de ratón.	
2.5. Obtención de macrófagos derivados de medula ósea de ratón.	
2.6. Obtención de Monocitos y Macrófagos humanos.	
2.7. Tratamiento de células.	
2.8. Obtención de homogenizados celulares para su análisis por inmunoblot (Western-Blot).	
2.9. Valoración de la concentración de proteína.	
2.10. Inmunoblot de proteínas (Western Blot).	
2.11. PCR.	
3. Resultados.	17
3.1. Expresión de la familia de lipinas en macrófagos humanos durante el proceso de polarización anti-inflamatoria mediado por IL-4.	
3.2. Protocolos de diferenciación de la línea celular U937 para el estudio del aumento de lipina-2 en la polarización anti-inflamatoria con IL-4.	
3.3. Expresión de lipina-2 en macrófagos murinos durante el proceso de polarización anti-inflamatoria mediado por IL-4.	
3.4. Ruta de señalización implicada en el aumento de expresión de lipina-2 en macrófagos peritoneales de ratón.	
3.5. Protocolo de activación del inflammasoma en macrófagos peritoneales de ratón.	
3.6. Expresión de la familia lipina en el espectro de polarización y reversión de la polarización en macrófagos peritoneales de ratón.	
4. Discusión.	26
5. Conclusiones.	28
6. Bibliografía	29

1. Introducción.

Las lipinas son una familia de proteínas con actividad fosfatasa del ácido fosfatídico (PAPs), actúan específicamente sobre ese sustrato y de forma dependiente de Mg^{2+} . La familia de lipinas se identificaron a finales de los 80, por la aparición de una mutación espontánea en la cepa de ratones fld (fatty liver dystrophy) que exhibían una desregulación en el almacenamiento del triacilglicerol (TAG), dando lugar a lipodistrofia y a un hígado graso en el periodo de lactancia.

El triacilglicerol es crítico para el almacenamiento de energía en el tejido adiposo y proporciona una fuente de ácidos grasos para la oxidación en el músculo esquelético y cardíaco. TAG es también esencial para la producción de lipoproteínas de muy baja densidad en el hígado y de los quilomicrones en el intestino, así como para la producción de leche por las células epiteliales mamarias. Alteraciones en la síntesis y almacenamiento de TAG son muy importantes ya que pueden aumentar la susceptibilidad a enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus y dislipidemia.

En eucariotas el triacilglicerol se sintetiza por dos rutas, la ruta del monoacilglicerol y la del glicerol-3-fosfato, o ruta de Kennedy, ésta última es la principal en la mayoría de los tipos celulares y es en ésta en la que participa la lipina, en la que se caracterizó la actividad PAP durante la década de los 50 (2,3). Esta ruta comienza con la acilación secuencial del glicerol-3-fosfato para formar fosfatidato (PA). Las lipinas regulan el balance de fosfatidato (precursor de los fosfolípidos, fosfatidilinositol y cardiolipinas) versus diacilglicerol (DAG) el cual es necesario para la síntesis de triacilglicerol, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS). Esta ruta de síntesis de glicerolípidos ocurre mayoritariamente en las membranas del retículo endoplasmático. Es interesante el hecho de que cada etapa está catalizada por múltiples isoformas enzimáticas, las cuales tienen todas uniones a membrana, excepto las lipinas(1,2,3).

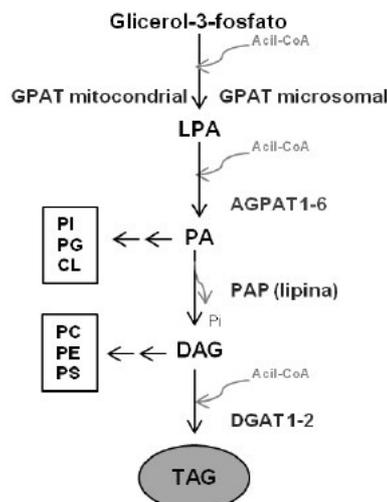


Figura 1. Síntesis de novo de TAG y glicerofosfolípidos por la ruta de Kennedy.

Estructura de las lipinas.

Muchas características estructurales que son funcionalmente importantes están ya definidas. Todos los miembros de la familia de las lipinas poseen unas secuencias aminoacídicas altamente conservadas conocidas como dominios N-LIP y C-LIP, que están presentes en las regiones amino y carboxilo terminal de las proteínas de los mamíferos. El dominio C-LIP contiene el sitio activo PAP, DXDXT, el cual identifica a estas proteínas como pertenecientes a la superfamilia de las haloácido deshalogenasas. Las lipinas de mamíferos tienen un motivo LXXIL en el dominio C-LIP que se ha demostrado que media la interacción de lipina-1 con los factores de transcripción y coactivadores. Y también las lipinas de mamíferos e invertebrados, pero no de plantas y levaduras, contienen residuos con carga positiva cerca del dominio N-LIP. Este motivo es necesario para la translocación de lipina-1 al núcleo y para la unión de la misma con PA. Sin embargo, la localización nuclear requiere un segundo motivo estructural o una molécula acompañante; así sólo una fracción de lipina-1 se localiza en el núcleo bajo la mayoría de las condiciones y lipina-2 parece ser excluida del núcleo a pesar de poseer el motivo polibásico (1).

Regulación y expresión de las lipinas.

Todas las lipinas, sus tres isoformas actúan como enzimas PAP. Las expresiones de los genes de lipina-1 y -2 son estrictamente reguladas por la acción diferencial de varias hormonas en el ciclo de alimentación / ayuno. Los niveles de lipina-2 son incrementados por el ayuno y esto parece depender de la activación de PPAR β/γ y de su unión a un elemento de respuesta situado 1300 pares de bases más abajo del sitio de inicio transcripcional LPIN2. Además, la expresión de lipina-2 también aumenta por el estrés agudo del retículo endoplásmico, así como por la alimentación de alto contenido en grasa, este aumento está relacionado con la resistencia hepática a la insulina. Si se silencia lipina-2 en ratones con obesidad inducida por la dieta mejora su rendimiento en el test de tolerancia a la glucosa, y ocurre lo contrario si se sobreexpresa lipina-2. También en ratones en los que se han realizado estudios knockdown se ha visto que lipina-2 en el hígado contribuye sustancialmente a la actividad PAP y a la síntesis de TAG en hepatocitos, sugiriendo que los niveles de lipina-2 pueden ser importantes para la homeostasis lipídica hepática.

La demostración de que los mamíferos expresan tres proteínas lipina (la clonación y secuenciación de Lpin1 (codificando lipina-1) hizo posible la identificación de dos genes de mamíferos relacionados, Lpin2 y Lpin3, así como los genes ortólogos en organismos evolutivamente distantes como levadura) y que todas catalizan la misma reacción (todas tienen actividad enzimática PAP) plantea cuestiones sobre el papel fisiológico de cada una de ellas. Los estudios de expresión de genes que se han llevado a cabo tanto en ratones como en humanos han demostrado que las lipinas se expresan diferencialmente dependiendo del tipo de tejido. También parece que hay un cierto grado de solapamiento y de redundancia, pues la ausencia de una proteína lipina puede, en cierta medida, ser compensada por otras isoformas. Lipina-1 parece que es la principal isoforma presente en tejido adiposo, en músculo esquelético y en corazón, mientras que lipina-2 se expresa

predominantemente en hígado, en eritrocitos y en regiones específicas del cerebro y lipina-3 lo hace mayoritariamente en intestino.

Lipina-2 parece diferir de lipina-1 en su localización subcelular. Los datos de la localización de lipina-2 en los tejidos no están disponibles, pero se sabe que en las células HeLa se localiza sobre todo en el citosol, mientras que lipina-1 se encuentra lo mismo en el citosol que asociado a la membrana RE/ nuclear(1, 2).

Patologías de lipina-2. Síndrome de Majeed.

Un polimorfismo en el 3'UTR de LPIN2 se ha relacionado con la distribución de grasa, los niveles de glucosa y los insulina en diabéticos de tipo 2. Las mutaciones con pérdida de sentido de LPIN2 causan la extraña enfermedad del síndrome de Majeed (desorden autosómico recesivo, caracterizado por una ostiomielitis multifocal recurrente, por una anemia disritropoyética congénita y por una dermatosis neutrofílica). Estudios en humanos y ratones lipin-2 deficientes han comenzado a definir algunos de los papeles fisiológicos de lipin-2 (1).

En 2005, Ferguson y su grupo identificaron los primeros síntomas de esta enfermedad que son usualmente fiebre y dolor en huesos y articulaciones que típicamente empiezan durante el primer año de vida. Las radiografías revelan lesiones osteomielíticas próximas a las terminaciones de los huesos largos y en otras localizaciones, pero estas lesiones son estériles. Además, los sujetos desarrollan anemia disritropoyética congénita de diferente gravedad. Algunos pacientes desarrollan también dermatosis inflamatoria transitoria, pero esto no es un fenotipo consistente de la enfermedad (1).

El síndrome de Majeed es raro, habiendo sido solamente observado en cuatro familias, todas del medio Este. Son conocidas cuatro mutaciones de la LPIN2, tres de cambios en el marco de lectura o en el sitio de empalme que resultan en codones prematuros de stop, y una mutación "missense" que cambia una serina por leucina (Ser734Leu) (5). La mutación Ser734Leu suprime la actividad enzimática PAP pero no afecta la capacidad de lipina-2 de asociarse con membranas microsomales ni a su función como coactivador transcripcional, sugiriendo que la ausencia de la actividad PAP es importante en la patogénesis de la enfermedad. Las lipinas en todos los organismos multicelulares tienen una serina en esa posición, mientras que los unicelulares tienen una treonina. Por lo tanto un grupo hidroxilo en esta posición debe ser crítico para su actividad fosfatasa.

Debido a la rareza de esta enfermedad y a las limitaciones en la realización de estudios en humanos, se desconoce cómo la patogénesis de la enfermedad cómo está relacionada ésta con la función de la lipina-2 y el metabolismo glicerolípido. Recientemente se han realizados estudios en el suero de estos pacientes y se ha observado un elevado contenido de citoquinas proinflamatorias, incluyendo TNF α . El tratamiento frente a esta citoquina no ha resultado efectivo en los pacientes. Sin embargo, la inhibición de la IL-1 β tanto con un antagonista recombinante del receptor de IL-1 (anakinra) como con un anticuerpo anti IL-1 β (canakinumab) ha resultado en una clara mejoría clínica (4).

La diferente respuesta del tratamiento con agentes bloqueantes de TNF α e IL-1 arroja luz sobre la patogénesis de la enfermedad. Esto apoya la hipótesis de

que el síndrome de Majeed es un desorden autoinflamatorio dependiente de IL-1 β .

Los desórdenes autoinflamatorios son trastornos del sistema inmune innato que se presentan con periodos recurrentes de inflamación. La mayoría son debidos a alguna desregulación en la ruta de IL-1 β . La mayoría de los trastornos autoinflamatorios responden al bloqueo de la IL-1 β . DIRA (deficiency of the IL-1 receptor antagonist) es una enfermedad autoinflamatoria que afecta a la piel y a los huesos que se presenta durante las primeras semanas de vida con pustulosis, osteitis estéril y periosteitis. El síndrome es causado por mutaciones en IL1RN, el gen que codifica el agonista del IL-1R, el tratamiento con anakinra es efectivo. La fisiopatología de DIRA implica indudablemente a la IL-1 en la inflamación ósea. El síndrome de Majeed se piensa que es también un trastorno autoinflamatorio óseo, aunque todavía no hay evidencias definitivas y el rol de IL-1 β es desconocido. El mecanismo por el cual la ausencia de la actividad PAP en la lipina-2 lleva a inflamación en la piel y en los huesos no está claro. Parece posible que las anomalías óseas sean debidas a la elaboración de citoquinas de forma sistemática o localizada en los huesos. La producción de citoquinas ocurre en las articulaciones en enfermedades como la osteoartritis. En este sentido, el mRNA para lipina-2 es detectable en los huesos y en la médula ósea de ratón. Futuros estudios en modelos murinos pueden ser útiles para definir la patogénesis del síndrome de Majeed (1, 4, 5).

Producción de IL-1 β . Inflamasoma.

La IL-1 β es uno de los mediadores más importantes de la inflamación y de la respuesta del huésped a infecciones; y un incremento de la misma está asociado a múltiples enfermedades. Aumentos excesivos en la producción y en los niveles de esta interleucina se han visto en infecciones virales, bacterianas, y fúngicas, y en enfermedades autoinmunes, en diabetes tipo 2, y en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la esclerosis múltiple y el Parkinson(6).

IL-1 β tiene un papel beneficioso en la mediación de las respuestas del huésped pero también puede tener efectos perjudiciales, por ejemplo, puede facilitar la invasión tumoral y promover el daño tisular en las enfermedades inflamatorias crónicas.

IL-1 β es producida, principalmente por las células de linaje monocítico, incluidos monocitos, macrófagos y células dendríticas. Su producción y liberación está inducida por una gran variedad de estímulos, los cuales se pueden dividir en PAMPs (pathogen-associated molecular pattern) como el lipopolisacárido (LPS), flagelina, etc., que están en microorganismos, y DAMPs (damage-associated molecular pattern) como el ATP, los cristales de ácido úrico, etc. que son ligandos endógenos que se liberan por células dañadas y muertas. El reconocimiento de PAMPs y DAMPs se lleva a cabo por la activación en la membrana de los TLRs (toll-like receptors) y en el citosol por los NLRs (nucleotide binding and oligomerization domain (nod)-like receptors), respectivamente. Ambos pueden contribuir a la inducción de la liberación de IL-1 β . Hay varios estudios en los que se ha demostrado que el tratamiento con LPS y ATP es un poderoso estímulo para la liberación de IL-1 β en monocitos, macrófagos y células dendríticas (6).

La transcripción de $Il-1\beta$ mRNA y su traducción a pro- $Il-1\beta$ están controladas por varios factores de transcripción y señales citoplasmáticas, para inducir la necesaria una estimulación celular a través de los receptores anteriormente nombrados. Tras la producción de pro- $Il-1\beta$ se requiere una segunda señal para llevar a cabo el procesamiento a $Il-1\beta$ y su liberación. Investigaciones sobre macrófagos estimulados con LPS revelan que en ausencia de un segundo estímulo se produce una liberación muy pequeña de $Il-1\beta$ madura al medio extracelular. El rápido procesamiento y liberación de $Il-1\beta$ es regulado por la caspasa-1. La caspasa-1 es una cisteína proteasa que está presente en las células de forma latente y que llega a ser activa a través de una cascada proteolítica altamente regulada. La activación de caspasa-1 requiere el ensamblaje y la activación de un inflammasoma. Los inflammasomas son complejos multiproteicos que comprenden ASC (the intracellular adaptor proteína apoptosis-associated speck-like proteína containing a CARD) y un sensor NLR. Los distintos inflammasomas se diferencian en su composición de proteínas y en su modo de activación. La activación de caspasa-1 está promovida por los miembros de la familia NLR, NLRP1, NLRP3 o NLRP4. El inflammasoma NLRP1 regula la activación de caspasa-1 cuando la célula es expuesta a la toxina del Antrax, el inflammasoma NLRP3 está implicado en la activación de caspasa-1 en respuesta a varios agonistas entre los que está incluido el ATP, muramil dipéptido, RNA bacteriano, sílica, asbestos,... Y el NLRP4 por la infección celular con bacterias intracelulares. La secuencia exacta de eventos que llevan a la activación del inflammasoma no es bien conocida para los distintos inflammasomas, se cree que el ensamblaje del inflammasoma y el reclutamiento de pro-caspasa-1 se producen directamente por interacción homotípica vía CARD (ej. Inflammasomas NLRP1 y NLRP4) o indirectamente vía ASC (inflammasoma NLRP3) (6, 7).

Este último inflammasoma, NLRP3 contiene los elementos típicos NLR (LRR y NBD) y un N-terminal PYD, y al igual que NLRP1 puede reclutar la proteína adaptadora ASC por interacciones PYD. La oligomerización de NLRP3 en respuesta a los estímulos y el reclutamiento de ASC pueden activar caspasa-1. Para ensamblarse, NLRP3 requiere la unión de ATP o desoxyATP a su elemento NBD el cual tiene actividad ATPasa. Al igual que ocurre en NLRP1 el ensamblaje de NLRP3 es inhibido por altas concentraciones de K^+ (7).

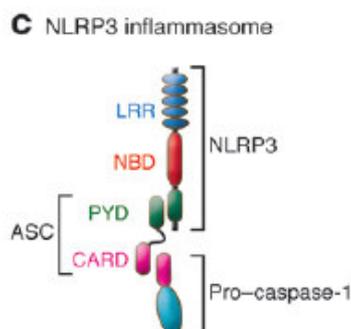


Figura 2. NLRP3 activa pro-caspasa-1 mediante el reclutamiento de ASC.

El ATP extracelular activa los receptores de canales iónicos P2X7 en macrófagos polarizados M1 y así es como se produce la liberación de la citoquina proinflamatoria $Il-1\beta$ a través de la activación de caspasa-1 en el inflammasoma NLRP3; esto está unido a un incremento de ROS y a la

polimerización de actina en el borde celular. En estados intermedios de polarización M1/M2 de macrófagos el ATP actúa a través del pirofosfato inhibiendo la liberación de $IL-1\beta$, esto ocurre a través de dos mecanismos independientes: la inhibición de la producción de ROS y el atrapamiento del complejo del inflammasoma por un agrupamiento de actina intracelular, ayudando así a resolver la inflamación (8).

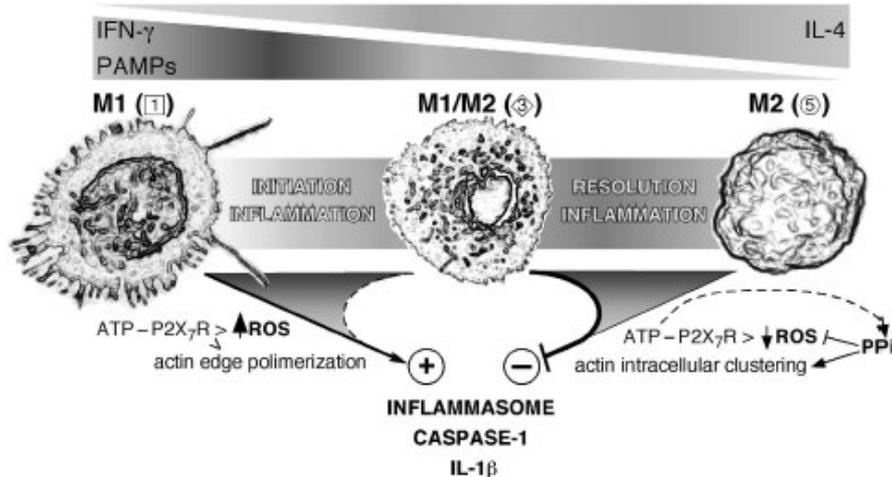


Figura 3. Modelo propuesto para la regulación del inflammasoma por el ATP extracelular durante el gradiente de polarización de macrófagos.

La $IL-1\beta$ se expresa en macrófagos M1 mientras que no se encuentra en macrófagos M2, mientras que la caspasa1 inactiva está presente tanto en M1 como en M2, pero sólo es activada en M1, donde se activa el inflammasoma (8).

Polarización de macrófagos M1/M2.

El papel de los macrófagos es crítico tanto en la respuesta innata como en la respuesta adaptativa. El daño resultante de una invasión por patógenos, u otras causas, activa los macrófagos y así se inicia o incrementa la producción de citoquinas proinflamatorias y otros mediadores de la inflamación. Sin embargo, los macrófagos son igualmente críticos en la resolución de la inflamación produciendo citoquinas y quemoquinas anti-inflamatorias e incrementando la actividad fagocítica. En base al concepto Th1/Th2 los macrófagos M1 son denominados como proinflamatorios o activados clásicamente, y los M2 antiinflamatorios o activados alternativamente. Experimentalmente se ha visto que los macrófagos in vitro son polarizados a M1 por tratamiento con $IFN-\gamma$ e inductores de $TNF-\alpha$, como el LPS y otros productos bacterianos. Los macrófagos M1 inducen la síntesis y la up-regulación de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias, $TNF-\alpha$, $IL-12$, $IL-6$, $CCL2$ e $IL-1\beta$, también producen un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de intermedios de nitrógeno. En el otro extremo los macrófagos son polarizados a M2 mediante estímulos con $IL-4$, $IL-13$, $IL-10$ u hormonas glucocorticoideas. M2 up-regula los receptores de manosa y galactosa, el agonista del receptor de $IL-1$ y down-regula $IL-1\beta$ y otras citoquinas proinflamatorias. Los macrófagos polarizados M2 son críticos para la resolución de la inflamación y la recuperación de los tejidos (8, 9, 10).

La plasticidad de los macrófagos, y la posibilidad de reversión de un estado a otro, permite que se adapten a los diferentes ambientes y presentar así una actividad dual en la inflamación, potenciándola y resolviéndola (9).

Activación alternativa de macrófagos, polarización a M2 por IL-4/IL-13. Mecanismo.

Las citoquinas antiinflamatorias IL-4 e IL-13 son las típicas inductoras de M2. Los receptores de estas dos citoquinas comparten una cadena α . Para la IL-4 hay dos tipos de receptores identificados, el tipo I que está formado por la cadena α del receptor (IL-4Ra) y la cadena común γ_c del receptor de IL-2 que comparten muchos receptores de citoquinas; y el tipo II, el cual es también receptor para IL-13, que está constituido por IL-4Ra y la cadena 1 del receptor de IL-13 α (IL-13Ra1). IL-13 tiene un segundo receptor, un receptor señuelo, formado por IL-R13a2, este receptor muestra una extraordinaria afinidad por IL-13 pero una ínfima capacidad señalizadora (10, 11, 12).

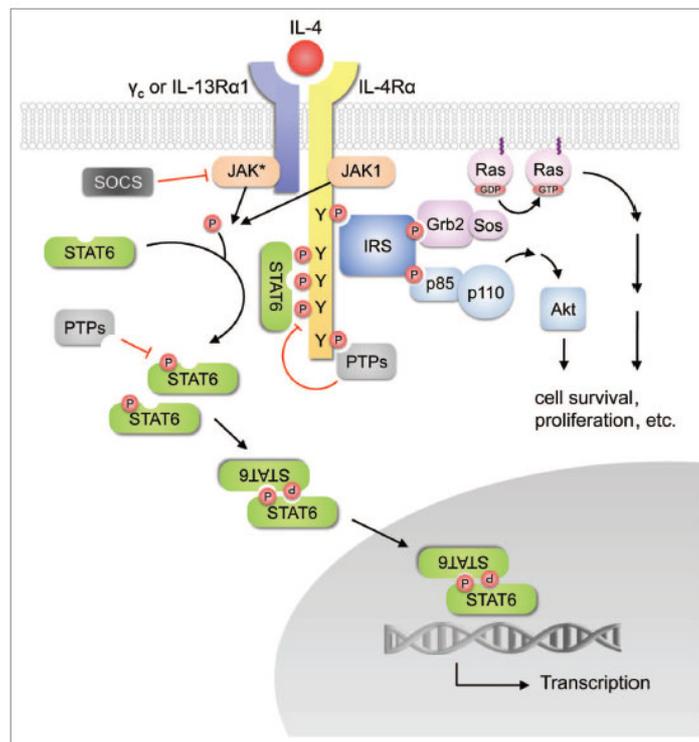


Figura 4. Rutas de señalización a partir del IL-4R.

IL-4 se une a IL-4Ra y esto lleva al reclutamiento de γ_c o de IL-13Ra1 para formar el receptor tipo I o el II. La dimerización de las subunidades del receptor activa las JAKs asociadas al mismo, lo que conduce a la fosforilación de residuos citoplasmáticos de tirosina de IL-4Ra, que más tarde sirven de sitios de unión para otras moléculas señalizadoras como STAT-6 (signal transducer and activator of transcription-6). Una vez que STAT-6 es fosforilado por JAKs, se desacopla del receptor y se dimeriza con una segunda molécula de STAT-6. El dímero se transloca al núcleo y se une a motivos específicos del promotor de sus genes diana, iniciando así su transcripción. Alternativamente, IL-4 puede señalizar a través del reclutamiento del sustrato del receptor de insulina (IRS) en residuos fosforilados de tirosina del receptor. IRS puede ser entonces fosforilado

y reclutar otras moléculas señalizadoras, incluida la subunidad p85 de PI3K, lo que conduce a la activación la proteína quinasa serina/treonina Akt. IRS también puede interactuar con Grb2, el cual está complejo a la proteína de intercambio de nucleótidos guanina Sos, y produce la activación de Ras y después de las rutas de las MAPKs, generando crecimiento y proliferación celular. Estas cascadas de señalización son objeto de regulación negativa por varios mecanismos. Por ejemplo tirosinas fosfatasas con dominios SH2 (PTPs) pueden modular la señalización por IL-4 desfosforalizando JAKs y STAT6. También la familia SOCS (supresor of citokine signaling), como SOCS1 y SOCS3, pueden inhibir la actividad de JAKs bloqueando el dominio catalítico para los sustratos STATs (10, 11, 12, 13, 14).

Los marcadores de polarización M2 MRC1, MHC classII, FN1 y CCL2 son up-regulados tanto en macrófagos humanos como en murinos, y responden de forma similar a IL-4. También se ha visto que los marcadores de M2 murinos como Fizz1, Ym1 e Ym2, no tienen homólogos en humanos. Otros M2 en humanos como Arg1 no es up-regulado por IL-4 (11).

Papel antiinflamatorio de lipina-2 en macrófagos.

Anteriormente ha sido introducida la lipina-2 y su papel en el metabolismo lipídico, pero había quedado pendiente su función en la inflamación y su relación con los macrófagos M2, algo que va a ser clave en nuestro estudio.

Recientemente se ha demostrado el papel protector de lipina-2 en la señalización proinflamatoria mediada por ácidos grasos saturados (15).

La inflamación crónica que se produce en el tejido adiposo en la obesidad es debido, al menos en parte, a los altos niveles de ácidos grasos liberados por los adipositos, especialmente ácidos grasos saturados, éstos son capaces de estimular los macrófagos residentes en el tejido y cambiar su polarización del fenotipo antiinflamatorio (M2) al proinflamatorio (M1). Los ácidos grasos saturados promueven el estrés del retículo endoplasmático y la respuesta a proteínas mal plegadas que interactúan con diferentes rutas de señalización generando inflamación. Se ha visto que la lipina-2 desacopla la activación de los ácidos grasos saturados y la expresión de genes proinflamatorios, que una disminución en la expresión de lipina-2 promueve un estado proinflamatorio a través de la sobreestimulación de JNK1/AP-1 y que lipina-2 controla la incorporación de ácidos grasos en triacilglicerol especialmente cuando hay una sobrecarga de los mismos (15).

Los ácidos grasos saturados como el ácido palmítico impactan sobre la homeostasis celular a través de dos mecanismos. En el primero, los ácidos grasos actúan a través de TLR4/2 iniciando una cascada que culmina en la activación de JNK/AP-1, estos regulan la expresión de genes proinflamatorios. En el segundo mecanismo, los ácidos grasos penetran en la célula promoviendo daño celular. Los dos mecanismos culminan en la up-regulación de genes proinflamatorios por los macrófagos. Lipina-2 controlando la síntesis de triacilglicerol y por lo tanto la incorporación de los ácidos grasos en lípidos neutros, atenúa la activación de JNK/c-jun y los niveles de mediadores proinflamatorios como son IL-6, MCP-1 y TNF- α (15).

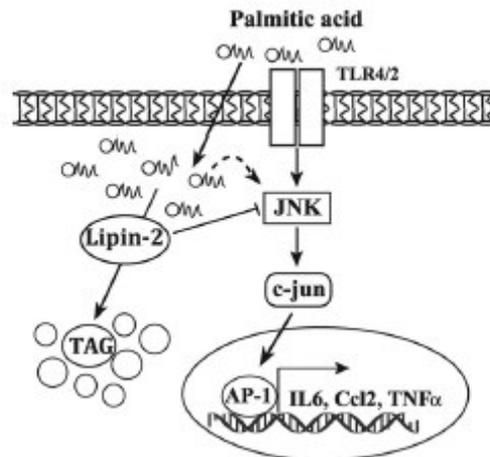


Figura 5. Papel de lipina-2 en la generación de mediadores pro-inflamatorios en macrófagos estimulados con ácidos grasos saturados.

Experimentos preliminares de nuestro laboratorio han mostrado que la expresión de la lipina-2 aumenta de en macrófagos humanos polarizados con IL-4, pero no en macrófagos los polarizados con IFN- γ y LPS.

1.1. Hipótesis de trabajo y objetivos.

Tras investigar los antecedentes aquí descritos nuestra hipótesis de trabajo es que: la expresión de la lipina-2 está controlada por IL-4 y, de alguna manera, lipina-2 actúa como regulador negativo del inflammasoma.

Nuestros objetivos fundamentales en este trabajo son:

1. Establecer un modelo macrófágico donde poder estudiar la regulación de la expresión de lipina-2 por IL-4.
2. Poner a punto un sistema experimental donde poder estudiar el inflammasoma del que depende la producción de IL-1 β y,
3. Un sistema de polarización donde poder estudiar el cambio de expresión de lipinas en los distintos tipos de polarización.

2. Materiales y Métodos Experimentales

2.1. Reactivos.

Anticuerpos:

- Anti-lipina-1 (Antisuero policlonal de conejo producido en el propio laboratorio)
- Anti-lipina-2 (Biovisión)
- Anti-lipina-3 (Santa Cruz)
- Anti-IL-1 β y pro-IL-1 β (Cell Signalling)

Citocinas:

- IL-4 humana (Inmuno Tools)
- IL-4 MURINA (Inmuno Tools)

Estímulos:

- IFN- γ (Sigma Aldrich)
- LPS (Sigma Aldrich)
- ATP (Sigma Aldrich)

Antibióticos (Inhibidores inespecíficos):

- Actinomicina-D (Sigma Aldrich)
- Ciclohexamida (Sigma Aldrich)

Inhibidores farmacológicos:

- Ruxolitinib (LC Laboratories)
- Tofacitinib (LC Laboratories)
- Worthmanina (Sigma Aldrich)
- PD 98,059 (Sigma Aldrich)

Propranolol (Sigma Aldrich)

2.2. Animales.

Los ratones Swiss se adquirieron del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid (exceptuando 50 ratones). Los animales fueron alimentados *ad limitum*. Para la realización de los experimentos sólo se usaron ratones machos y fueron realizados con conformidad a las normas establecidas por el animalario de la Universidad de Valladolid.

2.3. Cultivos de líneas celulares.

U937- Línea celular humana pre-promonocítica establecida a partir de un linfoma histiocítico difuso.

Las células U937 se cultivan en suspensión. Se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) suero bovino fetal inactivado por calor (20 min a 56° C) y 100 U/ml de penicilina-estreptomicina. Todas las células se mantuvieron en incubadores a 37° C, en una atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO₂.

Durante la media hora previa al inicio de las estimulaciones, se eliminó el suero de las células para conseguir un estado de "quiescencia" en el momento de comenzar el experimento.

2.4. Obtención de Macrófagos Peritoneales de ratón.

Los ratones fueron sacrificados por dióxido de carbono y posterior dislocación cervical. Con la ayuda de tijeras y pinzas se abrió la piel abdominal con cuidado de no romper la capa epitelial que la rodea cavidad abdominal. A continuación, se inyectó en la cavidad dos veces consecutivas 5 ml de PBS frío con una jeringuilla con aguja de tamaño 25G, y tras agitación suave se recogió el líquido intraperitoneal. Las células extraídas se centrifugaron a 300 x g durante 10 minutos, se realizó un lavado con PBS, se centrifugaron de nuevo, 300xg 10 minutos y se plaquearon a razón de 1,5-2 millones de células/pocillo en placa de 6 pocillos para todos los ensayos.

Las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal previamente inactivado por calor (20min a 56°C) y 100U/ml de penicilina/estreptomicina, a 37°C en atmósfera saturada de humedad y 5% CO₂ durante unas 16h, para permitir la adherencia de los macrófagos.

2.5. Obtención de macrófagos derivados de medula ósea de ratón.

Los ratones fueron sacrificados por dióxido de carbono y posterior dislocación cervical. Las tibias y los fémures fueron aislados de la masa y lavados con etanol al 70%. Posteriormente, las células de la médula se extrajeron con la ayuda de una jeringa con PBS. El extracto medular fue filtrado con un filtro de nylon de 100µM (BD Falcon 352360), y las células fueron centrifugadas a 300 x g durante 10 minutos. Tras un lavado con PBS, las células procedentes de una tibia y un fémur fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pocillos. Las células fueron cultivadas en medio DMEM, suplementado con 4mM de glutamina, 100U/mL de penicilina, estreptomicina, suero fetal bovino al 10% (v/v), previamente inactivado por calor durante 20 minutos a 56°C, y el 20% de medio condicionado producido por las células LADMAC (ATCC, CRL 2420), células con morfología monocítica que secretan gran cantidad de CSF-1 (del inglés Colony Stimulator Factor-1) durante 6 días, realizándose cambios de medio cada 2 días. El séptimo día se realizó un lavado con PBS y se dejaron 30 minutos en medio incompleto (el medio descrito sin el suero fetal bobino ni el medio condicionado) hasta alcanzar el estado de quiescencia. Una vez alcanzado se añadieron 20ng/mL de mIL-4 (*Immuno Tools*) y se incubaron durante 6-24 horas.

2.6. Obtención de Monocitos y Macrófagos humanos

Las células sanguíneas humanas se obtuvieron a partir de concentrados (*buffy coats*) de voluntarios sanos del grupo sanguíneo O, proporcionados por el Centro Regional de Hemodonación y Hemoterapia de Castilla y León.

El concentrado sanguíneo se diluyó en la proporción 1:1 con PBS pH 7,4 y posteriormente se añadió sobre una solución de Ficoll-Paque™ Plus (*GE Healthcare*) manteniendo la proporción de sangre-PBS/Ficoll-Paque 3:1. Esta mezcla se centrifugó a 725 x g, sin freno, durante 30 min. Tras la centrifugación, se formaron varias fases: en la parte superior se situó la fase acuosa (plasma y PBS), un anillo de células mononucleares separa esta fase del Ficoll-Paque y en el fondo del tubo se situaron los eritrocitos y las células polimorfonucleares.

Las células mononucleares se recogieron mediante aspiración con pipeta Pasteur y se lavaron 3 veces con PBS mediante centrifugación a 450 x g, durante 10min. Tras el recuento, se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con 2mM de L-glutamina y 40 µg/ml de gentamicina, se distribuyeron 30x10⁶ células en placas de cultivo y se dejaron durante 2 h en el incubador para permitir la adherencia de los monocitos al plástico y su posterior separación de los linfocitos. Tras las 2 h, prácticamente la totalidad de los monocitos estaban adheridos a la placa y los linfocitos se pudieron eliminar mediante sucesivos lavados con PBS.

Para promover la diferenciación de los monocitos a macrófagos, las células se cultivaron durante 14 días en medio RPMI suplementado con 2 mM de L-glutamina, 40µg de gentamicina y 5% de suero humano procedente de una mezcla de donantes, realizándose cambios de medio cada 3 días.

2.7. Tratamiento de las células.

Todos los experimentos se realizan en placa de 6 pocillos, con dos pocillos por punto y 1,5-2 millones células/ pocillo.

Expresión de la familia de lipinas en macrófagos humanos: Los macrófagos diferenciados durante 7 días en medio RPMI suplementado con 2 mM de L-glutamina, 40µg de gentamicina y 5% de suero humano, van a ser estimulados con IL-4 (1000U/mL) durante 12, 24, 36 y 48 horas; para ello media hora antes del estímulo se lavan con PBS y se pasan a medio incompleto.

Diferenciación de la línea celular U937: Esta línea celular es pre-promonocítica cuya diferenciación es necesaria y ésta se realiza con PMA (35ng/mL) a continuación se siguen los protocolos que están desarrollados en el apartado 3.2 Resultados. Siempre antes de estimular media hora en medio incompleto.

Expresión de lipina-2 en macrófagos murinos: Una vez han sido extraídos y adheridos se lavan con PBS y se ponen en medio incompleto durante la media hora anterior al estímulo de IL-4 (20ng/mL).

En los experimentos con los inhibidores:

Regulación a nivel transcripcional o traduccional: Ciclohexamida y Actinomicina D: Se dispone un control que está 30 min en medio incompleto al igual del resto de puntos y a continuación 24 horas incubándose también en medio incompleto. El siguiente punto se incuba con Cicloheximida 5µg/mL (Sigma Aldrich) en medio incompleto durante 24 horas. Con Ciclohexamida también hay otro punto, solo que ahora se estimula con IL-4 20ng/mL (Immuno Tools) 30 minutos después del antibiótico y se incuba 24 h. Los mismos puntos que para Cicloheximida se ponen con Actinomicina D 1µg/mL (Sigma Aldrich).

Definición de la ruta de señalización implicada: Se dispone de un control que tras estar 30 min en medio incompleto al igual que el resto de puntos, se incuba durante 24h también en medio incompleto. Un segundo control, se incuba en medio incompleto durante 24 horas pero con estimulación de IL-4 20ng/mL (Immuno Tools). Los siguientes puntos se realizan con inhibidores que se añaden después de los 30 minutos de medio incompleto, se dejan 30 min y se incuban durante 24 h bien estimulados con IL-4 20ng/mL (Immuno Tools) o sin estimular; las dos condiciones por inhibidor. Los inhibidores empleados son: Ruxolitinib 1µM (LC Laboratories), Tofacitinib 1µM (LC Laboratories), Worthmanina 50nM (Sigma Aldrich), PD 98,059 3,7nM (Sigma Aldrich).

Activación del inflammasoma en macrófagos peritoneales de ratón: Los distintos puntos están 30 min en medio incompleto tras lo cual, se deja un punto como control que va a estar 3h y 40 min en medio incompleto. Al siguiente punto se le añade LPS 200ng/mL (Sigma Aldrich) y se deja 3 h y 40 min, al siguiente, tras las 3 h con LPS se le añade ATP 2mM (Sigma Aldrich) y se deja 40 min. Los tres siguientes puntos se inhiben con propanolol 200µM (Sigma Aldrich), uno como control, 3h y 40 min en medio incompleto, otro con LPS 200ng/mL (Sigma Aldrich) y se deja 3 h y 40 min y el último 3 h con LPS 200ng/mL (Sigma Aldrich) se le añade ATP 2mM (Sigma Aldrich).

Expresión de la familia lipina en el espectro de polarización y reversión de la polarización en macrófagos peritoneales de ratón: Se les pone en medio incompleto y transcurrida media hora se estimulan, distintos estímulos según el fenotipo que se quiera alcanzar, el primer punto: LPS 1µg/mL (Sigma Aldrich) e IFN-γ 20ng/mL (Sigma Aldrich) durante 4 horas para diferenciarles a M1. El segundo IL-4 20ng/mL (Immuno Tools) durante 4 horas para M2. Y el último LPS 1µg/mL (Sigma Aldrich) e IFN-γ 20ng/mL (Sigma Aldrich) por 4 horas, lavado e IL-4 20ng/mL (Immuno Tools) durante otras 4 horas para M1 <=> M2.

2.8. Obtención de homogenizados celulares para su análisis por inmunoblot (Western-Blot).

Las células se lavaron dos veces con PBS y se recogieron mediante raspado en un medio de lisis (150mM NaCl, 20mM TrisHCl [pH 7,4] y 0,5% Triton X-100). Posteriormente se incubaron en hielo durante 20 minutos y el lisado celular se centrifugó a 16000 x g a 4°C durante 10 min. La proteína presente en el sobrenadante se cuantificó y se añadió tampón de carga de Laemmli. Finalmente las muestras se hirvieron durante 5 minutos antes de proceder a su separación electroforética (SDS-PAGE).

2.9. Valoración de la concentración de proteína.

Para determinar la cantidad de proteína total de los lisados celulares se utilizó el ensayo de Bradford, siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante (Biorad). La recta de calibrado se realizó con diluciones de albúmina de suero bovino (BSA).

2.10. Inmunoblot de proteínas (Western blot).

La electroforesis se realizó en condiciones desnaturalizantes y reductoras, según el método descrito por Laemmli, donde las proteínas se separan en función de su tamaño. Se utilizaron geles con diferentes porcentajes de acrilamida en función del tamaño de la proteína a estudiar y un tampón de electroforesis con 25 mM de Tris, 0,2 M de glicina y 1% de SDS (p/v). Además se usaron estándares proteicos preteñidos de diferentes tamaños moleculares, lo cual permitió la localización de las proteínas en función de su peso molecular. Las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) mediante un sistema de transferencia Bio-Rad, a 300 mA durante 60 ó 90 min, en función del grosor del gel y del tamaño de la proteína, utilizando el tampón de transferencia CAPS 1mM, pH 11.

Para disminuir la adsorción inespecífica del anticuerpo primario a la membrana de PVDF se incubó la membrana en una solución rica en proteínas

compuesta por PBS y 5% (p/v) de leche desnatada. La incubación se realizó en agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.

Para el inmunoblot de las proteínas, las membranas fueron incubadas en agitación lenta con el anticuerpo primario correspondiente diluido 1:1000 en la solución de bloqueo (PBS-0,1% Tween-20 suplementado con 5% de leche), durante una hora a temperatura ambiente, o durante toda la noche a 4°C. Seguidamente se realizaron tres lavados con PBS-0,1% Tween-20 al con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo primario no adherido específicamente a la membrana. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa diluido 1:5000 en PBS- 0,1% Tween-20 suplementado con 0,5% de leche desnatada, durante 1 h, a temperatura ambiente y en agitación lenta. Tras la incubación, se realizaron de nuevo tres lavados con PBS-0,1% Tween-20 para eliminar el anticuerpo secundario no adherido específicamente a la membrana.

Finalmente, las membranas se incubaron con reactivo ECL, que permite la detección quimioluminiscente de los anticuerpos conjugados a peroxidasa, monitorizándose con placas autoradiograficas Super RX (Fujifilm) en un dispositivo Curix 60 (AGFA). Las placas autoradiograficas fueron analizadas por densitometría usando el software Quantity One (Bio Rad) normalizando los datos a la expresión de β -actina.

2.11. PCR

El RNA de las células fue extraído por el método del reactivo TRIzol (Ambion, Life Technologies), según el protocolo proporcionado por el fabricante. Posteriormente, se sintetizó DNA complementario (cDNA) empleando el kit de transcriptasa reversa M-MLV (Ambion, Life Technologies) y 2 μ g de RNA total, según el protocolo proporcionado por la empresa productora.

Las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) se realizaron en el termociclador lightcycler 480 (Roche) utilizando una mezcla comercial, KAPA SYBR Master mix qPCR (Roche), que contiene SYBR Green, Taq polimerasa, dNTPs y un tampón de reacción. La amplificación del producto fue verificada en todas las reacciones al analizar la curva de disociación al final de cada PCR. Todas las reacciones se realizaron por duplicado y el análisis se cuantificación se realizó mediante el método $\Delta\Delta C_t$ de nuestro gen de interés con los valores de C_t de un gen constitutivo de referencia, en nuestro caso se empleó GAPDH.

Los cebadores empleados para los genes estudiados son:

Regulación y papel de lipina-2 en macrófagos

Alba Terán García

Oligonucleótidos para PCR cuantitativa en células de ratón.		
Gen	Secuencia sentido	Secuencia antisentido
GAPDH	5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTG-3'	3'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-5'
Lpin-1 α	5'-GGTCCCCAGCCCCAGTCCTT-3'	3'-GCAGCCTGTGGCAATTCA-5'
Lpin-1 β	5'-CATGCTTCGGAAAGTCCTTCA-3'	3'-GGTATTCTTTGGCGTCAACCT-5'
Lpin-2	5'-AGTTGACCCATCACCGTAG-3'	3'-CCCAAAGCATCAGACTTGGT-5'
Lpin-3	5'-TGGAATTGGGATGACAAGGT-3'	3'-CCACTGCAAGTACCCCTTGGT-5'
Arg-1	5'-CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG-3'	3'-AGGAGCTGTCATTAGGGACATC-5'
Cox2	5'-TGAGCAACTATCCAAACCAGC-3'	3'-GCACGTAGTCTTCGATCACTATC-5'
iNos2	5'-CCAAGCCCTCACCTACTTC-3'	3'-CTCTGAGGGCTGACACAAGG-5'
Il-6	5'-TAGTCCTCCTACCCCAATTC-3'	3'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-5'

3. Resultados.

3.1. Expresión de la familia de lipinas en macrófagos humanos durante el proceso de polarización anti-inflamatoria mediado por IL-4.

Para confirmar el aumento de lipina-2 observado en los datos preliminares obtenidos por qPCR, se realizaron inmunoblots de las tres lipinas en lisados de macrófagos humanos obtenidos de sangre periférica, diferenciados durante 7 días y posteriormente polarizados durante 12, 24, 36 y 48h.

Durante el proceso de polarización antiinflamatoria los niveles de lipina-2 aumentan significativamente hasta las 24h, y se mantienen estables hasta las 48h, mientras que los niveles de lipina-1 y lipina-3 se mantienen estables (datos no mostrados). (Fig. 1 A y B).

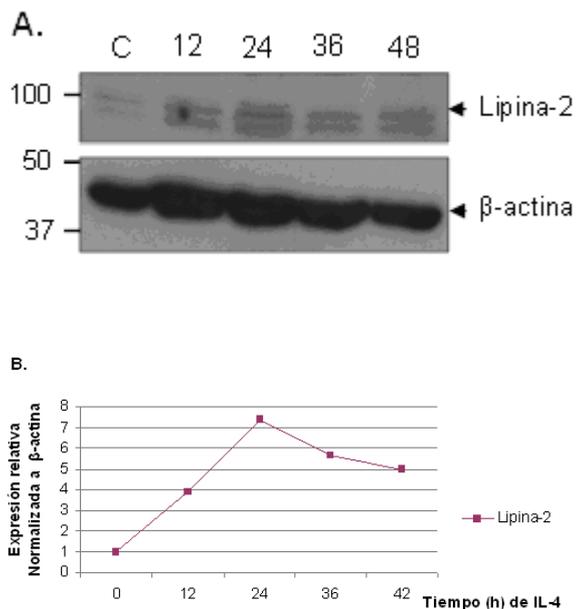


Figura 1. Expresión de lipina-2 en la polarización anti-inflamatoria con IL-4. A) Se realizaron lisados celulares de macrófagos humanos diferenciados durante 7 días y polarizados con IL-4 durante los tiempos indicados. Se analizó por inmunoblot la lipina y la β -actina como control de carga. B) La intensidad de las bandas proteicas obtenidas se cuantificó con respecto a la β -actina utilizando el softwareQuantityOne (Bio Rad).

3.2. Protocolos de diferenciación de la línea celular U937 para el estudio del aumento de lipina-2 en la polarización anti-inflamatoria con IL-4.

Para poder estudiar más fácilmente los mecanismos y el significado biológico que subyace al aumento de lipina-2 durante la polarización anti-inflamatoria de los macrófagos; decidimos emplear un modelo de línea celular humana, la línea pre-pro-monocítica U937. Dado su estado altamente inmaduro, es

esencial diferenciarla antes a un estado similar al de un macrófago maduro, para lo que empleamos 35ng/mL de PMA.

El primer protocolo que empleamos se encuentra resumido en la figura 2 A. Al observar la expresión de las tres lipinas mediante inmunoblot, se ve que la expresión es máxima en las U937 sin tratar y que aumenta con el tratamiento de PMA para disminuir posteriormente con el tiempo. El tratamiento con IL-4 no parece aumentar significativamente la expresión de lipina-2 a ningún tiempo estudiado. Por tanto, este sistema no parece adecuado para nuestros propósitos (Fig. 2 B y C).

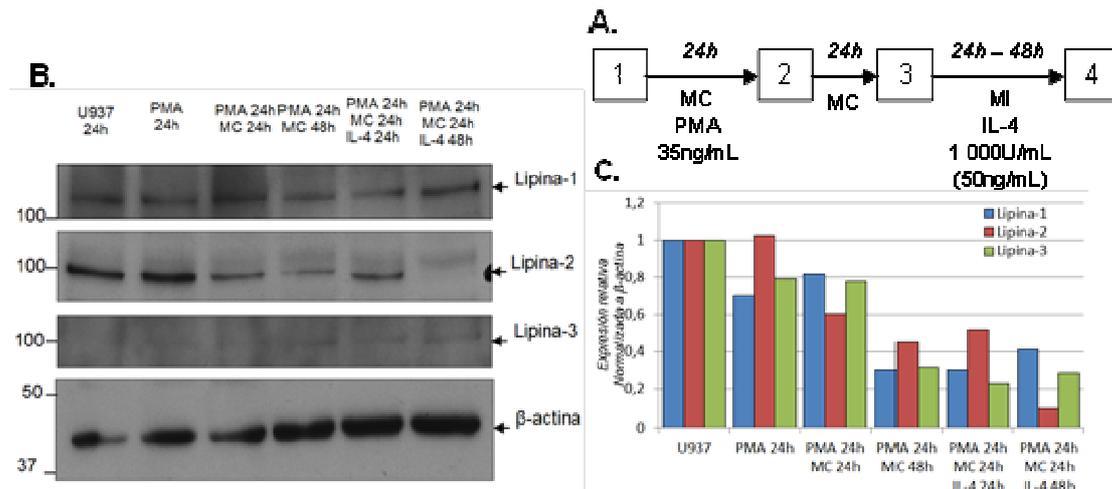


Figura 2. Expresión de la familia lipina en el protocolo de diferenciación 1 de la línea celular U937. A) El protocolo de diferenciación 1 consiste en tratar a las células durante 24h con 35ng/mL de PMA en medio completo, posteriormente se retira el PMA y se las deja estabilizarse, crecer y terminar de madurar en medio completo durante 24h. La polarización puede realizarse el día tres estimulando a las células con 1 000U de IL-4 durante el tiempo oportuno entre 24 y 48h. B) Se realizaron lisados celulares de las células obtenidas durante los tiempos indicados y se analizó por inmunoblot cada uno de los miembros de la familia lipina y la β -actina como control de carga. C) La intensidad de las bandas proteicas obtenidas se cuantificó con respecto a la β -actina utilizando el software QuantityOne (Bio Rad).

Dado que el primer protocolo no cumplía nuestras expectativas, decidimos probar un segundo protocolo, resumido en la figura 3 A. La expresión de lipina-2 analizada por inmunoblot tiene un comportamiento errático en células activadas con IL-4 con respecto a las células control, disminuyendo a las 24 horas, aumentando a las 30 horas y manteniéndose a las 36 horas de tratamiento (Fig. 3 B y C). En ningún caso, estos datos correlacionan con los resultados observados en células primarias humanas.

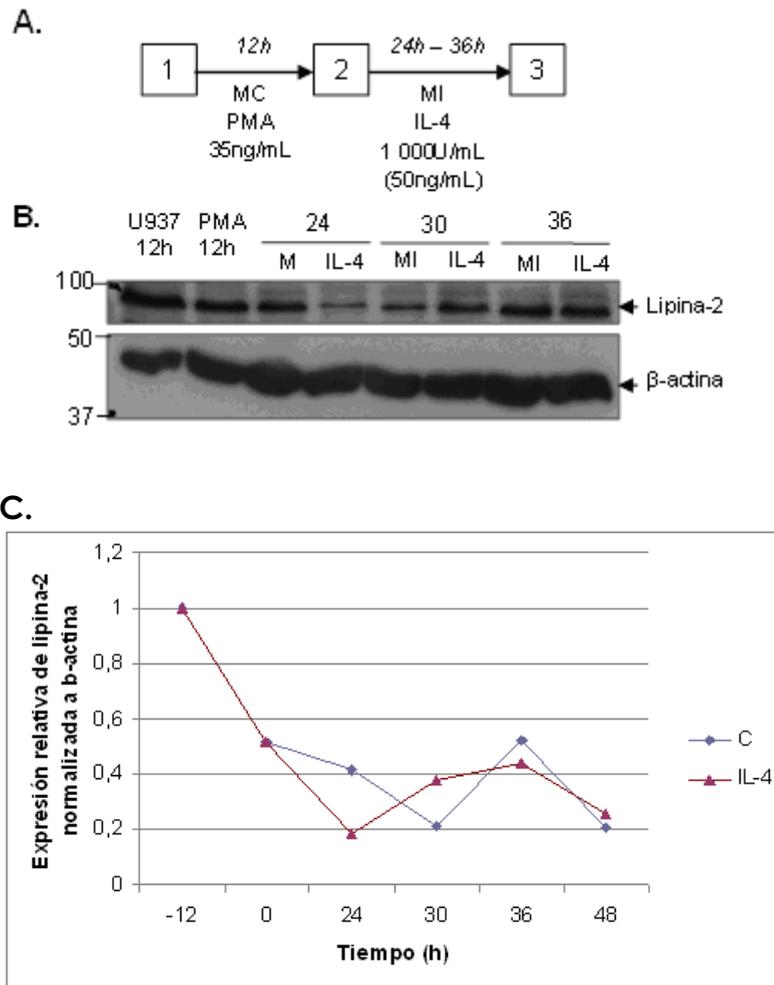


Figura 3. Expresión de lipina-2 en el protocolo de diferenciación 2 de la línea celular U937. A) El protocolo de diferenciación 2 consiste en tratar a las células durante 12h con 35ng/mL de PMA en medio completo y posteriormente reemplazarlo por IL-4 1000U en medio incompleto durante 24-36h. B) Se realizaron lisados celulares de las células obtenidas durante los tiempos indicados y se analizó por inmunoblot la lipina-2 y la β -actina como control de carga. C) La intensidad de las bandas proteicas obtenidas se cuantificó con respecto a la β -actina utilizando el software QuantityOne (Bio Rad).

Por último decidimos probar un tercer protocolo antes de abandonar el modelo. Las condiciones de este tercer protocolo están resumidas en la figura 4 A. En este caso, la expresión de lipina-2 aumentaba por tratamiento con PMA y aumentaba aún más tras polarización con IL-4. (Fig 4 B y C). El problema de este protocolo es que el aumento de expresión de lipina-2 no era reproducible, por lo que decidimos abandonar el modelo celular U937.

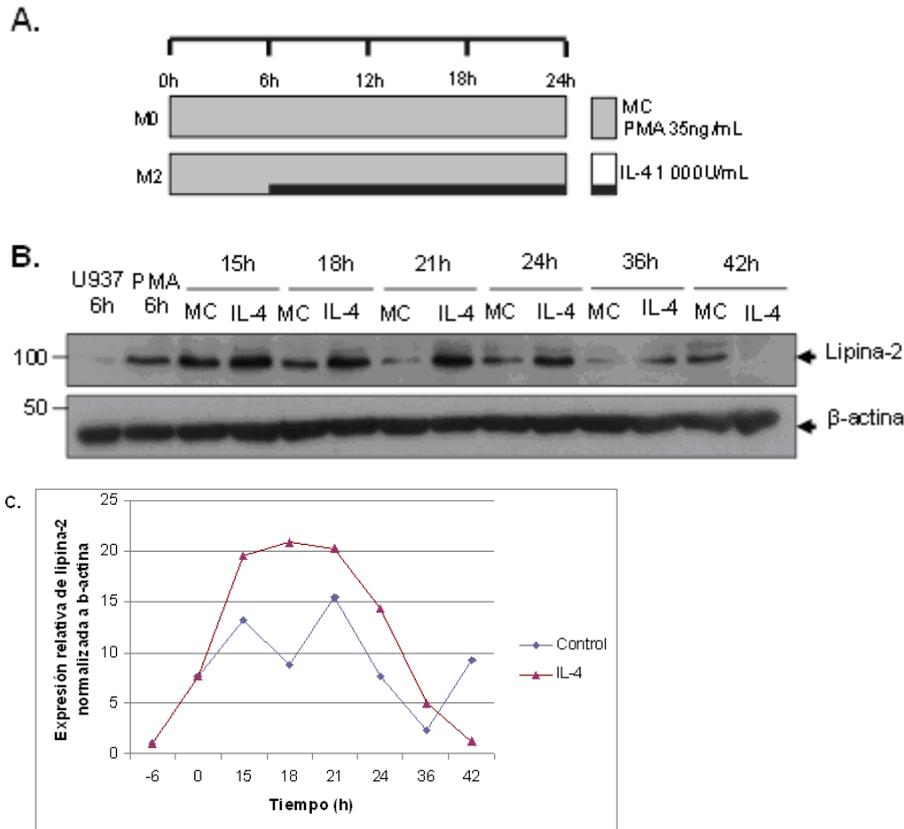


Figura 4. Expresión de lipina-2 en el protocolo de diferenciación 3 de la línea celular U937. A) El protocolo de diferenciación 3 consiste diferenciar y polarizar simultáneamente. Para ello, se trata a las células con 35ng/mL de PMA en medio completo y a las 6 horas se añaden 1 000U de IL-4 al medio completo con PMA y se deja el tiempo oportuno. B) Se realizaron lisados celulares de las células obtenidas durante los tiempos indicados y se analizó por inmunoblot la lipina-2 y la β-actina como control de carga. C) La intensidad de las bandas proteicas obtenidas se cuantificó con respecto a la β-actina utilizando el software QuantityOne (Bio Rad).

3.3. Expresión de lipina-2 en macrófagos murinos durante el proceso de polarización anti-inflamatoria mediado por IL-4.

Dado que el modelo celular U937 no funcionó como esperábamos, decidimos ver que ocurría durante la polarización anti-inflamatoria en un modelo celular murino. Para ello, obtuvimos macrófagos peritoneales y macrófagos derivados de medula ósea de ratones Swiss machos de 2-3 meses de edad, según el procedimiento descrito en material y métodos.

En macrófagos peritoneales, la expresión de lipina 2 medida por inmunoblot, aumenta tras tratamiento con IL-4 hasta alcanzar su punto máximo a las 24h (Fig. 5 A y B). Por el contrario, en los macrófagos derivados de medula ósea no se observó ningún aumento destacable en la expresión de lipina-2 (Fig. 5 A y C).

Por tanto, decidimos emplear macrófagos peritoneales polarizados con IL-4 durante 24h para ulteriores experimentos.

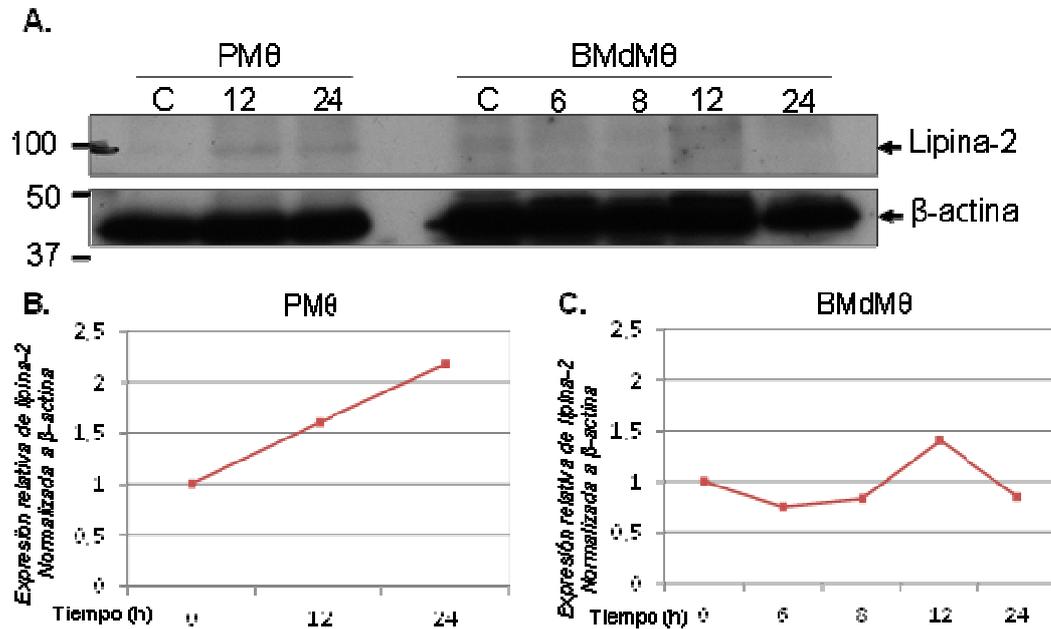


Figura 5. Expresión de lipina-2 en macrófagos murinos polarizados con IL-4. A) Los macrófagos fueron obtenidos según los protocolos descritos en materiales y métodos y posteriormente tratados con 20ng/mL de IL-4 los tiempos indicados. En control corresponde a las células sin tratar recogidas a la vez que el último punto (24h). Se realizaron lisados celulares de las células obtenidas y se analizó por inmunoblot la lipina-2 y la β -actina como control de carga. B y C) La intensidad de las bandas proteicas obtenidas para macrófagos peritoneales (B) o para macrófagos derivados de medula ósea (C) se cuantificó con respecto a la β -actina utilizando el softwareQuantityOne (Bio Rad).

3.4. Ruta de señalización implicada en el aumento de expresión de lipina-2 en macrófagos peritoneales de ratón.

Dado que la IL-4 parece regular positivamente la expresión de lipina-2, decidimos analizar los mecanismos moleculares que subyacen a este aumento de expresión.

En primer lugar, para poder discernir si la regulación se produce a nivel transcripcional o traduccional, empleamos dos antibióticos que actúan a este nivel, la Actinomicina-D y la Cicloheximida. La Actinomicina-D inhibe la transcripción mediante su unión al ADN en el complejo de iniciación de la transcripción, evitando la elongación de la ARN polimerasa 2. La cicloheximida inhibe la síntesis proteica al interferir con la actividad peptidil-transferasa de la subunidad 60S del ribosoma. Se emplearon dosis de 1 μ g/mL de Actinomicina-D y 5 μ g/mL de Cicloheximida 30min antes de la administración de la IL-4, que se dejó 24h.

Al observar la expresión de lipina-2 por inmunoblot se ve que en los controles se expresa de la forma adecuada mientras que se encuentra inhibida con ambos tratamientos (Fig. 6). Esto quiere decir que la producción de lipina-2 se debe a

procesos de transcripción y traducción. La desaparición de lipina-2 por estos tratamientos en células control podría indicar que también en condiciones de no estimulación el mRNA se está generando continuamente, aunque aumenta significativamente tras el tratamiento con IL-4.

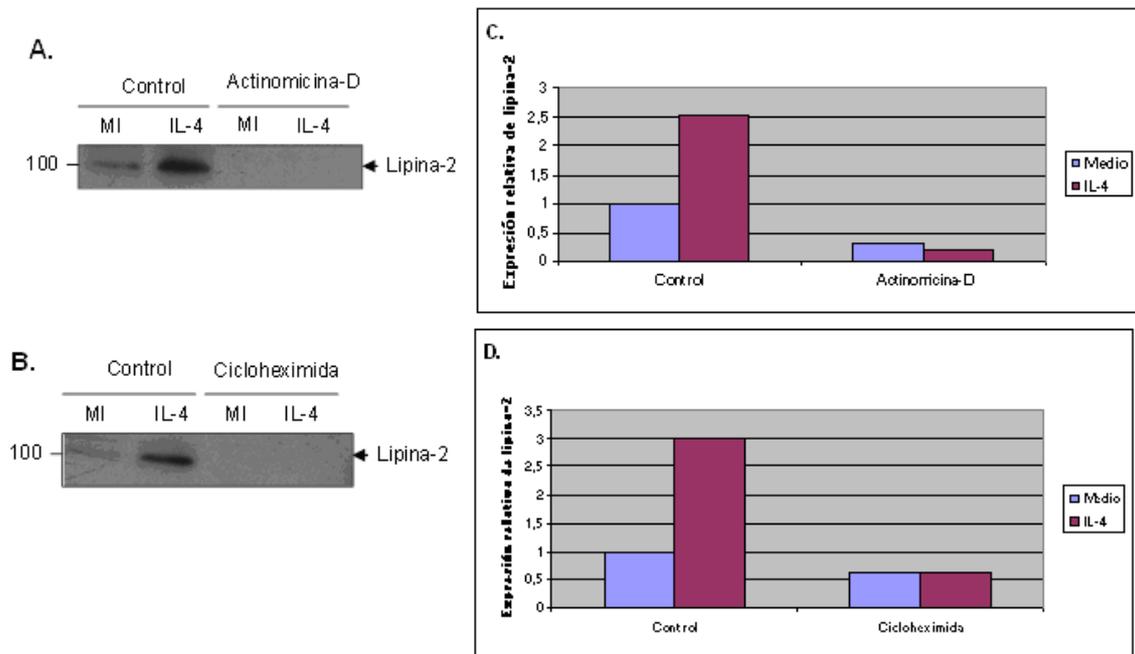


Figura 6. Efecto de inhibidores transcripcionales y traduccionales inespecíficos sobre la expresión de lipina-2. A y B) Los macrófagos peritoneales fueron tratados con Actinomycin-D (1µg/mL) (A) o Cicloheximida (5µg/mL) (B) desde 30 min antes de añadir la IL-4 hasta 24h después. Se realizaron lisados celulares de las células obtenidas y se analizó por inmunoblot la lipina-2 y la β-actina como control de carga. C) y D) La intensidad de las bandas proteicas obtenidas se cuantificó con respecto a la β-actina utilizando el softwareQuantityOne (Bio Rad).

Para dar un paso más, decidimos definir la vía de señalización cercana al receptor de IL-4 implicada en el aumento de expresión de lipina-2. Como se describió en la introducción, las tres principales vías de señalización activadas por el receptor de IL-4 son STAT6, PI3K-Akt y MAPK; para ver cuál o cuáles de ellas se encuentran implicadas decidimos emplear inhibidores farmacológicos específicos: para JAK1 1µM Ruxolitinib, para JAK3 1µM Tofacitinib, para PI3K 50nM Worthmanina y para las MAPK 3,7nM PD 98,059, añadidos 30min antes que la IL-4. Dado que hasta el momento no se comercializan inhibidores específicos para STAT6 no podemos analizar directamente la inhibición de este factor.

Al analizar la expresión de lipina-2 por inmunoblot lo primero que hay que hacer notar es que en este caso el control de activación por IL-4 no funcionó de la forma esperada (pensamos que en este pocillo hubo algún error). Aun así, el Tofacitinib, la Worthmanina y el PD-98,059 redujeron la expresión de lipina-2 en las células polarizadas, mientras que con el Ruxolitinib **no** afectó dicha expresión (Fig 7).

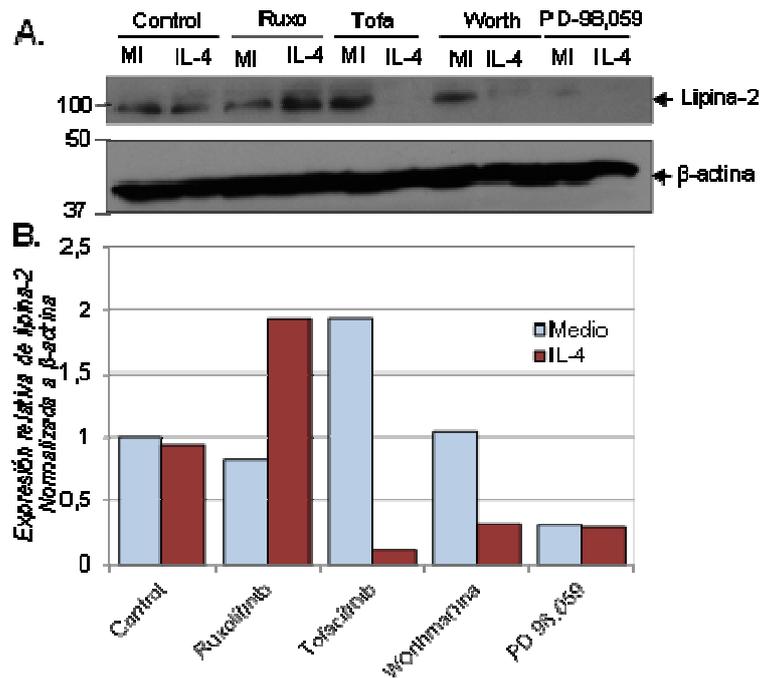


Figura 7. Efecto de inhibidores de las vías de señalización del receptor de IL-4 sobre la expresión de lipina-2. A) Los macrófagos peritoneales fueron tratados con Ruxolitinib (1 μ M), Tofacitinib (1 μ M), Worthmanina (50nM) o PD 98,059 (3,7nM) desde 30 min antes de añadir la IL-4 hasta 24h después. Se realizaron lisados celulares de las células obtenidas y se analizó por inmunoblot la lipina-2 y la β -actina como control de carga. B) La intensidad de las bandas proteicas obtenidas se cuantificó con respecto a la β -actina utilizando el softwareQuantityOne (Bio Rad).

3.5. Protocolo de activación del inflammasoma en macrófagos peritoneales de ratón.

Para estudiar la relación funcional entre la lipina-2 y el inflammasoma, se decidió poner a punto un protocolo de activación de inflammasoma para macrófagos peritoneales que consiste en “*primar*” a las células durante 3h con LPS (200ng/mL) y posteriormente activar el inflammasoma con ATP (2mM) durante 40min, recogiendo tanto los lisados celulares como los sobrenadantes. En esta prueba también se empleó propranolol (150 μ M) como inhibidor inespecífico de la actividad PAP, pero resultó tóxico para las células y no se obtuvo suficiente proteína en los lisados ni en los sobrenadantes para realizar un inmunoblot.

En el análisis por inmunoblot de la expresión de IL-1 β se observa que en las células primadas con LPS se acumula la forma inmadura (p35) en el citoplasma y se libera muy poca al medio; sin embargo, al activar las células con ATP se observa como la forma inmadura es procesada y liberada al medio masivamente como forma madura (p17) (Fig. 9).

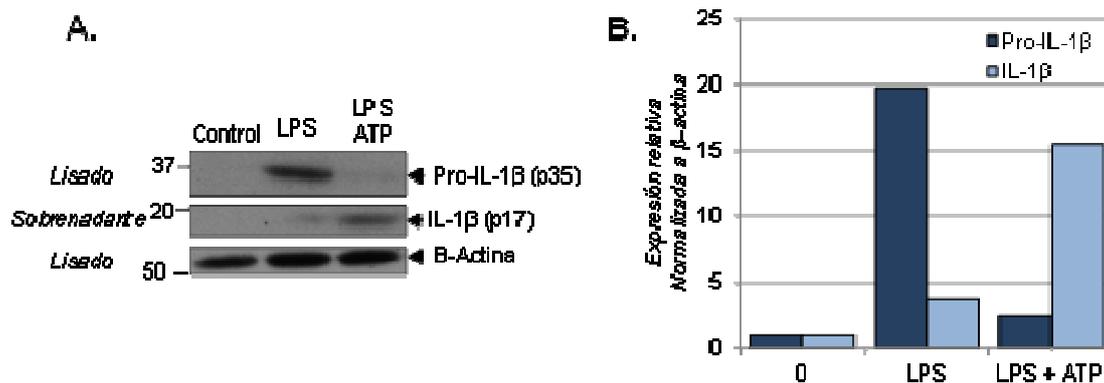


Figura 9. Protocolo de activación del inflammasoma en macrófagos peritoneales. A) Los macrófagos peritoneales fueron tratados con LPS (200ng/mL) durante 3h y posteriormente tratados con ATP (2mM) durante 40min. Se recogieron los sobrenadantes y realizaron lisados celulares de las células obtenidas y se analizó por inmunoblot la expresión y el estado de maduración de la IL-1 β . Además se analizó la β -actina como control de carga. B) La intensidad de las bandas proteicas obtenidas se cuantificó con respecto a la β -actina utilizando el softwareQuantityOne (Bio Rad).

3.6. Expresión de la familia lipina en el espectro de polarización y reversión de la polarización en macrófagos peritoneales de ratón.

Para poder analizar el posible papel de lipina-2 en el contexto de un gradiente dinámico de polarizaciones, en primer lugar se reprodujo el protocolo publicado por Pelegrin et al. (8, 9) en particular las condiciones M1 (LPS 1 μ M, INF γ 20ng/mL 4h), M2 (IL-4 20ng/mL 4h) y M1 \rightarrow M2 (LPS 1 μ M, INF γ 20ng/mL 4h > Lavado > IL-4 20ng/mL 4h) y se analizó la expresión génica por qPCR de marcadores M1, M2 y las proteínas de la familia lipina para corroborar si funcionaba adecuadamente y como afectaba el cambio de polarización a la expresión génica de las lipinas.

Como se esperaba, la expresión de genes pro-inflamatorios (Cox-2, Nos2 e Il6) aumenta fuertemente durante la polarización M1, y disminuye en el paso a la polarización M2 (Fig. 10 A). Por el contrario, la polarización M2 aumenta la expresión de la Arginasa-1 (un gen relacionado con la polarización M2 en ratones) y es mínima en el estado M1 (Fig. 10 B).

Con respecto a la expresión de los genes de la familia lipina, las dos isoformas de lipina-1 aumentan tenuemente durante la polarización M2, pero sus valores máximos se encuentran tan próximos al basal que más parece que realmente lo que está ocurriendo es que su expresión está siendo bloqueada por el tratamiento M1. Por el contrario, la lipina-2 aumenta gradualmente desde los M1 hasta una expresión tres veces superior en los M2, pasando por una expresión intermedia en el cambio de polarización M1 \rightarrow M2. Con respecto a la lipina 3, su expresión es inferior al basal en los estados de polarización extrema y aumenta, incluso más que la lipina-2, en el cambio de polarización (Fig. 10 C).

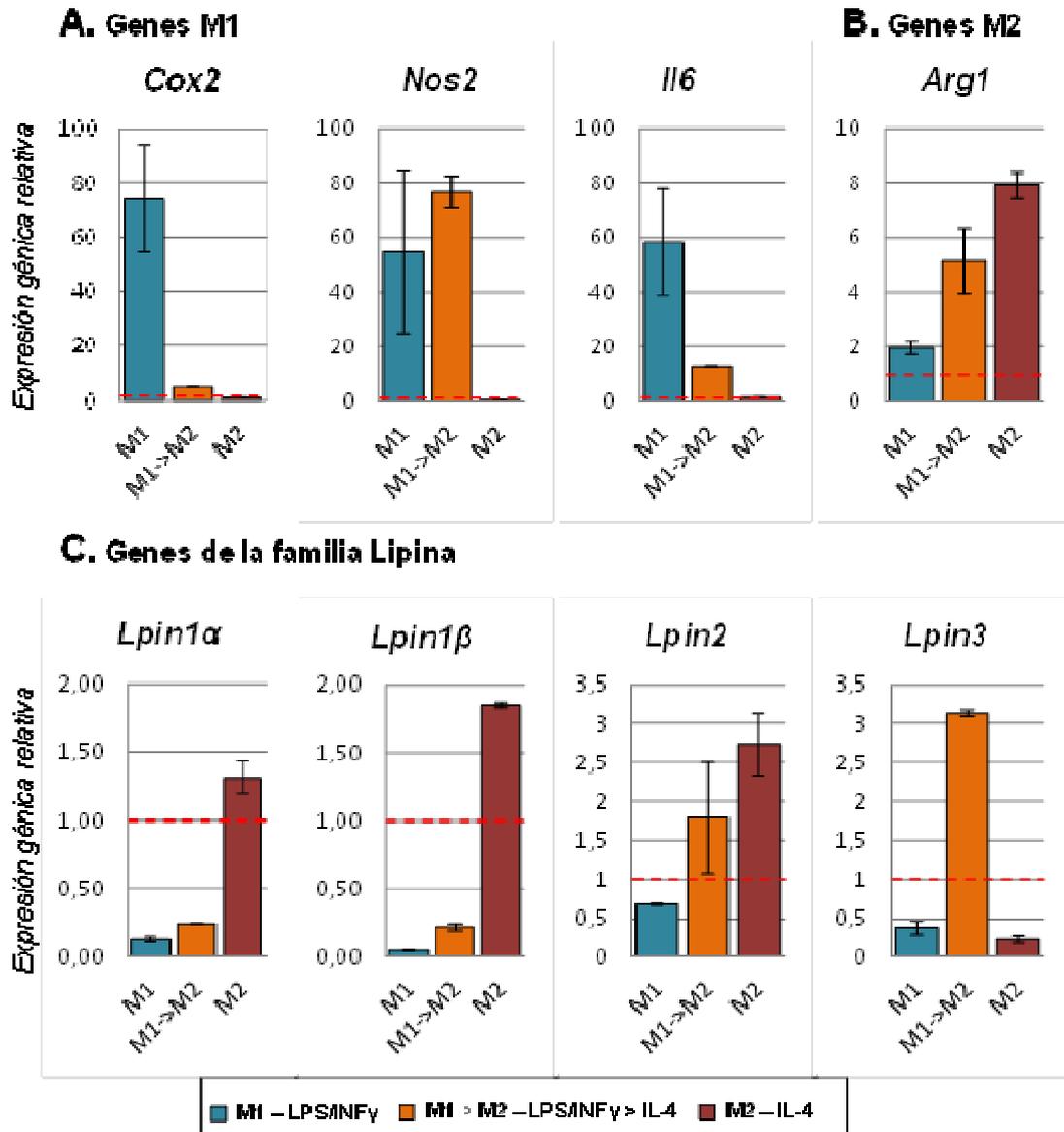


Figura 10. Expresión de genes representativos de los estados M1, M2 y de la familia lipina durante el gradiente de polarización macrofágica. PCR cuantitativa (qPCR) de genes representativos del estado M1 (*Cox2*, *Nos2*, *Il6*) (A), el estado M2 (*Arg1*) (B) y de la familia lipina (*Lpin1α*, *Lpin1β*, *Lpin2* y *Lpin3*) (C) durante el gradiente de polarización descrito en material y métodos. Los datos han sido normalizados a GAPDH y relativizados a sus controles sin tratar. La expresión basal de los controles sin tratar ha sido representada por la línea de guiones rojos. Los datos son el promedio de reacciones por duplicado.

4. Discusión.

A la vista de las siguientes evidencias: 1. el síndrome de Majeed ocurre por mutaciones en lipina-2; 2. en estos pacientes se observa un aumento de IL-1 β en el suero; 3. la IL-1 β se libera tras la activación del inflammasoma; 4. la lipina-2 tiene en macrófagos una función antiinflamatoria; y 5. Experimentos preliminares del laboratorio indican que en macrófagos polarizados a M2 la expresión de lipina-2 aumenta. Con estas observaciones nos planteamos si lipina-2 puede ser un regulador negativo del inflammasoma y si su aumento de expresión durante la polarización antiinflamatoria de los macrófagos puede ser determinante para que el inflammasoma esté inhibido. Esta idea explicaría porque la falta de función de lipina-2 produce una enfermedad inflamatoria como el síndrome de Majeed. La inflamación en este síndrome no se resolvería porque al no haber actividad lipina-2 el inflammasoma no está inhibido en los macrófagos M2, produciéndose IL-1 β de forma incontrolada. También pudiera ocurrir que lipina-2 controle el paso de polarización de M1 a M2 o simplemente la polarización a M2 de alguna manera.

Para poder explorar todas estas ideas necesitábamos poner a punto muchos sistemas experimentales, y eso es lo que he intentado en este trabajo experimental. Nuestra primera aproximación fue corroborar los datos preliminares de expresión de lipina-2 en macrófagos humanos polarizados a M2 mediante inmunoblot. Los resultados obtenidos indican que lipina-2 aumenta sus niveles hasta las 24 horas de estimulación por IL-4 y a partir de ahí se estabilizan. Por lo que ya teníamos asentada la base de nuestro estudio. Después necesitábamos establecer un modelo con el que poder realizar los estudios con mayor facilidad, pues los macrófagos humanos necesitan de un periodo de 7 días para diferenciarse y son difíciles de obtener. Se escogió la línea celular humana U937, pre-pro-monocítica diferenciada con PMA. Pero tras probar tres protocolos distintos de activación/polarización, y a pesar de que en el último protocolo si se observaba un buen aumento de lipina-2, este modelo fue descartado pues no era reproducible el comportamiento de los controles. Al final pusimos a punto un sistema basado en macrófagos peritoneales de ratón. En este modelo, la IL-4 regula positivamente la expresión de lipina-2 dependiendo de procesos de transcripción y traducción. Tras analizar por inhibidores específicos los mecanismos por los que la IL-4 produce la inducción de lipina-2, observamos que las tres rutas posibles de inducción génica dependiente de IL-4: JAKs, PI3K y MAPKs están implicadas en esta inducción. Está claro que el factor de transcripción regulado por las kinasas JAK es STAT6, PI3K a través de AKT podría regular NF- κ B y MAPKs regula fundamentalmente factores de transcripción de la familia de AP-1. En un futuro habría que comprobar en el promotor de lipina-2 si están estos sitios, si son activos y si se regulan por IL-4.

Por otro lado hemos puesto a punto un sistema de activación celular por LPS+ATP que nos permite estudiar bien la activación del inflammasoma.

También hemos puesto a punto un sistema de polarización de macrófagos murinos que nos permitirá conocer si la lipina2 es importante o no para el paso de M1 a M2 o únicamente para la polarización M2, o para ninguna de estas dos cosas.

Regulación y papel de lipina-2 en macrófagos

Alba Terán García

Aún queda mucho por hacer, pero creo que los objetivos básicos de la presente memoria se han cumplido en la medida de lo posible.

5. Conclusiones.

- Aumento en la expresión de lipina-2 por IL-4.
- Este aumento se regula a nivel transcripcional y traduccional.
- Y las tres rutas posibles de inducción génica dependiente de IL-4: JAKs, PI3K y MAPKs están implicadas.
- Puesta a punto de un sistema de polarización en macrófagos murinos que nos permite estudiar la expresión de lipina-2 y sus efectos en M1, M2 y en la transición $M1 \rightleftharpoons M2$.
- Confirmación por qPCR que los marcadores típicos de estos macrófagos son los correctos y que lipina-2 aumenta en el paso de M1 a M2 y disminuye en la transición contraria.
- Puesta a punto de un sistema de activación celular por LPS+ATP que nos permite estudiar bien la activación del inflamasoma.
- Descarte de la línea celular U937 para el estudio de lipina-2.

6. Bibliografía.

(1) Csaki L. S. et al. Lipins, Lipinopathies, and the Modulation of Cellular Lipid Storage and Signaling. Elsevier 52: 305-316, 2013.

(2) Bernard P. C. Kok et al. Unlike Two Peas in a Pod: Lipid Phosphate Phosphatases and Phosphatidate Phosphatases. Chemical Review 112: 5121-5146, 2012.

(3) Esquinas M. E. 2012. Localización y función de la lipina-1 en macrófagos. Tesis doctoral. Universidad de Valladolid.

(4) Herlin T. et al. Efficacy of anti-IL-1 treatment in Majeed syndrome. Ann Rheum Dis. 72: 410-413, 2013.

(5) Ferguson P. J. et al. Homozygous mutations in LPIN2 are responsible for the syndrome of chronic recurrent multifocal osteomyelitis and congenital dyserythropoietic anaemia (Majeed syndrome). J. Med. Genet. 42: 551-557, 2005.

(6) Eder C. Mechanisms of interleukin-1 β release. Immunobiology 214: 543-553, 2009.

(7) Stutz S. Inflammasomes: too big to miss. The Journal of Clinical Investigation 119: 3502-3511, 2009.

(8) Pelegrin P. et al. Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1 β release through pyrophosphates. The Embo Journal 28: 2114-2127, 2009.

(9) López-Castejón G. et al. Novel macrophage polarization model: from gene expresión to identification of new anti-inflammatory molecules. Cellular and Molecular Life Sciences 68: 3095-3107, 2011.

(10) Gordon S. et al. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. Immunity 32: 593-604, 2010.

(11) Wang HW. Alternative activation of tumor-associated macrophages by IL-4. Cell Cycle 9: 4824-4835, 2010.

(12) Martinez FO et al. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. Annu Rev Immunol 27: 451-483, 2009.

(13) Heller NM et al. Type I IL-4 Receptors Selectively Activate IRS-2 to Induce Target Gene Expression in Macrophages. Sci Signal. Author manuscript, 2009.

Regulación y papel de lipina-2 en macrófagos

Alba Terán García

(14) Shuai K. et al. Regulation of Jak-STAT signalling in the immune system. *Nature Reviews Immunology* 3: 900-911, 2003.

(15) Valdearcos M. et al. Lipin-2 Reduces Proinflammatory Signaling Induced by Saturated Fatty Acids in Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* 287: 10894-10904, 2012.