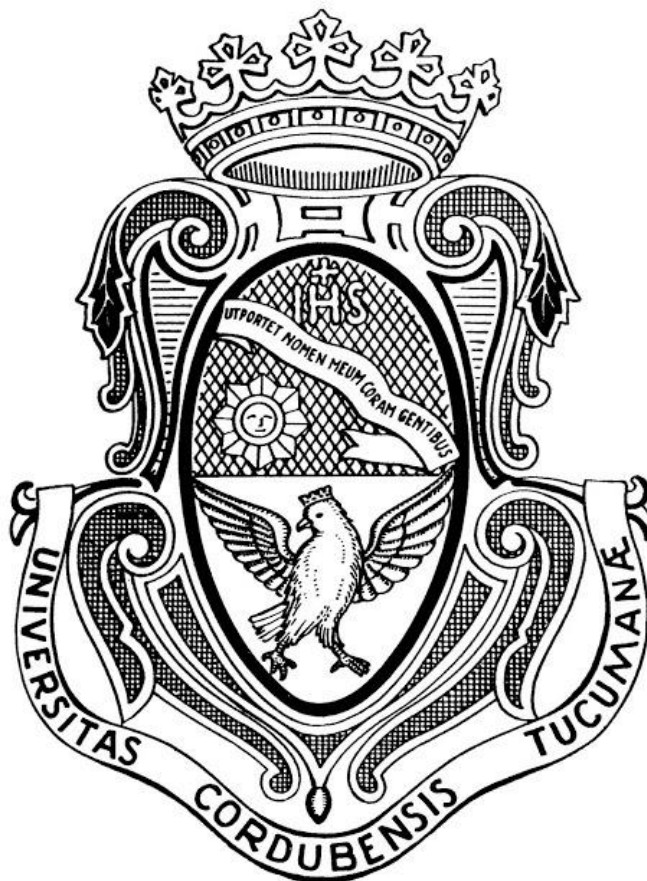


TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

MATIAS MAXIMILIANO VAZQUEZ



Departamento de Bioquímica Clínica

CIBICI-CONICET

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

Córdoba, Argentina

Año 2019

**Estudio del mecanismo de acción de
mediadores lipídicos electrofílicos
(nitrolípidos) sobre la modulación
del metabolismo de colesterol en
macrófagos. Participación en la
expresión y funcionalidad de CD36**

DIRECTOR DE TESIS:

Prof. Dr. Gustavo R. Bonacci

COMISIÓN ASESORA:

Prof. Dra. Claudia Bregonzio

Prof. Dr. José Luis Daniotti

Prof. Dr. Gustavo A. Chiabrando

EVALUADOR EXTERNO:

Prof. Dr. Darío Ramírez

El presente trabajo de tesis se realizó gracias al aporte de la Beca Interna Doctoral CONICET y a los subsidios provistos por las siguientes instituciones: CONICET, FONCYT y SECyT-UNC.

A la memoria de Rosita.

A Roxana y Omar.

A Leonela, Sofía y Uma.

A José.

“Me costó mucho tiempo comprender de dónde venía. El principito, que me hacía muchas preguntas, jamás parecía oír las mías. Fueron palabras pronunciadas al azar, las que poco a poco me revelaron todo. Así, cuando distinguí por vez primera mi avión (no dibujaré mi avión, por tratarse de un dibujo demasiado complicado para mí) me preguntó:

— ¿Qué cosa es esa? —Eso no es una cosa. Eso vuela. Es un avión, mi avión. Me sentía orgulloso al decirle que volaba. El entonces gritó: — ¡Cómo! ¿Has caído del cielo?

—Sí —le dije modestamente.

— ¡Ah, que curioso!

Y el principito lanzó una graciosa carcajada que me irritó mucho. Me gusta que mis desgracias se tomen en serio.

Y añadió: —Entonces ¿tú también vienes del cielo? ¿De qué planeta eres tú? Divisé una luz en el misterio de su presencia y le pregunté bruscamente:

— ¿Tu vienes, pues, de otro planeta?

Pero no me respondió; movía lentamente la cabeza mirando detenidamente mi avión.

—Es cierto, que, encima de eso, no puedes venir de muy lejos...

Y se hundió en un ensueño durante largo tiempo. Luego sacando de su bolsillo mi cordero se abismó en la contemplación de su tesoro.

Imagínense cómo me intrigó esta semiconfidencia sobre los otros planetas. Me esforcé, pues, en saber algo más:

— ¿De dónde vienes, muchachito? ¿Dónde está "tu casa"? ¿Dónde quieres llevarte mi cordero?

Después de meditar silenciosamente me respondió:

—Lo bueno de la caja que me has dado es que por la noche le servirá de casa.

—Sin duda. Y si eres bueno te daré también una cuerda y una estaca para atarlo durante el día.

Esta proposición pareció chocar al principito.

— ¿Atarlo? ¡Qué idea más rara!

—Si no lo atas, se irá quién sabe dónde y se perderá...

Mi amigo soltó una nueva carcajada.

— ¿Y dónde quieres que vaya?

—No sé, a cualquier parte. Derecho camino adelante...

Entonces el principito señaló con gravedad:

— ¡No importa, es tan pequeña mi tierra!

Y agregó, quizás, con un poco de melancolía:

—**Derecho, camino adelante... no se puede ir muy lejos.**”

-El Principito

Antoine De Saint-Exupéry

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

La parte más difícil para personas como yo, más allá de lo científico y académico, es lograr expresar lo agradecido que estoy y lo mucho que valoro el pequeño o gran aporte que realiza cada una de las personas con las que me rodeo. Creo que la vida está definida por las decisiones que tomamos, las que no tomamos, las personas que entran y las que salen en nuestro camino. Siempre dije, sigo sosteniendo y también juntando evidencia, que Dios atrae y mantiene en mi vida a gente buena, con valores, buenas energías y que me llenan de aprendizajes.

Estos casi 5 años de trabajo no solo se deben a mí, sino también a las personas que me ayudaron, que me motivaron durante este proceso, que estuvieron ahí para levantarme si tropezaba.

En primer lugar quiero agradecer a mi director, Gustavo. Lo que considero más valioso de vos Gus, es que siempre fuiste eso: "Gus", "Pelado", "Bonacci", antes que un director o un jefe. Gracias por ser una persona antes que un científico, gracias por tu moral, por tus valores, gracias por todo lo que me enseñaste en este tiempo y no solo hablo de lo científico y el criterio que me transmitiste, sino también por enseñarme de la vida, de política, de economía (que soy un queso y lo sigo siendo, pero capaz un poco menos), de deporte. Gracias por darme lugar, por dejarme ser, por la libertad que me diste en cada ensayo, en cada experimento, en cada idea loca que se me ocurría que podía funcionar. Gracias por flexibilizar tus estructuras, por adaptarte, por respirar hondo más de una vez antes de matarme. Sinceramente, más allá de los traspies científicos que hemos experimentado, disfrute mucho de tu presencia, de tu compañía, de nuestras charlas de psicología, de filosofía. Gracias por escucharme, por hacerte escuchar. Te deseo lo mejor en tu carrera científica, confío totalmente en tus capacidades, te considero una persona inteligente, con pensamiento crítico y súper capaz de lograr cualquier objetivo que se proponga. Creo que tenés todas las herramientas para explotar si así lo querés. Espero que hayas aprendido de esta experiencia tanto como yo.

A Ceci y Chiabrandro, gracias por engendrar esta familia, por mantener los lazos que hacen que seamos un laboratorio armónico. Gracias Chiab por tu optimismo y tu buena onda, por siempre encontrar el lado positivo en cada resultado, por la motivación a que todo se puede transformar y transmutar a algo útil. Gracias Ceci por la compañía, por el apoyo, por las buenas energías que traes todos los días al lab, por las charlas de viajes, de moda, de comidas y esas cosas que nos llevaban ratos entretenidos y distendidos de la ciencia.

Gracias Barça por el humor, por los chistes (bastante malos algunos). Admiro mucho la forma en la que tomas tu trabajo, tu buen humor siempre ante todo, el optimismo frente a cualquier situación, el ponerle el pecho y seguir.

Magui gracias por tu ayuda, por la predisposición a enseñarme, por transmitirme tus TOCs, por tus consejos, por incentivar la birra de cada semana. Te admiro mucho, te considero una excelente investigadora, con objetivos claros y con potencial para llegar más lejos de lo que vos crees.

Gracias Pauli por tus buenas energías todo el tiempo, por tus "esta bárbaro" o "buenísimo Maxi", que pueden sonar banales pero en momentos de dudas e inestabilidades ayudan un montón, motivan y te hacen sentir un poquito más capaz.

Gracias Coti por aturdirme todos los días jaja, nah mentira, pero si gracias por distraernos, por sacarnos charla (a veces por demás), por sacarnos de la rutina diaria con tus experiencias. Gracias por abrirme lugar a discutirte tanto, por haberme permitido intentar sacarte de tus esquemas, gracias por escucharme, escuchar mis posturas y aceptarlas.

Gracias Vicky A por apoyarme en esas discusiones con la Coti, así podíamos ser dos contra uno jaja, gracias por subir la música cuando queríamos bajar la mala onda, gracias por los protocolos y por correr los pies del cañito para que yo pusiera los míos jaja.

A las Vickys (x3), gracias por todos los momentos compartidos, adentro y afuera del lab. Logramos engendrar un vínculo de distensión, de poder compartir birras, cenas, meriendas, salidas...

Vicky V, gracias por tu amistad, por tus ganas de hacer cosas, por compartir, por escucharme, por pelearme cada vez que jugábamos un juego de mesa, por tus piropos y tu buena onda. Te quiero un montón a pesar de ser un "arrogante de m" jugando al Tabú.

Gracias Vicky G por ser mi compañera de mesada, por aguantar mis días de malos humores, por dejarme enseñarte lo poco que sabía. Gracias por además de ser una excelente compañera de experimentos, también ocupaste un lugar de amistad, me escuchaste, me dejaste escucharte, me aconsejaste, me diste lugar a que yo te aconseje. Gracias por esta amistad, te deseo lo mejor en esta etapa, sé que sos capaz de mucho y que vas a tener re mil éxito.

Gracias al resto de los personajes que forman parte de esta gran familia del lab 8, por compartir las tareas de docencia. Gracias Darío y Cesar por dejarnos aprender de su experiencia en la docencia, gracias Dari por pensar en mí para entrar en el lab, aunque haya sido tu segunda opción jaja. Gracias a todos lo que pasaron por el lab 8 y los que intermitentemente aún pasan, Danilo, Pablo, Nico.

Gracias Belu por acompañarme en mis primeros pasos en el lab, mis primeros pasos con los nitrolípidos, no te voy a decir que me enseñaste a quererlos porque renegabas bastante y porque me llevo bastante tiempo empezar a quererlos también jaja.

Gracias a la facultad, a todo el departamento por hacer de este instituto un lugar óptimo de trabajo y crecimiento. Gracias a las secres, gracias Adri por ayudarme con cada papel, por explicarme mil veces como llenarlos, por volver a buscarme cuando me olvidaba firmas, por hacer de manera excelente tú trabajo. Gracias Ceci, Laura, Ale de cultivo, a todo el staff de cultivo Lau Gatica y Gabi Furlan.

Gracias a las chicas de posgrado por su eficiencia y sus ganas de colaborar, gracias Betina por la paciencia. La volví un poco loca el último tiempo.

Gracias a la gente de Pitt, al laboratorio de Bruce y de Francisco. Gracias por siempre haberme recibido tan cálidamente, por hacerme parte del lab, por la ayuda. Gracias Greg, Soma, Crystal, Marco, Dario, Maria.

Gracias Sonia y Francisco, no solo por la excelente ayuda académica, experimental sino también por hacerme parte de sus familias, de sus días durante mi estadía. Gracias Fran por equiparme el departamento.

I would also like to thank Bruce, who is not just an incredible scientific but also a great person. Thank you for receiving me at your lab with open arms, for your good vibes before anything

else. Thank you for making me feel like home and for letting me know that you were glad to have me in Pitt. I loved your city and I hope to be back very soon.

Yendo un poco más allá del contexto académico en el que transcurrí estos últimos años, nada hubiese sido posible sin la gente que me acompañó día a día, los de siempre, los nuevos, los no tan nuevos, los que entraron y salieron, los que entraron y se quedaron. A todos gracias, gracias porque de todos me llevo algo positivo, un aprendizaje, una creencia, una costumbre, una experiencia.

Gracias ma, gracias por todo, ojalá me alcanzaran las hojas de esta tesis o de mil tesis más para agradecerte todo lo que haces por mí. Gracias por enseñarme valores, gracias por mostrarme que con sacrificio todo se puede, gracias por mostrarme que no hay límites, gracias por creer en mí, por apoyarme, por apoyar todas mis locuras, por ese respaldo incondicional, por ser mi mamá, pero también un poco mi amiga y psicóloga. Gracias por la paciencia, por enseñarme que no está mal equivocarse, que siempre se puede volver a empezar y que siempre va a ser para mejor. Te amo!

Gracias Pa, gracias por tu presencia silenciosa, gracias porque aunque no digas nada yo sé que estas, yo sé que te tengo ahí a un paso para lo que necesite. Gracias por confiar en mí, por apoyarme, por ser mi respaldo, por tus consejos, por tus charlas, por entender que podemos ser distintos, que podemos pensar diferente pero podemos convivir en esa diferencia siempre preponderando el amor. Gracias por todo, te amo.

A mis hermanas, las mujeres más lindas que pisan la tierra, gracias por esa energía que le ponen a la vida (aunque a veces se excedan un poco). Gracias por enseñarme que la vida se puede tomar de otra forma, que se puede disfrutar de los detalles, de las pequeñas cosas.

Gracias Sofo de mi corazón por tu compañía, porque sin hablar nos entendemos, porque no hacen falta palabras para sentir el apoyo, porque no hace falta ser explícito para saber cuándo tenemos que estar, gracias por dar por sentado cosas que con el resto son tan difíciles de plantear, siempre estás un paso adelante en todo. Te admiro y te amo.

Leo, no puedo evitar que el pensar en todo lo que te tengo que agradecer haga que se me llenen los ojos de lágrimas, hemos compartido tanto juntos, hemos sido cómplices de tantas cosas, lindas y feas, pero siempre me recuerdo así, con vos, paradito al lado tuyo, siendo uno los dos. Todo nos hizo unirnos cada vez un poco más. Gracias por ser tan relajada, gracias por mostrarme que las estructuras a veces no son tan divertidas, gracias por motivar la unión en familia todo el tiempo. Gracias por ser tan linda, pero no solo por fuera, por dentro, por parecer que nada te importa, que nada te conmueve y tener un corazón gigante, por sensibilizarte con los más vulnerables y nunca alardear de eso. Gracias por el regalo más lindo de los últimos 5 años, gracias por traernos a Uma, porque nos alegra los días, porque los domingos son más divertidos con la pequeña correteando por la casa, o calladita haciendo alguna macana. Te amo gorda, gracias por ser!

A los amigos de siempre, a esos que ocuparon lugares más grandes o más chicos en función de la vida, de las circunstancias, pero siempre están. El tiempo no nos pasa. Gracias Joha, Caro, Albert.

Gracias Emi, por nuestra amistad, porque aunque pase el tiempo y ya no nos llamemos todos los días, los dos sabemos que levantamos el teléfono y estamos ahí, para escuchar, para

festejar, para abrazar, para lo que sea. Te quiero rubia linda. QUE VINTAGE LO DE LEVANTAR EL TELEFONO!!!

Negrita, QUE CARAJO! Por dónde empezar? Tantos momentos, tantas vivencias. Te volviste mi familia, sos la hermana que elegí. Gracias por estos intensísimos años juntos, gracias por ser mi pierna derecha, gracias por levantarme cada vez que caí, gracias por liberarme de culpas, gracias por tus consejos, gracias por enseñarme a encontrar la calma, gracias por “El Poder de Ahora”. Gracias por abrirte a mí tanto como yo lo hice con vos, gracias por la confianza. No puedo expresar en palabras lo crucial que has sido en estos últimos años para mí y me reconforta saber que lo sabes, porque te lo digo siempre. Nada hubiese sido igual sin vos, sin tu compañía, sin tu apoyo. Te amo negra, vamos por muchos años más de amistad!

Vale A, mi otro gran pilar cordobés, que lindo es tenerte en mi vida. Qué lindo fue haberte conocido en ese teórico de alguna “química”. Gracias por estar siempre a pesar de la distancia, gracias por tus palabras siempre tan justas, gracias por tu cálida frialdad que hace ver todo bastante más claro. Sos un ejemplo de perseverancia, de fuerza, de que todo se puede, de que no hay que quedarse en las excusas y hay que seguir, que así se construye la vida. Te amo amiga, gracias por tu incondicionalidad.

A las pampa girls, a ese grupo de mujeres tan lindas que me adoptaron como uno más de Santa Rosa. Gracias “mamis” por la compañía, por las previas, por los mates, por las charlas sin fin, por los domingos, por escucharme, por dejarme escucharlas. Gracias a todas, Pau, Cande, Lu, Mer, Ale, Chen, Shula, Nati.

A vos Vale F también, pero un poquito más especial porque sos inmensa, porque me has tenido que soportar más que cualquier otra mami, porque te amo y me diste una amistad hermosa. Gracias por las charlas con esas devoluciones sin sentido, gracias por los domingos de chipá y películas malísimas. Gracias por las salidas, por los mates, por las inestabilidades emocionales, por las tardes de sol.

A mi compañero, gracias Rich por acompañarme estos dos años y medio. Ya todo lo sabes porque te lo he repetido mil veces, ha sido difícil, nos ha costado un montón, tan solo nosotros sabemos lo que la hemos peleado. Gracias por estar siempre, por enseñarme que abandonar no es una solución, por la paciencia, por entender mis tiempos o mejor dicho, mis faltas de tiempo. Gracias por tu intensidad, por ese niño que llevas con vos, por tus despistes, por las reservas en fechas equivocadas, por los pasajes para el día siguiente al que tenían que ser. Gracias por amoldarte, por amalgamarte y querer ser feliz siempre. Sos inmenso, sos una excelente persona y me hace muy feliz compartir mi vida con vos. Gracias a tu familia por abrirme sus puertas, por el compartir desinteresado, por las buenas energías y por las ganas de vernos crecer.

Por último pero para nada menos importante, lo más difícil diría yo, es agradecerle a la persona que marco mi vida con un huella imposible de borrar, a la persona que me enseñó los valores más grandes, la persona que marcó los principios básicos de mi vida. A la persona más increíble que conocí, la persona con la moral más grande que alguna vez ví. La mejor abuela sin lugar a dudas. Gracias abue por tantos años de felicidad, por tantos años de comidas y postres preparados con amor, por tu inquebrantable compañía, por tu atención, por tus regalos, por sembrar tus principios en mí, tus ganas de saber más, de crecer, de ser mejor y no quedarte donde se supone que nos tenemos que quedar. Te amo para siempre!

Gracias Abuelo también, siempre los dos fueron uno y cuando hablaba de la abuela también pensaba en vos, gracias por tu ayuda, gracias porque sin ustedes nada de esto sería posible.

RESUMEN

La aterosclerosis es la enfermedad cardiovascular causal del mayor número de muertes prematuras en la población activa a nivel mundial. Su desarrollo se encuentra vinculado a diversos factores de riesgo como, tabaquismo, sedentarismo, dieta desbalanceada, obesidad, predisposición genética, entre otros. Alguno de estos factores o la combinación de más de uno de ellos conduce a la disfunción del endotelio vascular y la formación de la placa de ateroma llevando al estrechamiento de la luz vascular y los riesgos cardiovasculares asociados. En este contexto de disfunción endotelial y aumento de la permeabilidad, la extravasación de monocitos a la íntima de las arterias propicia un microambiente responsable de la oxidación y/o acetilación de las lipoproteínas de baja densidad y de la formación de numerosos lípidos bioactivos. Las lipoproteínas modificadas (LDLm) son incorporadas por los macrófagos tisulares a través de receptores de tipo *scavenger*, principalmente CD36 y LRP1 (*Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1*). La incorporación de LDLm por macrófagos lleva a una retroalimentación positiva en la expresión del receptor CD36 favoreciendo: mayor incorporación de lipoproteínas modificadas, excesiva acumulación intracelular de lípidos y la diferenciación a célula espumosa. CD36 es una glicoproteína de membrana que une diversos ligandos, los cuales pueden ser internalizados o también activar vías de señalización intracelular. Entre sus ligandos, además de las LDLm, se encuentran fosfolípidos oxidados y ácidos grasos de cadena larga los cuales interaccionan con una región rica en aminoácidos hidrofóbicos conocida como dominio de unión a ligandos. En este dominio del receptor se encuentra la Lys164, la cual representa un residuo crítico tanto para iniciar la señalización como para el reconocimiento e internalización de sus ligandos.

En el proceso inflamatorio crónico, en el cual se desarrolla la patología, se forman numerosos productos bioactivos derivados de las reacciones mediadas por especies reactivas del oxígeno dentro de los cuales encontramos los ácidos grasos nitrados. La administración de estos nitrolípidos en animales deficientes de apolipoproteína E (ApoE) alimentados con dieta rica en grasas redujo el desarrollo de la placa de ateroma, su contenido inflamatorio y la acumulación

de colesterol en la aorta. De la mano con esto, en el presente trabajo de tesis demostramos que el ácido nitro oleico (NO₂-OA) modula la expresión de los receptores CD36 y LRP1 a través de diferentes mecanismos y que además, interacciona de manera directa con CD36. Estos resultados fueron confirmados por ensayos *in vitro* con la proteína recombinante de CD36 e *in silico*. Dicha interacción, NO₂-OA-CD36, inhibió el reconocimiento e internalización de LDLm sugiriendo la participación del residuo Lys164. Estos hallazgos se acompañaron de la reducción en los niveles de colesterol y ésteres de colesterol intracelulares en macrófagos RAW264.7 expuestos a LDLm, determinado por espectrometría de masas.

Como consecuencia del efecto biológico dual observado por los nitrolípidos sobre CD36, por un lado incrementando su expresión y por otro actuando como ligando de dicho receptor e impidiendo la captación de LDLm, se estudió el efecto de los nitrolípidos sobre mecanismos involucrados en el metabolismo del colesterol y en la evolución de la placa de ateroma. De este modo, mostramos que el NO₂-OA incrementó la liberación o eflujo de colesterol al medio de cultivo de manera independiente de los transportadores lipídicos ABC, por un mecanismo que involucraría al flujo autofágico.

En conjunto estos resultados muestran como los nitrolípidos participan en la reducción de los depósitos intracelulares de colesterol en macrófagos disminuyendo la incorporación de mLDL, así como también promoviendo mecanismos que están involucrados en la regresión de la placa de ateroma, como es la migración y el eflujo de colesterol en macrófagos. Por lo tanto, los hallazgos del presente trabajo, postulan a los nitrolípidos como mediadores bioactivos con capacidad de regular el metabolismo lipídico de macrófagos que podrían afectar el desarrollo de la placa de ateroma.

SUMMARY

Atherosclerosis is the most common cause of cardiovascular disease and deaths worldwide and its development has been related to multiple risk factors including smoking, unbalanced diet, hypertension, type 2 diabetes, dyslipidemia, obesity among others. These risk factors promote endothelial dysfunction which is characterized by increased permeability and expression of adhesion molecules that favor monocytes adhesion and migration through the endothelium to the arterial intima. In the intima monocytes-derived macrophages and lymphocytes T promote an inflammatory environment with oxidation and/or acetylation of low density lipoproteins (LDL). Modified LDL (mLDL) are internalized via scavenger receptors such as CD36 and LRP1. These receptors are up-regulated via a positive feedback loop that leads to uncontrolled cholesterol incorporation, accumulation and foam cell formation. CD36 is a membrane glycoprotein that binds oxidized phospholipids, mLDL and long chain fatty acids which can either be internalized or trigger cell signaling. For signaling and internalization the ligands of CD36 interact with a hydrophobic residues rich domain in the extracellular loop of CD36 where a critical residue (Lys164) is located.

In this inflammatory context we described that RAW264.7 macrophages activated with LPS induce formation of bioactive nitro-fatty acids or nitroalkenes. These electrophilic compounds have been found in urine and blood samples from healthy patients and their formation is increased under inflammatory conditions as well as in the low pH of the stomach. Due to their anti-inflammatory and cytoprotective properties, nitroalkenes are protective against inflammatory diseases, such as, atherosclerosis. ApoE KO mice fed with HFD and treated with nitro-oleic acid (NO₂-OA) reduced plaque development, cholesterol accumulation and inflammatory markers inside the plaque. Herein, we showed that NO₂-OA regulates CD36 and LRP1 scavenger receptors expression. Besides this regulation, NO₂-OA was co-immunoprecipitated with CD36 in RAW264.7 macrophages and this interaction was further confirmed by *in vitro* assay using the recombinant protein of CD36, and by *in silico* experiments. Thus, the *in silico* results suggest that Lys164 may be involved in

this interaction, impairing the binding and internalization of mLDL. These results were validated by the reduction of cholesterol and cholesteryl esters accumulation in macrophages exposed to mLDL.

As a consequence of the dual role observed with the nitrolipids treatment which, not only increased CD36 expression but also interacted with the receptor impairing the binding and uptake of mLDL, we studied the effect of nitrolipids in cholesterol metabolism. Besides the regulation displayed in cholesterol uptake and accumulation, the NO₂-OA increased cholesterol efflux in RAW264.7 through a mechanism independent of lipid transporter ABC and involving autophagy flux.

Altogether this data suggests that NO₂-OA reduces cholesterol accumulation in macrophages by both inhibiting foam cell formation and favoring cholesterol release. Therefore, the findings shown propose nitrolipids as bioactive mediator with ability of modulating lipid metabolism in macrophages and potentially affecting the development of atheroma plaque.

ABREVIATURAS

*NO ₂	Dióxido de Nitrógeno
15d-PGJ2	15-deoxi Prostaglandina J2
4-HNE	4-Hidroxinonenal
AA	Ácido Araquidónico
ABCA1	<i>ATPasa binding cassette A1</i>
ABCG1	<i>ATPasa binding cassette G1</i>
ACAT	Acetil-coenzima A acetiltransferasa
AcetilCoA	Acetil-coenzima A
AG	Ácidos grasos
AGCL	Ácidos grasos de cadena larga
AKT	Protein Kinase B
APC	<i>Allophycocyanin</i>
ApoA1	Apolipoproteína A1
ApoE	Apolipoproteína E

ARE	<i>Antioxidant Response Elements</i>
ATCC	<i>American Type Culture Colection</i>
BCA	Ácido bicinconínico
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
BMDM	<i>Bone Marrow Derived Macrophages</i>
B-NO ₂ -OA	Ácido Nitro-oleico biotinilado
BSA	Albumina de suero bovino
CD36r	CD36 recombinante
CDDO	Bardoxolona
CLA	Ácido linoleico conjugado
CVD	Enfermedades cardiovasculares
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindole
DEPC	Dietil pirocarbonato
Dil	1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'- tetrametil indocarbocianina perclorato

DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ER	Reticulo Endoplásmico
ERN	Especies Reactivas del Nitrógeno
ERO	Especies Reactivas del Oxígeno
FACS	<i>Flow Cytometry Staining Buffer</i>
FAK	Focal Adhesion Kinase
FAT	<i>Fatty Acid Translocase</i>
FcR γ	Receptor Fc gamma
GPx1	Glutation Peroxidasa 1
GSH	Glutation
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>

HDL	Lipoproteína de alta densidad
HIF-1 α	<i>Hypoxia Inducible Factor 1α</i>
HO-1,	Hemoxygenasa-1
HPLC	Cromatografía líquida de alta performance
HRP	Peroxidasa de rábano
IFN- γ ,	Interferon gamma
IL-1 β ,	Interleuquina 1beta
IL-6	Interleuquina 6
JNK	Quinasas c-Jun N-terminal
Keap1/Nrf2	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1/Nuclear factor erythroid 2-related factor</i>
KO	<i>Knock Out</i>
LA	Ácido Linoleico
LAL	Lipasa Ácida Lisosomal

LC	Cromatografía líquida
LD	<i>Lipid Droplets</i>
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDLac	LDL acetiladas
LDLag	LDL agregadas
LDLm	LDL modificadas
LDLox	LDL oxidadas
LDLR	Receptor de LDL
LKB1	<i>Liver Kinase B1</i>
LOX-1	<i>Lectin-like oxidized LDL receptor-1</i>
LRP1	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1</i>
Lys	Lisina
MCP-1	Proteína quimioattractante de monocitos 1
M-CSF	Factor Estimulante de Colonia de Monocitos

MFI	Intensidad de fluorescencia media
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MPT	Modificación Post-traducciona
MS	Espectrometría de masas
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAFLD	Enfermedad de hígado graso no alcohólica
nCEH	Hidrolasa neutra de ésteres de colesterol
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NO ₂	Grupo nitro
NO ₂ -FA	Ácidos grasos nitrados
NO ₃ ⁻	Nitrato
O ₂ ⁻	Anión superóxido

OA	Ácido Oleico
ON	Óxido Nítrico
Opti-MEM	<i>Opti-Modified Eagle Medium</i>
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLA-2	Fosfolipasa A2
PLIN2	Perilipina 2
PMSF	<i>Fenilmetilsulfonil fluoride</i>
PPAR γ	<i>Peroxisome Proliferator Activated-Receptor gamma</i>
Prxs,	Peroxiredoxinas
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero Fetal Bovino

SHP-2	Fofatasa SH-2
SOCs	<i>Store-Operated Channels</i>
SR-A1	<i>Scavenger Receptor-A1</i>
SR-BI	<i>Scavenger Receptor-B1</i>
SREBPs	<i>Sterol Regulatory Element-Binding Protein</i>
SSO	Sulfosuccinimidil oleato
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCEP	Tri-2-carboxietil-fosfina
TG	Triglicéridos
TLR	Receptor tipo toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UHPLC	Cromatografía Líquida de Ultra-Alta Performance
ULK-1	<i>Unc-51-like kinase 1</i>
VCAM	Molécula de adhesión a células vasculares

VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
VSMCs	Células musculares lisas de vasculatura
ω 3-PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados omega 3

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	20
1.1 Aterosclerosis	21
1.1.2 Macrófagos y nitrolípidos	23
1.1.3 Metabolismo de colesterol en macrófagos	27
1.2 CD36	29
1.2.1 Estructura y función de CD36	29
1.2.2 Regulación de la expresión de CD36	31
1.2.3 CD36 y aterosclerosis	34
1.2.4 Señalización mediada por CD36	36
1.3 LRP1 en aterosclerosis	40
1.4 Modulación de los mecanismos involucrados en la regresión de la placa de ateroma	42 42
2. OBJETIVOS	46
2.1 Objetivo general	47
2.2 Objetivos específicos	47
3. MATERIALES Y MÉTODOS	48
3.1 Materiales	49
3.1.1 Líneas celulares	50
3.1.2 Animales de experimentación	51
3.1.3 Cultivos primarios	51
3.1.4 Nitroalquenos	52
3.1.5 Softwares	52
3.2 Métodos	53
3.2.1 Purificación y modificación de lipoproteínas de baja densidad (LDL)	53
3.2.2 Marcación de lipoproteínas con sonda fluorescente Dil	54
3.2.3 Caracterización de las lipoproteínas	54
3.2.4 Western blot	54

3.2.5 Citometría de flujo para el estudio de antígenos de superficie	57
3.2.6 Citometría de flujo para la evaluación de ERO	57
3.2.7 PCR tiempo real (RT-qPCR)	58
3.2.8 Ensayos de inmuno-precipitación de CD36	59
3.2.9 Ensayos <i>in vitro</i> de interacción con CD36	60
3.2.10 Ensayos <i>in vitro</i> de interacción de CD36r con LDLm	60
3.2.11 Microscopía de inmuno-fluorescencia	61
3.2.12 Ensayos de viabilidad celular	61
3.2.13 Ensayos de migración celular	62
3.2.14 Extracción de lípidos para el análisis por espectrometría de masa	63
3.2.15 Análisis por LC-MS de colesterol y esteres de colesterol	64
3.2.16 Estudios <i>in silico</i>	66
3.2.17 Biotinilación de proteínas de superficie	67
3.2.18 Tratamiento estadístico de los datos	67
4. RESULTADOS	69
4.1 Estudio de la regulación de CD36 por acción del ácido nitro-oleico (NO ₂ -OA)	70
4.1.1 Efecto del NO ₂ -OA sobre la expresión en membrana de CD36	70
4.1.2 Estudio de la regulación transcripcional del receptor CD36 ejercida por el NO ₂ -OA	73
4.1.3 Estudio de la participación del receptor nuclear <i>PPAR</i> _γ en la expresión de CD36 mediada por el NO ₂ -OA	76
4.1.4 Estudio de la participación de la vía <i>Keap1/Nrf2</i> en la expresión de CD36 mediada por el NO ₂ -OA	77
4.2 Estudio del efecto del NO ₂ -OA sobre la funcionalidad del receptor CD36	79
4.2.1 Efecto del NO ₂ -OA en la incorporación y acumulación de colesterol y ésteres de colesterol en macrófagos RAW264.7	79

4.3 Estudio <i>in vitro</i> de la interacción entre NO ₂ -OA y CD36	82
4.3.1 Caracterización de la interacción de NO ₂ -OA con CD36 en macrófagos RAW 264.7	82
4.3.2 Estudio <i>in vitro</i> de la interacción entre NO ₂ -OA y CD36	83
4.3.3 Ensayos de competencia de ligandos por su unión a CD36	84
4.3.4 Ensayos de desplazamiento de NO ₂ -OA del complejo NO ₂ -OA-CD36 por otros ligandos de CD36	87
4.4 Estudios de modelado y <i>docking</i> molecular	88
4.5. Estudio de la señalización inducida por NO ₂ -OA vía CD36	92
4.5.1 NO ₂ -OA induce señalización de CD36 en macrófagos RAW264.7	92
4.5.2 Estudio de la señalización dependiente de CD36 inducida por NO ₂ -OA en mioblastos L6	95
4.6 Estudio de la regulación del eflujo de colesterol por el NO ₂ -OA	96
4.6.1 Estimulación de sobrecarga de colesterol en células RAW264.7	96
4.6.2 Estudio del efecto del NO ₂ -OA en la liberación de colesterol	98
4.6.3 Caracterización de la cinética de liberación de colesterol	99
4.7 Estudio del flujo autofágico en células cargadas con LDLm	102
4.8 Estudio del efecto del NO ₂ -OA sobre el estado inflamatorio y el estrés oxidativo en macrófagos cargados con LDLm	104
4.9 Estudio del efecto del NO ₂ -OA en la migración celular	105
4.10 Estudio del efecto del NO ₂ -OA en la regulación del receptor <i>scavenger</i> LRP1	107
4.10.1 Efecto del NO ₂ -OA en la expresión en membrana del LRP1	107
4.10.1 Efecto del NO ₂ -OA sobre la regulación génica del LRP1	108
4.10.1 Participación del proteosoma en la regulación de los niveles proteicos de LRP1	111
5. DISCUSIÓN	113

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aterosclerosis

La aterosclerosis es la enfermedad cardiovascular (CVD) causal del mayor número de muertes prematura en el mundo representando el 31,5 % del total de decesos a nivel mundial (1). Las causas de su desarrollo son multifactoriales, dentro de las cuales podemos mencionar malos hábitos como tabaquismo, sedentarismo o dieta desbalanceada; entre otros factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión, diabetes tipo 2, dislipidemias, obesidad y predisposición genética (2, 3).

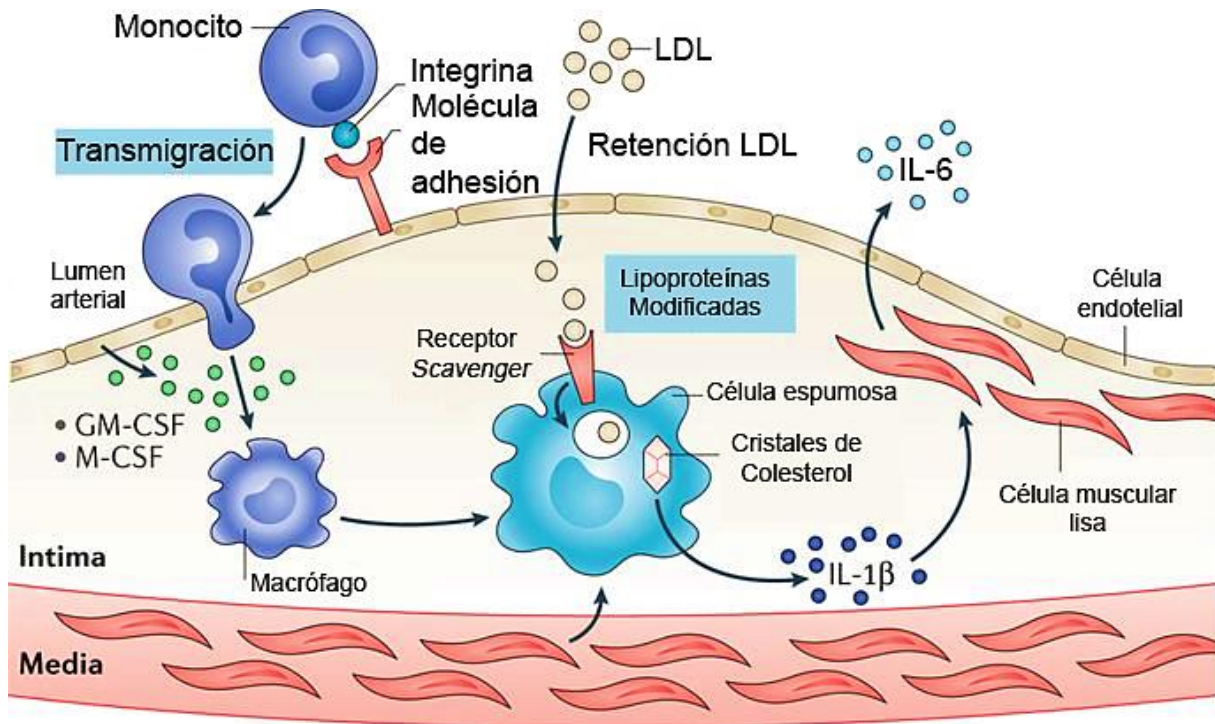
En el desarrollo de la aterosclerosis están involucrados múltiples factores que contribuyen con el proceso inflamatorio crónico característico de la patología. Diversos estudios clínicos y experimentales han demostrado que los factores de riesgo antes mencionados conducen a la disfunción del endotelio (4). Esta pérdida del funcionalismo se caracteriza por un incremento en la permeabilidad vascular, aumento en la expresión de moléculas de adhesión en la superficie luminal del endotelio (5) y disminución de la biodisponibilidad de óxido nítrico (ON). En este contexto los macrófagos son las células inflamatorias más abundantes de la placa, provenientes de la extravasación de los monocitos circulantes, luego de adherirse a las células endoteliales activadas y migrar a la íntima de las arterias a través de los espacios inter-endoteliales. En la íntima los monocitos se diferencian a macrófagos y junto con los linfocitos T son los responsables de liberar componentes pro-inflamatorios como IL-1 β , IFN- γ , MCP-1 (proteína quimioattractante de monocitos), como así también de especies reactivas del nitrógeno (ERN) y del oxígeno (ERO) (6). Estos mediadores favorecen el mayor reclutamiento de monocitos y linfocitos T de circulación y de células musculares lisas desde la media de las arterias (7).

La hipercolesterolemia es una de las principales causas que conducen al desarrollo de la aterosclerosis. El colesterol es transportado mayoritariamente en circulación por las lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y sus remanentes, las cuales, frente al incremento en la permeabilidad endotelial, extravasan de la circulación y quedan retenidas en la

pared de las arterias por componentes de la matriz extracelular. Estas lipoproteínas son expuestas a un medio inflamatorio y a concentraciones elevadas de ERO y ERN, las cuales inducen modificaciones sobre el componente lipídico y proteico de las mismas, generando así lipoproteínas modificadas (LDLm) como las LDL oxidadas (LDLox), acetiladas (LDLac) o agregadas (LDLag). Estas LDLm son incorporadas en los macrófagos a través de receptores de membrana de tipo *scavenger* (CD36, LRP1, LOX-1, SR-A1). La expresión de estos receptores como la unión a diferentes LDLm favorece la acumulación intracelular de colesterol y la diferenciación de los macrófagos a células espumosas. **Es por ello que este trabajo de tesis aborda el estudio de la expresión de receptores *scavenger* en macrófagos y su impacto en la formación de la célula espumosa.**

Además de los macrófagos, se ha descrito que las células musculares lisas que migran hasta la íntima también pueden diferenciarse a células espumosas. Este microambiente celular alterado en respuesta a diferentes mediadores bioactivos lipídicos presentes en las LDLox incrementa la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α y MCP-1, los cuales promueven el proceso inflamatorio al estimular el reclutamiento de monocitos (8).

El conjunto de los procesos descritos hasta aquí (Fig. 1) conducen a un estrechamiento de la luz de las arterias, formación de estrías grasas y la posterior consolidación en una placa de ateroma estable por la secreción de componentes de la matriz extracelular (9).



Nature Reviews | Nephrology

Figura 1. Desarrollo aterosclerótico en arterias. Modificado de Gisterá Anton y col., *Nature Reviews, Nephrology*, 2017 (10). La disfunción endotelial que lleva a un incremento en la permeabilidad, y a un mayor pasaje de lipoproteínas a la íntima de las arterias, inicia el desarrollo de la placa de ateroma. Esto conduce a una activación del endotelio, a un incremento en la expresión de moléculas de adhesión y al reclutamiento de monocitos circulantes. Estos monocitos atraviesan la barrera endotelial y en el tejido de la íntima se diferencian a macrófagos mediante el factor estimulante de colonia monocitario y granulocítico-monocitario (M-CSF, GM-CSF) secretados por el endotelio. Las células musculares también pueden diferenciarse a células tipo-macrófagos. Las lipoproteínas sufren modificaciones en microambiente, las cuales son incorporadas por los macrófagos, favoreciendo la acumulación de colesterol y la diferenciación de los mismos a células espumosas. La formación de cristales de colesterol, lleva a una activación del ininflamosoma NLRP3 e incremento en la secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, etc.

1.1.2 Macrófagos y nitrolípidos

Los macrófagos son células versátiles que frente a diversos estímulos inflamatorios como citocinas o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) son activados para la defensa del organismo contra una noxa o microorganismo. La activación de los macrófagos induce la producción de ON, ERO, citocinas y mediadores lipídicos

bioactivos. Estos mediadores lipídicos son formados por reacciones enzimáticas de óxido-reducción mediadas por ciclooxigenasa o lipooxigenasa, o a través de reacciones no enzimáticas que involucran especies reactivas como los radicales hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) o anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) dando origen a prostaglandinas y leucotrienos o isoprostanos y 4-hidroxi nonenal (4-HNE), respectivamente. Estos derivados lipídicos juegan importantes roles en el desarrollo de los procesos inflamatorios.

Aunque mucho se conoce acerca de la oxidación enzimática y no-enzimática de los ácidos grasos relativamente poco se conoce de la nitración de los mismos. En la última década se demostró que macrófagos activados con LPS e $\text{INF-}\gamma$, simulando un ambiente inflamatorio, son capaces de generar lípidos nitrados bioactivos los cuales presentan acciones anti-inflamatorias y protectoras celulares. Estos compuestos denominados nitrolípidos o nitroalquenos ($\text{NO}_2\text{-FA}$) son el producto de la reacción del ON o derivados del nitrito con ácidos grasos insaturados. Dentro de los ácidos grasos (AG) a ser nitrados las características estructurales parecen definir los productos de nitración y la reactividad de los mismos. Así la configuración conjugada o bis-alílica de las dobles uniones en el ácido linoleico (LA), definen una mayor susceptibilidad de nitración ($>$ a 5 ordenes) para el conjugado (CLA) sobre el LA (10-12). Además se han descrito nitración de otros ácidos grasos como el oleico y araquidónico, aunque en muy bajas concentraciones. Éstos compuestos se encuentran presentes en plasma y orina de individuos sanos, en concentraciones de 1-3 nM y 20 pg/mg de creatinina, respectivamente. La formación de los nitroalquenos se ve favorecida a pH ácido y en hipoxia siendo el proceso digestivo una gran usina fisiológica para la nitración de los ácidos grasos (Fig. 2A). Sus niveles fisiológicos incrementan durante procesos inflamatorios y eventos de isquemia/reperfusión cardiaca (11, 14–16).

Los nitrolípidos ejercen sus acciones biológicas por medio de su reactividad electrofílica con blancos moleculares como enzimas o factores de transcripción que participan de la regulación de importantes vías metabólicas o de señalización intracelular. Esta reactividad es conferida por la adición del grupo nitro ($-\text{NO}_2$), en el doble enlace del alqueno, el cual por su electronegatividad

deja al carbono β deficiente en electrones, y con avidez de reaccionar con grupos nucleofílicos.

En medios biológicos, los nitroalquenos pueden reaccionar con nucleófilos presentes en proteínas como cisteínas, histidinas o lisinas, mediante la reacción de adición de Michael. La formación de aductos (lípid-proteína) o nitroalquilación, es considerada una modificación post-traducciona (MPT), que puede alterar la función, actividad y/o distribución de las proteínas afectadas. Como consecuencia de su reactividad, los nitroalquenos exhiben acciones anti-inflamatorias y citoprotectivas en diversos modelos animales de enfermedades inflamatorias como aterosclerosis, isquemia/reperfusión, diabetes, obesidad o enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD por *Non Alcoholic Fatty Acid Liver Disease*).

Es así que los ácidos grasos nitrados activan la respuesta metabólica dependiente del receptor *PPAR γ* (17), aumentan la expresión de genes antioxidantes regulados por *Keap1/Nrf2* (18) y disminuyen la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-1 β) y moléculas de adhesión (VCAM), mediante la inhibición del factor de transcripción *NF- κ B* (19, 20). La figura 2B representa los principales blancos moleculares de los nitroalquenos, responsables de traducir sus acciones biológicas.

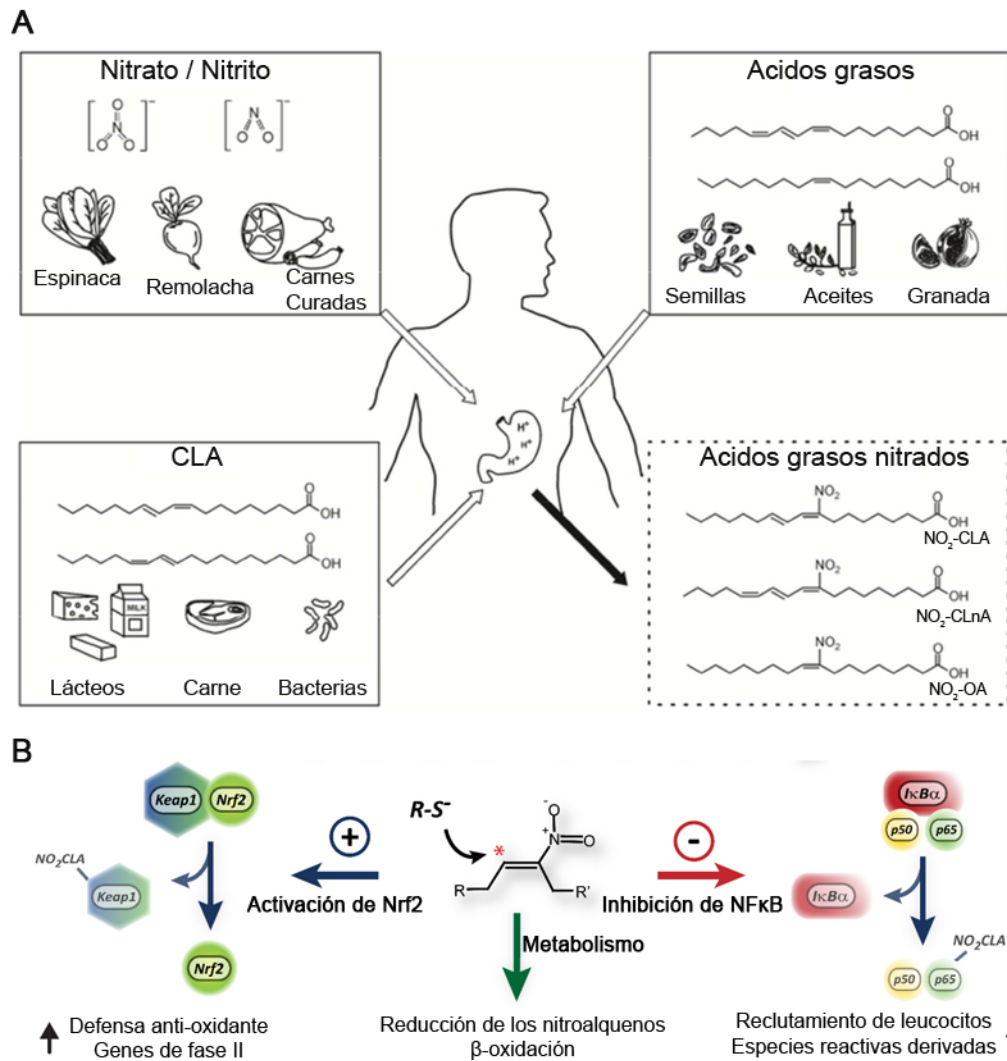


Figura 2. A. Efecto de la dieta en la formación de ácidos grasos nitrados. Modificado de Buchan y col, *Nitric Oxide* 79, 38-44 (2018) (21). Los nitratos (NO_3^-), nitritos (NO_2^-) y los ácidos grasos tales como el ácido oleico (OA, 18:1), linoleico conjugado (CLA, 18:2) y el linoléico (CLnA, 18:3) se encuentran en fuentes dietarias que incluyen vegetales, semillas, aceites, carnes y lácteos. El metabolismo de nitratos y nitritos genera óxidos de nitrógeno como el dióxido de nitrógeno (NO_2) con capacidad de nitrar AG. Los AG más susceptibles a la nitración son aquellos que presentan dienos conjugados en su estructura. Debido a su abundancia en la dieta el CLA es el ácido graso endógeno predominantemente nitrado. **B. Mecanismos de señalización de los nitroalquenos.** Dentro de los principales blancos moleculares de los nitroalquenos se encuentra la vía de *Keap1/Nrf2*, la cual es activada conduciendo a un incremento en la respuesta anti-oxidante; y la vía *NFκ-B* que es inhibida, llevando a una reducción de la respuesta inflamatoria. Además de la reacción de nitro-alquilación los nitroalquenos pueden ser metabolizados mediante β -oxidación.

Cuando ratones apoE deficientes (ApoE KO) son alimentados con dieta rica en grasa junto a la administración subcutánea de ácido nitro-oleico ($\text{NO}_2\text{-OA}$) (dosis de 8 mg/kg/día), se observa que en dichos animales se enlentecía el desarrollo de la placa, la cual presentaba menor contenido lipídico e infiltrado

de células inflamatorias (22). A pesar de los avances en el estudio del metabolismo de los ácidos grasos nitrados; su impacto en la regulación de la expresión de receptores de tipo *scavenger*, el metabolismo del colesterol en macrófagos y la consecuente formación de la célula espumosa permanecían sin abordaje hasta el presente trabajo de tesis.

1.1.3 Metabolismo de colesterol en macrófagos

Como se mencionó anteriormente, el metabolismo del colesterol en macrófagos es un proceso crítico, ya que su desbalance puede llevar a la formación de la célula espumosa y el desarrollo de la placa de ateroma. El metabolismo del colesterol puede ser dividido en tres etapas que comprenden incorporación, metabolismo intracelular y eflujo. Alteraciones en alguna de estas etapas, favorecen la acumulación excesiva de colesterol intracelular y la consecuente diferenciación a célula espumosa (Fig. 3) (23).

En condiciones fisiológicas el colesterol llega a los macrófagos principalmente transportado por lipoproteínas de baja densidad (LDL), estas son reconocidas por su receptor, LDLR, e incorporadas al interior celular mediante endocitosis. En los lisosomas los ésteres de colesterol presentes en las LDL son hidrolizados por la lipasa ácida lisosomal (LAL), generando colesterol libre. La acumulación de colesterol libre es tóxico para la célula, por ello una acetil-coenzima A acetiltransferasa (ACAT1) presente en retículo endoplásmico, esterifica nuevamente el colesterol y lo almacena en estructuras citoplasmáticas denominadas *Lipid Droplets* (LD). Los LD son organelas que almacenan colesterol, triglicéridos, fosfolípidos, como reserva para la generación de energía, síntesis de membranas, etc. Cuando el contenido de colesterol sobrepasa la demanda celular, éste es nuevamente hidrolizado a colesterol libre por la hidrolasa neutra de ésteres de colesterol (nCEH); y el colesterol libre es entregado a lipoproteínas de alta densidad (HDL por *high density lipoprotein*) o a apo-lipoproteína A1 (apoA-I) extracelulares, mediante

los canales de eflujo de colesterol, ABCA1 y ABCG1 por *ATPasa binding casset A1 y G1*, o receptores de tipo *scavenger* de la familia B tipo I (SR-BI) (24).

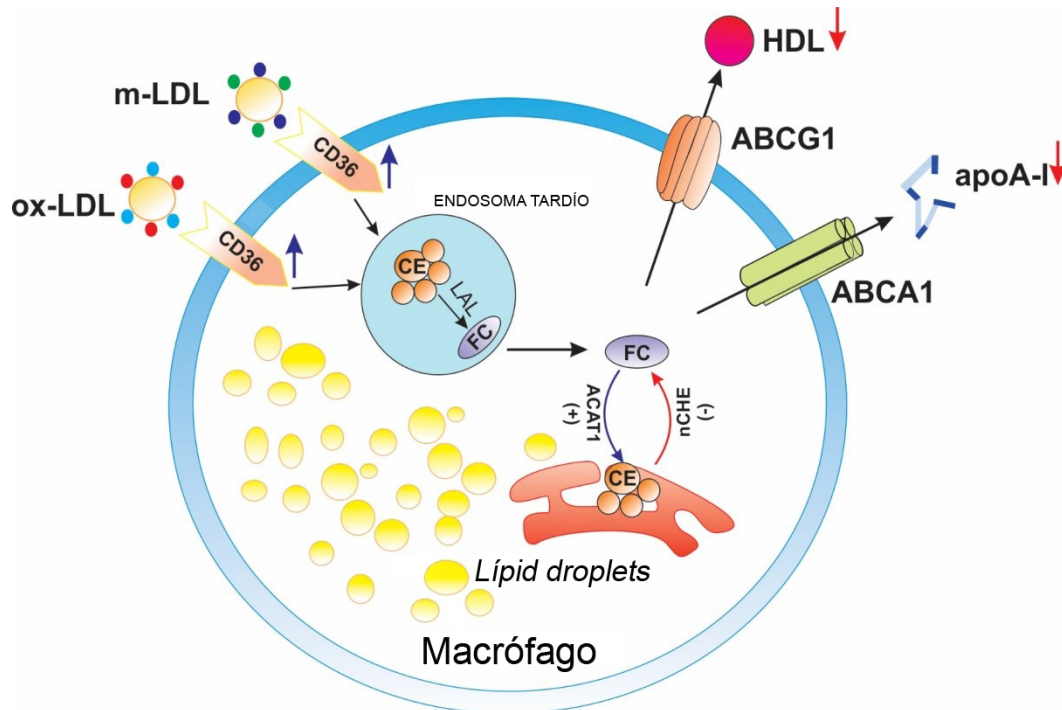


Figura 3. Metabolismo de colesterol en macrófagos. Modificado de X.-H. Yu et al /Clinica Chimica Acta 424 (2013) 245-252 (25). La incorporación de lipoproteínas modificadas, principalmente oxidadas y acetiladas se realiza mediante el receptor *scavenger* CD36, llevando a una incorporación excesiva de lipoproteínas modificadas, y saturando los mecanismos intracelulares de metabolismo y liberación de colesterol, favoreciendo de ésta manera la diferenciación del macrófago a célula espumosa.

Como se mencionó anteriormente, en la íntima de las arterias las lipoproteínas sufren modificaciones como oxidación, acetilación y/o agregación (26, 27). A diferencia de las LDL nativas, las LDLm no pueden ser reconocidas por el LDLR y es aquí donde juegan un rol fundamental los receptores de tipo *scavenger*; en consecuencia su estudio resulta de crucial importancia. A diferencia de los receptores de LDL nativas, éstos presentan una retroalimentación positiva en su expresión, lo cual conduce a la incorporación y acumulación excesiva de LDLm en el interior de los macrófagos gatillando la diferenciación a célula espumosa (24, 28).

1.2 CD36

1.2.1 Estructura y función de CD36

En el desarrollo de la aterosclerosis y la enfermedad cardiovascular tienen un rol importante los factores de riesgo los cuales inducen cambios o desbalances de ciertos mecanismos fisiológicos que finalmente favorecen la aparición del proceso patológico. A saber en la metabolización de las LDLm, especialmente la LDLox y LDLac, el receptor CD36 o FAT por *Fatty Acid Translocase* es el principal responsable de unirlos e internalizarlos. Este receptor de membrana tiene una estructura particular donde los dominios -NH₂ y -COOH terminal son citoplasmáticos y lo completa un dominio extracelular altamente glicosilado donde se encuentra el sitio de reconocimiento de ligandos (Fig. 4) (10, 29). La cadena extracelular presenta pliegues que forman un canal, el cual es rico en aminoácidos hidrofóbicos, denominado *binding pocket* (entrada 1). Este canal permite que los ligandos interaccionen con CD36 y en el caso de los AG, que la cadena carbonada de los mismos se alineen e ingresen en el canal para poder translocar al interior celular. Dentro de los ligandos podemos mencionar: LDLox (4), ácidos grasos de cadena larga (AGCL) (30–32), fosfolípidos oxidados (33), proteína PfEMP1 expresada en membrana de eritrocitos infectados con *Plasmodium falciparum* (34), trombospondina (35), entre otros.

En virtud de las características hasta aquí descritas el presente trabajo evaluó la interacción entre el NO₂-OA y el translocador de ácidos grasos CD36 y como dicha interacción afectaba el reconocimiento de las LDLm.

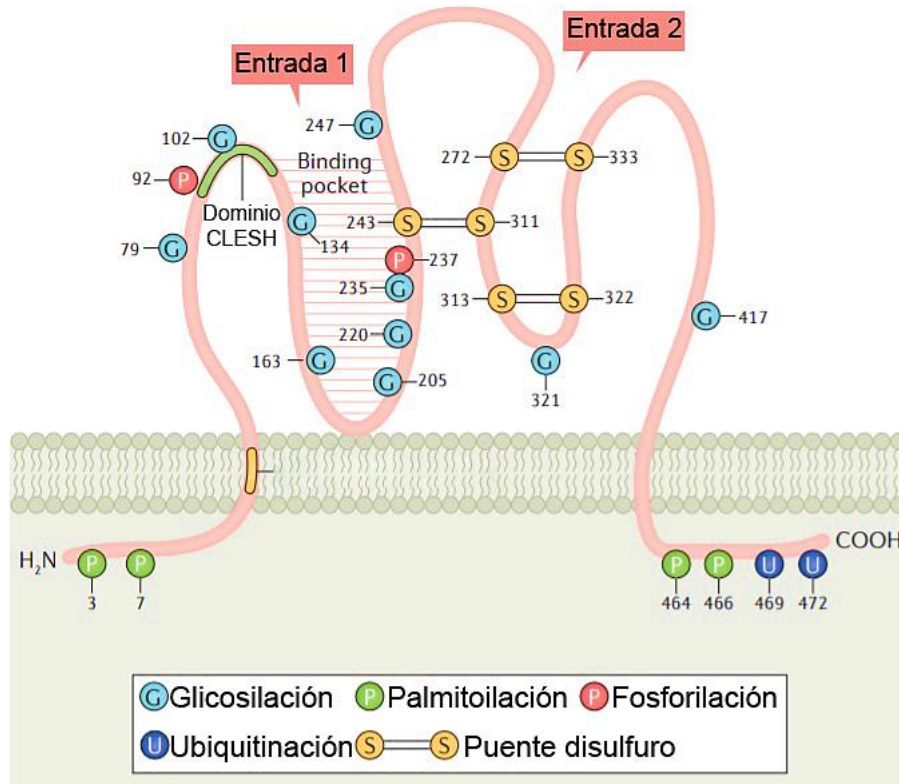


Figura 4. Estructura de CD36. Modificado de Xiaochun Yang et al., Nature Reviews Nephrology, 13(12), 769–781, 2017 (10). CD36 presenta dos dominios transmembrana, dos intra-citoplasmáticos –NH₂ y –COOH terminales y un *loop* extracelular donde se encuentra el sitio de unión a ligandos o *binding pocket*. Este receptor presenta múltiples sitios de modificaciones postraduccionales, esquematizados en la figura.

El receptor CD36, además de ser miembro de una familia de receptores endocíticos también posee la capacidad de inducir la activación de diferentes vías de señalización intracelular, lo cual depende de la naturaleza del ligando, el tipo celular y del compartimento tisular (31, 32). Parte de la responsabilidad de la señalización de CD36 recae sobre el dominio carboxilo terminal del receptor, el cual interactúa con diferentes proteínas adaptadoras involucradas en importantes vías de señalización intracelular (36).

Dentro del sitio de unión a ligandos o entrada 1 se ha identificado la lisina 164 (Lys164) como residuo crítico tanto para el reconocimiento de ligandos como para el inicio de la cascada de señalización. La alquilación específica de éste

residuo de CD36 por el agente Sulfo-N-succinidimil oleato (SSO) o la mutación sitio-dirigida del mismo, inhibe no solo la señalización iniciada por ligandos, sino también la incorporación celular de AG (37–39). Esta Lys164 también es crítica en el reconocimiento de las LDLm ya que el pre-tratamiento de macrófagos con SSO disminuyó la incorporación de LDLox (37, 40).

Además del sitio descrito (entrada 1), CD36 presenta un segundo sitio de unión a ligandos o entrada 2 descrito por Hsieh y col (29), el cual está representado por una apertura lateral del canal en la superficie del receptor. La unión a este sitio está regulada por la acetilación de la Lys334 y por presencia de ligandos en la entrada 1 (29). Esto sugiere que la unión de ligandos a CD36 dependerá del tipo de ligandos presentes y la competencia entre los mismos.

1.2.2 Regulación de la expresión de CD36

Los niveles de CD36 se encuentran íntimamente relacionados con el desarrollo y la evolución de patologías metabólicas como aterosclerosis, diabetes tipo 2, enfermedad de hígado graso, etc (41–43). Los principales factores de transcripción actualmente identificados como reguladores de la expresión del gen CD36 son, el receptor nuclear *PPAR* γ (*peroxisome proliferator activated-receptor γ*) y el factor de transcripción *Nrf2* (*nuclear factor erythroid 2-related factor*).

El receptor nuclear *PPAR* γ , es un receptor que se encuentra expresado en la membrana nuclear de células endoteliales, musculares lisas de vasculatura, monocitos y macrófagos (44). Su actividad es regulada por múltiples ligandos, principalmente de naturaleza lipídica. Su perfil de activación es relativamente complejo, debido a que, en respuesta al tipo de ligando se acompleja con diferentes perfiles de moléculas co-activadoras y co-represoras. Cuando los diferentes ligandos interaccionan con dicho receptor el perfil de liberación de co-represores y el reclutamiento de los co-activadores puede variar e impactar

en forma diferente en el perfil de genes activados por el receptor (45, 46). Dentro de sus ligando encontramos la 15-deoxi $\Delta^{12,14}$ prostaglandina J2 (15d-PGJ2) y las tiazolidinedionas, hipoglucemiantes orales utilizados para el tratamiento de la diabetes tipo 2, como por ejemplo, rosiglitazona (47). *PPAR γ* regula el metabolismo de lípidos, glucosa y presenta acciones anti-inflamatorias (48, 49).

Nrf2 es un factor de transcripción muy relacionado con el desarrollo de aterosclerosis, es considerado un regulador maestro del estrés oxidativo celular (9). En condiciones basales *Nrf2* se encuentra asociado a Keap1 por *Kelch-like ECH-associated protein 1*, complejo que interacciona con la proteína adaptadora (*Cul3*)-*ring box-1* (Rbx1) que contiene una E3 ligasa de ubiquitina, llevando al complejo a una continua degradación en proteasoma (50). De esta forma los niveles de *Nrf2* citoplasmáticos se mantienen bajos en condiciones normales. Frente a la presencia de estrés oxidativo, es decir, aumento de ERO/ERN, incremento de citocinas, presencia de xenobióticos, electrófilos como HNE presentes en las LDLox (51), agentes alquilantes, metales pesados, ácidos grasos poliinsaturados ω -3 (ω 3-PUFA) o componentes dietarios con propiedades anti-inflamatorias, como resveratrol (uva, frutos rojos), curcumina (cúrcuma), sulfurafano (brocoli), etc. resultan en un cambio conformacional de *Keap1* por modificación en sus residuos cisteína (52, 53). Este cambio conformacional rompe la interacción de baja afinidad que tiene *Keap1* por *Nrf2*, logrando la estabilización de *Nrf2*, y posterior translocación al núcleo. Al translocar al núcleo, *Nrf2* interacciona con los dominios ARE por *anti-oxidants response elements* en el ADN. De esta manera media la expresión de enzimas de fase II o detoxificantes (HO-1, Prxs, GPx1) y transportadores de eflujo de colesterol (ABCA1, ABCG1) (54). Por estos efectos se consideró *Nrf2* como protector contra el desarrollo de la aterosclerosis.

En humanos, el gen de CD36 se encuentra en el cromosoma 7q11.2 y presenta aproximadamente 46kb. En un principio se identificó al receptor nuclear *PPAR γ* , como el principal regulador de la expresión de CD36 (55, 56). Las LDLox reconocidas por este receptor son capaces de regular su expresión debido a metabolitos presentes en la lipoproteína u originados a partir de ella

(9-hidroxinonenal, ácido 9-hidroxiocetadecadienoico, ácido 13-octadecadienoico, etc) que se comportan como ligandos de *PPAR γ* e inducen la expresión del gen de CD36, esto lleva a una retroalimentación positiva y favorece la formación de la célula espumosa, en macrófagos.

Sin embargo, estudios posteriores describieron el rol crucial de la vía *Keap1/Nrf2* en la regulación de la expresión de CD36 en macrófagos y en células musculares. Éstos estudios demostraron que las LDLox y los componentes presentes en ellas, como HNE, activan la vía de *Nrf2*, incrementando la expresión de genes de fase II o detoxificantes y de CD36 (51). Estos hallazgos cambiaron el paradigma de *Nrf2* en el desarrollo de la aterosclerosis, debido a que el incremento en la expresión de CD36 estaría favoreciendo el desarrollo de la patología (57).

Debido a que tanto la vía *Keap1/Nrf2*, como *PPAR γ* son blanco moleculares de los ácidos grasos nitrados, evaluamos la regulación de la expresión de CD36 mediada por los nitrolípidos.

Otros factores de transcripción han sido posteriormente postulados como reguladores de la expresión del gen CD36, como el factor de transcripción HIF-1 α por *hypoxia inducible factor 1 α* el cual regula los niveles de CD36 en macrófagos en respuesta a hipoxia. Ésta regulación también se vio acompañada de un incremento en la incorporación de LDLox por macrófagos (58, 59). La figura 5 representa esquemáticamente los principales reguladores de la expresión de CD36 en macrófagos en respuesta a LDLox.

Macrófago

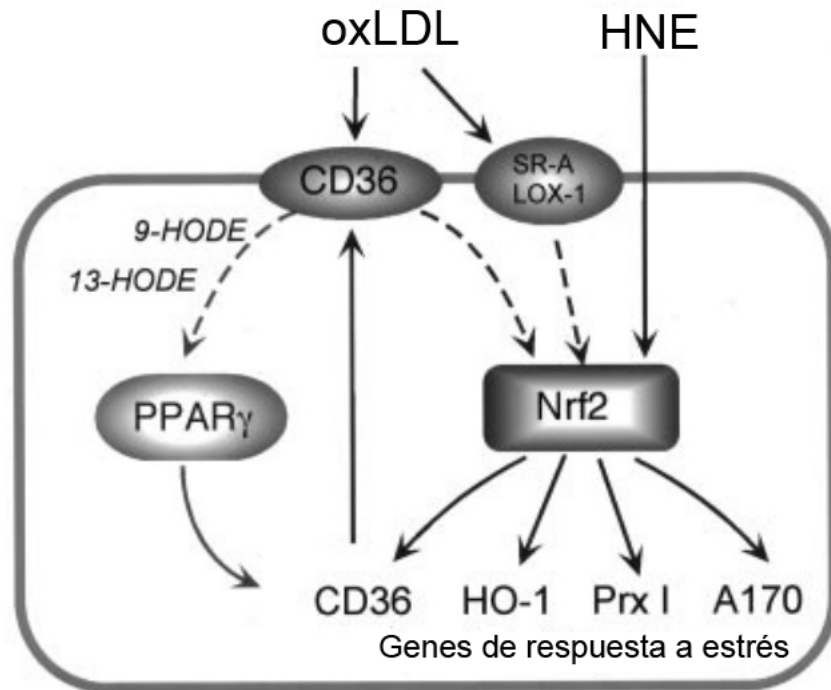


Figura 5. Regulación de la expresión de CD36 en macrófagos. Modificado de Tetsuro Ishii y col., *Circulation Research*, 2004 (60). La expresión del gen CD36 es regulada por los factores de transcripción *PPAR γ* y *Nrf2*. Las lipoproteínas de baja densidad oxidadas son incorporadas principalmente por este receptor y componentes presentes en las mismas son capaces de activar ambos factores antes mencionados. La activación de *Nrf2* además de regular la expresión de CD36 también incrementa la expresión de enzimas detoxificantes o de fase II.

1.2.3 CD36 y aterosclerosis

CD36 es un receptor involucrado en diferentes patologías metabólicas además de la aterosclerosis (41), dentro de las cuales podemos mencionar la enfermedad de hígado graso (42) y la diabetes tipo 2 (43). Con respecto a su participación en aterosclerosis, múltiples trabajos asocian un incremento en la expresión de CD36 con un mayor riesgo de desarrollo de enfermedad cardiovascular. La obtención de animales KO para CD36 permitió demostrar que macrófagos peritoneales derivados de estos animales, presentaban menor unión e incorporación de LDLox (61). Cuando estos animales fueron cruzados para obtener animales dobles KO para ApoE y CD36, y alimentados con dieta

rica en grasas, se observó que la deficiencia en CD36 protegía a los animales de desarrollar aterosclerosis. De la mano con estos hallazgos, Nozaki S y col. identificaron una población asiática con una expresión deficiente de CD36, debido a un polimorfismo genético. Cuando se evaluó la incorporación de LDLox por macrófagos aislados de estos pacientes, se observó una significativa reducción comparado a pacientes sin dicho polimorfismo (62).

Contradictoriamente a lo descrito, Moore y col. demostraron que la doble deficiencia de CD36 y ApoE en ratones de experimentación, generaba una modesta reducción en el desarrollo de lesiones con respecto a su control ApoE KO (63). Otros autores también observaron que los ratones KO para CD36 presentaban niveles altos de AG no esterificados en circulación, elevados niveles de VLDL, y reducción en los niveles de glucemia en ayunas (61). Estos hallazgos resaltan la importancia de CD36 en la captación de AG por los tejidos y en el metabolismo de general de lípidos. Así también, en pacientes con déficit en la expresión de CD36, se observó una tendencia al desarrollo cardiomiopatía hipertrófica y a una deficiente utilización de AG por células del tejido miocárdico (64).

Por otro lado, la β -oxidación de AG ha sido identificada como un mecanismo protector frente al desarrollo de aterosclerosis, debido a que induce su metabolización y evita su excesiva acumulación (65). CD36 juega un rol clave en este mecanismo, ya que no solo media la incorporación de AG al interior celular (66), sino que también activa AMPK (67). Recientes hallazgos describen que la expresión de CD36 en mitocondria resulta esencial para el ingreso de los AG a la misma y para su posterior oxidación (68). Incluso, se ha demostrado que tejidos con mayor actividad oxidativa de AG expresan mayores niveles de CD36.

Al rol crítico de CD36 en el metabolismo de los AG se suma su participación en la depuración de LDLox de circulación mediada por adipocitos (69), reduciendo de esta manera la cantidad de lipoproteínas pro-aterogénicas en circulación (70).

Debido a la heterogeneidad funcional del receptor CD36, es que su rol en el desarrollo de la aterosclerosis es aún discutido.

1.2.4 Señalización mediada por CD36

1.2.4.1 Regulación de los niveles de calcio intracelular y producción de eicosanoides

Un evento crítico en todo proceso inflamatorio es la liberación de ácido araquidónico (AA) de las membranas celulares y la posterior síntesis de eicosanoides mediante ciclooxigenasa y lipooxigenasa (71). En primer lugar, la liberación de AA de las membranas se produce por la fosfolipasa α -2 dependiente de calcio (cPLA-2 α). Esta lipasa se activa en respuesta al incremento en los niveles citoplasmáticos de calcio, en un primer lugar proveniente de las reservas en retículo endoplásmico (ER), y en segundo lugar por el ingreso de calcio extracelular mediante canales SOC's por *store-operated channels*. Kuda O y col. demostraron que CD36 en macrófagos y células CHO, está involucrado en la regulación de los niveles citoplasmáticos de calcio, mediante la activación de los canales SOC's, favoreciendo la activación de cPLA-2 α , liberación de AA y posterior síntesis de eicosanoides. Estos mecanismos, involucran la activación de proteínas de la familia Src, como Fyn, cuya inhibición bloqueó los efectos antes descritos (69, 37). Otros autores reportan participación de CD36 en la regulación de los niveles de Ca²⁺ intracelular mediante modulación de proteínas específicas e independiente de la señalización iniciada por AG (73).

1.2.4.1 Señalización en cardiomiocitos.

La función del receptor CD36 en tejido cardíaco fue asociada a la incorporación de AG al miocardio, favoreciendo la β -oxidación y la obtención de energía. De este modo CD36 participa en el mantenimiento del equilibrio metabólico del miocardio; su disfunción o disminución en su expresión conducen a la pérdida en la flexibilidad metabólica y la capacidad para adaptarse al ayuno (74).

Esta función en el miocardio se debe principalmente a la activación de mediadores intracelulares como PI3K y AMPK que llevan a la translocación de vesículas que contienen el receptor CD36 al sarcolema, que es donde ejerce su función. Samovski y col. demostraron que los AG palmítico y oleico inducen la activación de AMPK vía CD36 en miocardiocitos, favoreciendo no solo la captación, como había sido previamente descrito, sino también la β -oxidación de los mismos (67) (Fig. 6). En función de estos antecedentes y de los resultados encontrados, en este trabajo evaluamos la inducción de señalización por el ácido NO₂-OA vía CD36.

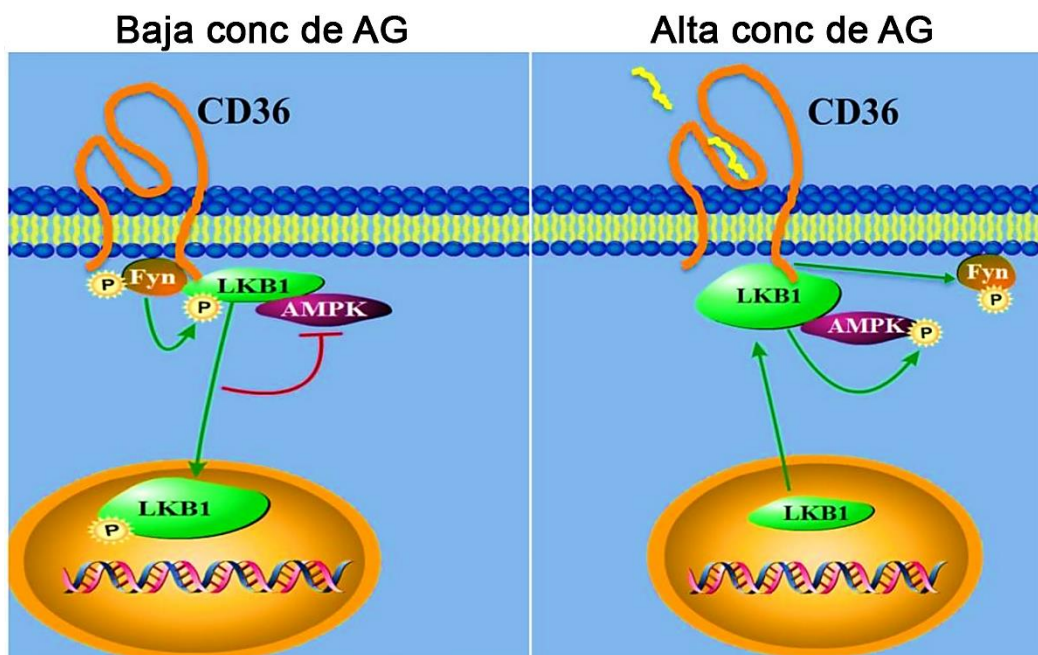


Figura 6. Regulación de activación de AMPK en cardiomiocitos vía CD36. Modificado de Samovski y col, Diabetes, 2015 (75). En condiciones donde los niveles de FA son bajos, CD36 se encuentra asociado a Fyn pudiendo acceder a fosforilar LKB1, la cual es re-direccionada al núcleo celular, disminuyendo los niveles de LKB1 en citoplasma y reduciendo de esta forma la capacidad de fosforilar a AMPK. Cuando la concentración de FA incrementa estos interaccionan con CD36 favoreciendo la separación de Fyn de CD36, limitando el acceso de Fyn a LKB1. Esto mantiene a LKB1 en citoplasma, permitiéndole acceder a activar AMPK quien induce β -oxidación por inhibir la Acetil-CoA carboxilasa.

1.2.4.1 Señalización en macrófagos.

El receptor CD36 en ausencia de ligando interacciona físicamente con miembros de la familia de proteínas tirosina-quinasa no receptora Src, como son Fyn, Lyn y Yes (76–78). Dentro de los principales ligandos del receptor CD36 en macrófagos involucrados en el desarrollo de aterosclerosis se encuentra la LDLox. Ésta lipoproteína se une a CD36 activando corriente abajo a Lyn y JNK 1/2 por *mitogen-activated kinase Jun-kinase 1/2* (76), además Rahaman y col demostraron que CD36 conduce a la activación del factor intercambiador de nucleótidos guanina, Vav con la participación de una proteína Src y la activación de las proteínas G de bajo peso molecular, Rho y Rac. Por lo tanto, el bloqueo de Vav o bien JNK inhiben la endocitosis de LDLox en macrófagos (79). De la mano con estos hallazgos, se observó que ratones deficientes para ApoE y Vav presentaron menor desarrollo de la patología comparado con aquellos animales que eran deficientes solo para ApoE (80).

Sumado a la participación del receptor CD36 en las vías involucradas en la captación de lipoproteínas modificadas estudios en macrófagos demostraron que se asocia a los receptores TLR4 y TLR6 en respuesta a la estimulación por LDLox y el péptido β -amiloide, llevando a la activación de *NF- κ B* y la secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β e IL-6 (81).

Además de favorecer la respuesta inflamatoria y la acumulación de colesterol celular, la señalización inducida por las LDLox también conduce a una pérdida en la polaridad de los macrófagos mediante la vía Vav/Rac (82). Park y col. demostraron que las LDLox llevan a una fosforilación sostenida de FAK, por *focal adhesión kinase*, debido a la inhibición de la fosfatasa SHP-2. Esto conduce al incremento en la polimerización de actina y la reducción de la migración, resultando en el atrapamiento de macrófagos en la placa de ateroma (83) (Fig. 7).

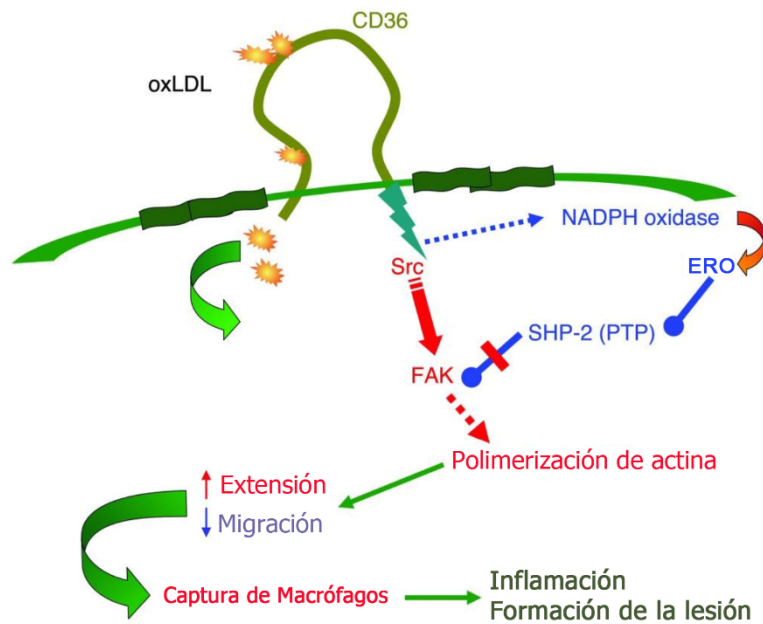


Figura 7. Regulación de la migración en macrófagos por LDLox. Modificado de Park y col, *The Journal of Clinical Investigation*, 2009 (83). Las lipoproteínas oxidadas, reconocidas por el receptor de membrana CD36 inducen activación de Src, esto lleva a la activación de NADPH oxidasa incrementando la producción de ERO, las cuales inhiben la fosfatasa SHP-2. Por otro lado, la activación de Src conduce a una fosforilación de FAK, ésta fosforilación no puede ser controlada debido a la inhibición de SHP-2. Esto conlleva a una fosforilación sostenida de FAK, con polimerización de actina, incremento en la extensión de las lamelipodias celulares y reducción en la migración.

Como previamente se describió, se conoce que diversos ligandos del receptor CD36 inducen señalización intracelular mediante éste, sin embargo, dicho receptor es una proteína sin dominios intracelulares con actividad quinasa, fosfatasa o de unión a proteína G. Debido a que CD36 no presenta actividad tirosina-quinasa, ésta debe asociarse a proteínas adaptadoras que medien esa función. Heit y col. mostraron que CD36 se localiza en zonas de la membrana heterogéneas donde se asocia con $\beta 1$ y $\beta 2$ -integrinas y las tetraspaninas CD9 y CD81. Este complejo de receptores une a CD36 con FcR γ . La asociación del receptor CD36 con este inmuno-receptor permite mediar señalización a través de la activación de las proteínas Src. La figura 8 resume los mecanismos de señalización descritos en macrófagos a través del receptor CD36.

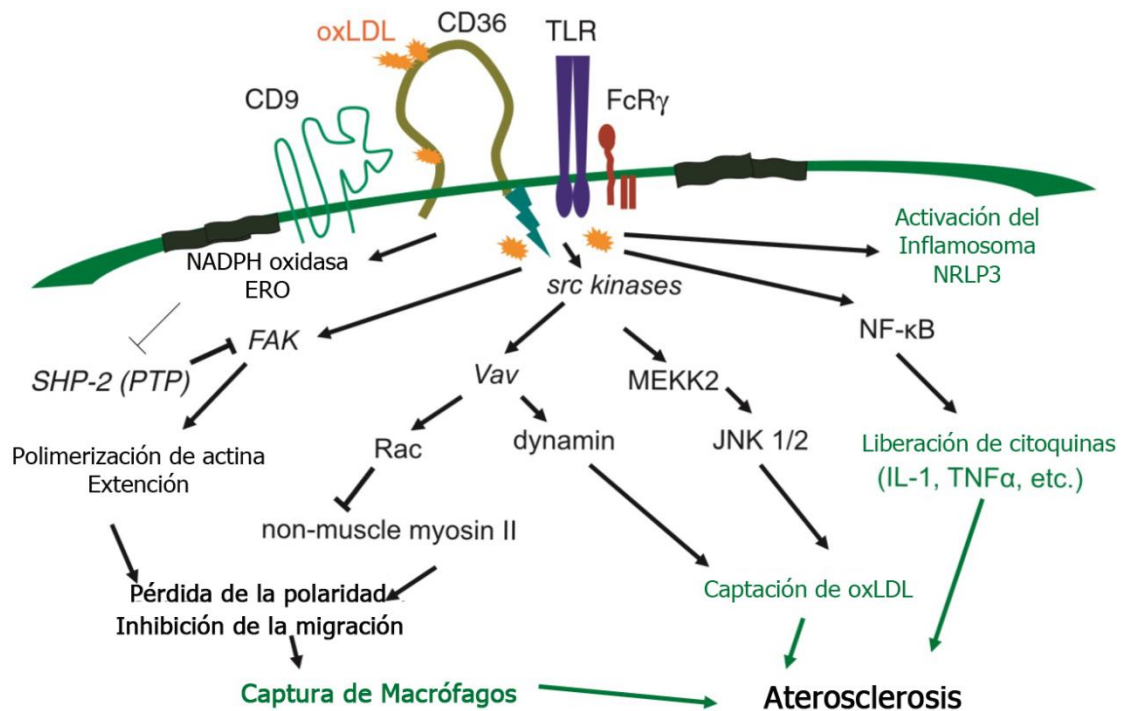


Figura 8. Señalización pro-aterogénica de CD36. Modificado de Park y col, *Experimental and Molecular Medicine*, 2014 (84). Las lipoproteínas oxidadas activan señalización mediada por CD36, que lleva a la captación de estas lipoproteínas, reducción en la migración celular, incremento en la respuesta inflamatoria, favoreciendo de esta forma el desarrollo de la aterosclerosis.

1.3 LRP1 en aterosclerosis

Otro de los receptores de tipo *scavenger* de importancia en el desarrollo de la aterosclerosis es el receptor LRP1, por *Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1*. LRP1 es un receptor de membrana expresado en la superficie celular de monocitos, macrófagos, adipocitos, células musculares lisas, hepatocitos, etc. Este receptor media la endocitosis de más de 40 ligando no relacionados como, proteasas e inhibidores de proteasas, factores de crecimiento, toxinas, lípidos, entre otros (85). Debido a la versatilidad de ligandos, se encuentra involucrado en una gran variedad de eventos fisiológicos y patológicos.

Con respecto a su estructura, es sintetizado como una glicoproteína precursora de 600 kDa que posteriormente sufre procesamiento por una proteasa furina en

el *trans*-Golgi, la cual da origen a sus dos cadenas α y β . La cadena β de 85 kDa contiene el carboxilo terminal y se encuentra asociada no covalentemente con una cadena α de 515 kDa (86) que contiene el amino-terminal.

La regulación de su expresión génica es bastante discutida y en general se ha descrito como un gen poco inducible. Sin embargo, algunos autores describen que su expresión estaría bajo regulación del receptor nuclear *PPAR* γ y que rosiglitazona, un agonista de *PPAR* γ , regula la expresión de LRP1 en forma dependiente de la dosis (87). Otros autores también describieron una regulación mediada por la acumulación de colesterol y la consecuente disminución en la expresión de *SREBPs* por *sterol regulatory element-binding protein* (88).

El rol de LRP1 en aterosclerosis es actualmente discutido y existen evidencias contrapuestas. Algunos trabajos demuestran que la delección de LRP1 conduce a una mayor acumulación de colesterol en células, menor formación de la neointima, con reducida proliferación y migración de células musculares lisas de la vasculatura (VSMCs) (89–91). Mientras que otros trabajos demuestran que LRP1 es necesario para la incorporación de colesterol proveniente de lipoproteínas modificadas como son las LDLag (92), favoreciendo el desarrollo del proceso aterosclerótico. Sin embargo, la delección del receptor en ratones se ve acompañada por una mayor cantidad de triglicéridos circulantes, probablemente debido a la acumulación de lipoproteínas ricas en triglicéridos (Quilomicrones, VLDL) que normalmente son eliminadas de circulación por el receptor LRP1 a través de la unión a la Apolipoproteína-E (ApoE).

Como se mencionó anteriormente, las LDLm son reconocidas por receptores *scavenger*, donde LRP1 es el principal responsable del reconocimiento e incorporación de LDLag por VSMCs y su posterior diferenciación a células espumosas (88,87). Sin embargo, no se puede descartar su participación en la incorporación de LDLox y LDLac, debido a que se demostró que LRP1 es necesario para que el macrófago se transforme en célula espumosa (94). Es por ello que en este trabajo se estudió el efecto del NO₂-OA en la expresión del receptor LRP1.

1.4 Modulación de los mecanismos involucrados en la regresión de la placa de ateroma

A diferencia de la inflamación aguda, en la cual las células inflamatorias emigran del sitio cuando el proceso ha sido resuelto, en el caso de la aterosclerosis, los macrófagos quedan atrapados en el interior de la placa con su potencial migratorio inhibido. Esto lleva a la retroalimentación positiva del proceso inflamatorio, favoreciendo la necrosis celular en el tejido y el avance de la patología. Algunos estudios postulan que la regresión de la placa de ateroma es viable junto con la emigración de los macrófagos de la misma (95–97). Por lo tanto, la modulación de la actividad migratoria de células espumosas representa un potencial blanco de tratamiento para el retroceso de las placas ateroscleróticas ya instauradas.

Otro mecanismo de importancia en la regresión de la placa es el eflujo de colesterol desde las células espumosas. Si estas células pudieran reducir sus niveles de colesterol, esto mejoraría significativamente el desarrollo del proceso aterosclerótico.

Los canales de eflujo de colesterol ABCA1 y ABCG1 juegan un rol crucial en la liberación de colesterol libre desde la células al medio extracelular el cual es entregado a HDL o a Apo A1 libre (98, 99). Las células almacenan sus depósitos de colesterol y otros lípidos neutros en estructuras denominadas *Lipids Droplets* (100). Los LD se componen por un centro de lípidos neutros rodeado de una monocapa de fosfolípidos recubierta de la proteína adipofilina o PLIN2, la cual es utilizada como marcador del contenido celular de LD (101). Debido a esto es importante comprender como los ésteres de colesterol contenidos en los LD son hidrolizados y transportados al exterior celular.

Uno de los mecanismos involucra a la vía de autofagia, mediante el cual la célula depleta o elimina componentes citoplasmáticos envejecidos o deteriorados, como pueden ser organelas envejecidas, proteínas mal plegadas

u oxidadas (102). Éste mecanismo comienza con la formación de una estructura de doble membrana, que engloba el contenido a ser degradado. Éstas estructuras se denominan autofagosomas, y en su formación juega un rol importante la proteína LC3 I, la cual se lipida para formar parte de la membrana (103). La incorporación de lípidos en su estructura genera cambios en su perfil migratorio electroforético denominándose LC3 II. Seguido a esto los autofagosomas se fusionan con lisosomas, formando los autolisosomas donde las proteasas e hidrolasas acidas degradan el contenido citoplasmático.

Singh y col. describieron la importancia de la autofagia en el metabolismo de lípidos denominando el proceso de degradación de LD en lisosomas como lipofagia (104). Ouimet y col. más tarde demostraron que el tratamiento con LDLm induce autofagia en macrófagos, favoreciendo la degradación de esteres de colesterol en lisosomas por un mecanismo dependiente de la LAL (105) (Fig. 9).

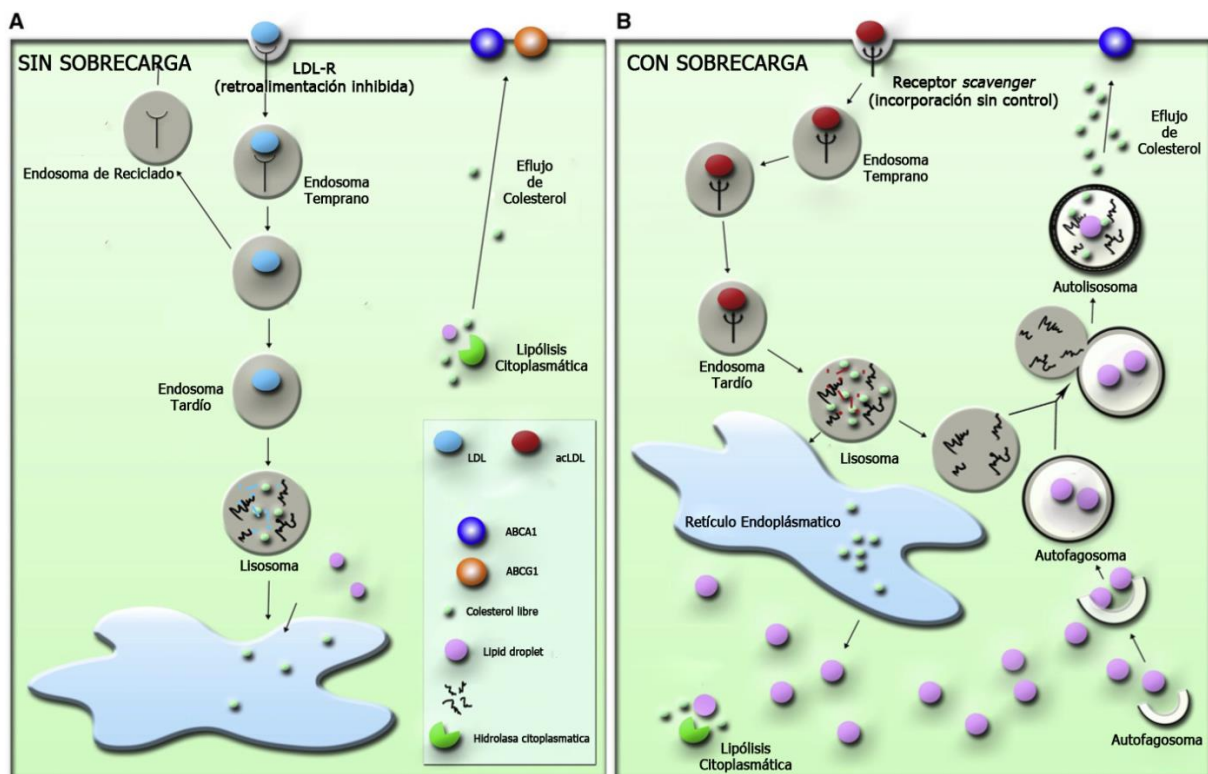


Figura 9. Rol de la autofagia en la hidrólisis de esteres de colesterol en macrófagos espumosos. Modificado de Ouimet y col, *Cell Metabolism*, 2011 (105). **A.** Metabolismo normal de colesterol en donde la hidrólisis de esteres de colesterol por la hidrolasa citoplasmática juega el rol principal. **B.** En macrófagos recientemente diferenciados a células espumosas, se activa el proceso de autofagia, induciendo la degradación de esteres de colesterol por hidrolasas lisosomales, debido a que los LD son incorporados en los autofagosomas y luego se fusionan con lisosomas donde ocurre la degradación dependiente de lipasa acida lisosomal.

Otros trabajos han demostrado que la excesiva acumulación de LDLm en macrófagos conduce a un bloqueo en la autofagia, en consecuencia, habría una reducción en la degradación de LD favoreciendo la formación de las células espumosas (106, 107). Por lo tanto, se propone como potencial blanco de tratamiento, restablecer el flujo autofágico para favorecer la depleción de lípidos en macrófagos (108, 109).

AMPK es una proteína ubicua sensor del metabolismo energético y el estado oxido-reductor celular. Se encuentra compuesta por una subunidad α catalítica y dos sub-unidades regulatorias β y γ . Ésta es activada por diversos fármacos, ayuno o hipoxia (110) y está relacionada con la prevención frente al desarrollo de aterosclerosis, debido a que regula el metabolismo de hidratos de carbono y lípidos, promoviendo vías metabólicas de generación de energía y reduciendo vías metabólicas que llevan al consumo de energía (111). De ésta manera, la activación de AMPK lleva a activar mecanismos que favorecen la generación de ATP, como la oxidación de AG, glicólisis, degradación de proteínas y reduce las vías de consumo de ATP, como síntesis de triglicéridos, AG y colesterol (112).

Por otro lado, estudios posteriores demostraron que la activación de AMPK es capaz de promover la activación del flujo de autofagia (113). En un primer lugar, mediante la activación de PI3K/AKT que conduce a la inhibición de mTOR (inhibidor de la vía de autofagia) (114), y en un segundo lugar por la fosforilación directa de Beclin-1 y ULK-1 (115) (Fig. 10).

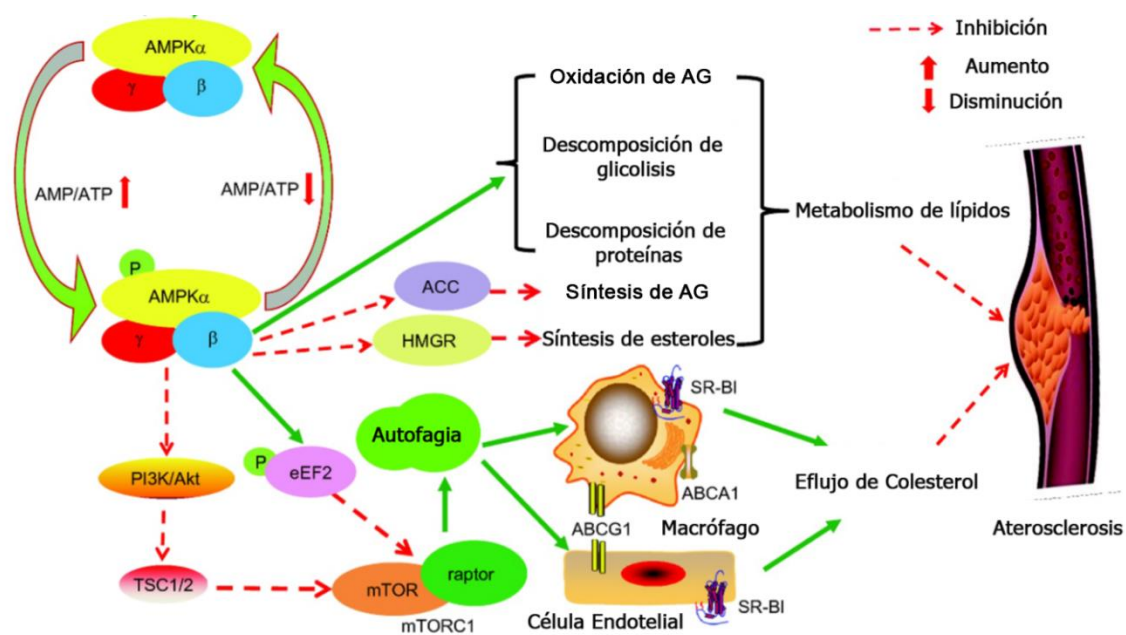


Figura 10. Rol de la autofagia en la hidrólisis de ésteres de colesterol en macrófagos espumosos. Modificado de Ou H y col, *Science China Life Science*, 2018 (113). La activación de AMPK conduce a la inducción de vías metabólicas productoras de ATP, como oxidación de ácidos grasos, glicólisis, degradación de proteínas; e inhibe vías metabólicas que conducen al incremento en el consumo de ATP, como la síntesis de ácidos grasos o esteroides. Por otro lado, AMPK activa la vía de PI3K/Akt llevando a la inhibición de mTOR y la consecuente activación de la vía de autofagia, la cual favorece el eflujo de colesterol en macrófagos.

Como complemento para lograr un abordaje global del metabolismo del colesterol en macrófagos y de los eventos críticos que juega dicha célula en aterosclerosis, se estudió el efecto del nitroalqueno en el eflujo de colesterol y en la capacidad migratoria celular.

En el presente trabajo de tesis logramos demostrar que el $\text{NO}_2\text{-OA}$ juega un rol crítico en la regulación de receptores de tipo *scavenger* en macrófagos RAW264.7, regulando la expresión de la proteína CD36 vía *Nrf2*, y comportándose como ligando del mismo, lo cual conduce a una disminución en la unión e incorporación de LDLm.

Además de reducir la acumulación de colesterol y ésteres de colesterol en macrófagos expuestos a LDLm, el nitroalqueno incrementó la liberación de colesterol de macrófagos cargados con LDLm y su migración.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Como objetivo general del presente trabajo de tesis se planteó identificar el efecto del ácido nitro-oleico en los mecanismos involucrados en el metabolismo de colesterol en macrófagos y su impacto en la formación de la célula espumosa.

En función de los antecedentes previamente descriptos se planteó como hipótesis de trabajo que el ácido nitro-oleico modula la expresión de receptores de tipo *scavenger* o barrenderos en macrófagos impactando sobre la formación de la célula espumosa y el transporte reverso del colesterol.

2.2 Objetivos específicos

Partiendo de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto del ácido nitro-oleico en la expresión del receptor de tipo *scavenger* CD36 y los mecanismos moleculares involucrados.
2. Estudiar la posible interacción entre el ácido nitro-oleico y el receptor de tipo *scavenger* CD36, como así también el efecto de dicha interacción en el reconocimiento de otros ligandos en la regulación del metabolismo lipídico en macrófagos y en la formación de la célula espumosa
3. Estudiar el efecto del ácido nitro-oleico en otros mecanismos relevantes en el metabolismo del colesterol en macrófagos como son: el eflujo de colesterol, la migración celular y la expresión de otros receptores de tipo *scavenger* como LRP1.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

DMEM-high glucose	Gibco®
Suero fetal bovino (SFB)	Internegocios S.A
<i>Penicilin/Streptomycin</i>	Gibco®
M-CSF	Gibco®
Accutase Enzyme Cell Detachment Medium	Invitrogen™
Kit BCA	ThermoScientific
Membranas de nitrocelulosa Science	GE Healthcare Life
BD Cytotfix™	BD biosciences®
HBSS	Gibco®
TRIzol®	Invitrogen™
Hexaprimers	Invitrogen™
M-MLV	Invitrogen™
SYBR Green Master Mix	ThermoScientific
PhosSTOP™	SigmaAldrich
CD36 recombinante	Abcam
Cholesterol-d7	Avanti Polar Lipids, Inc
16:0-cholesteryl ester	Avanti Polar Lipids, Inc

TG 17:0	Un-chek Prep, Inc
Columna C18 UHPLC	ThermoScientific
EZ-link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin	ThermoScientific
Pierce™ Streptavidin Agarose	ThermoScientific
Opti-MEM 1X	Gibco®
Lipofectamina 2000	Invitrogen™

3.1.1 Líneas celulares

RAW264.7

Estas células son monocitos/macrófagos de ratón adherentes, fácilmente propagables. Son células tumorales transformadas por infección con el virus de leucemia murino, *Abelson*. Las células fueron obtenidas desde la ATCC®, por sus siglas en inglés *American Type Culture Colection*. Durante la pasantía realizada en el laboratorio del Dr. Bruce A Freeman y el Dr. Francisco J Schopfer en la ciudad de Pittsburgh, PA, USA. las células utilizadas provenían de la misma institución. Ésta línea celular fue cultivada y mantenida en DMEM-*high glucose* (4,5 mg/ml de glucosa) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina, a 37 °C y 5% de CO₂.

L6

Ésta línea celular representa mioblastos adherentes obtenidos de músculo esquelético de rata (*Rattus norvegicus*) y al igual que la línea antes descrita, fue obtenida de la ATCC®. La línea celular fue cultivada en DMEM-*high glucose* suplementado con SFB 10% y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina, a 37 °C y 5% de CO₂.

3.1.2 Animales de experimentación

Todos los estudios en animales fueron realizados bajo protocolos aprobados por la Universidad de Pittsburgh (*University of Pittsburgh IACUC (approval 16109509)*). Las cepas de animales utilizadas fueron:

Nrf2^{-/-}, ratones con background BALBc fueron gentilmente provistos por el Dr. M Yamamoto (University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, USA). Éstos animales, homocigotos para la delección del gen *Nrf2* (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2), son ineficientes para inducir la expresión de enzimas detoxificantes o enzimas de fase II, reconocidas por sus acciones anti-oxidantes y citoprotectivas.

BALBc: los correspondientes ratones cepa salvaje fueron utilizados como control para evaluar la participación de la vía del factor de transcripción *Nrf2* en determinados procesos metabólicos en macrófagos.

3.1.3 Cultivos primarios

Macrófagos derivados de médula ósea

También conocidos como BMDM por sus siglas en inglés *Bone Marrow Derived Macrophages*. Ratones *Nrf2*^{-/-} y la cepa salvaje control fueron anestesiados con isoflurano y posteriormente dislocados. Una vez que los animales fueron sacrificados, utilizando etanol 70 % para evitar contaminaciones, se retiró la piel y se obtuvieron los fémures. Luego, bajo una cabina de flujo laminar, con material previamente esterilizado y mantenido en etanol 70 % durante el procedimiento, se limpió el fémur del tejido muscular que lo circunda y se cortaron los extremos de forma tal de exponer la médula ósea. Posteriormente con una jeringa, con aguja 25G se tomó DMEM-*high glucose* y se hizo pasar por el centro del hueso, recuperando la médula en una placa de *Petri* con

DMEM-*high glucose* suplementado con penicilina/estreptomicina 10 U/ml. Para disgregar la médula, el medio se levantó y se hizo pasar por la aguja al menos tres veces. Finalmente se recogió el medio y se trasvasó a un tubo *falcon* de 50 ml y las células se dividieron en 4 placas de *Petri* de 150 mm ó en 12 de 100 mm en DMEM-*high glucose* suplementado con SFB 10 %, penicilina/estreptomicina 10 U/ml en presencia de 50 ng/ml del factor estimulante de colonia de macrófagos, M-CSF (Gibco®) por sus siglas en inglés *Macrophage-colony stimulating factor*, por siete días a 37 °C y 5 % de CO₂. Después de los 7 días las células se lavaron con PBS 1X tres veces, se levantaron utilizando *Accutase Enzyme Cell Detachment Medium* (Invitrogen®) y luego de centrifugadas a 1500 rpm por 5 min estuvieron listas para los respectivos experimentos (116).

3.1.4 Nitroalquenos

El ácido nitro-oleico (NO₂-OA) y el ácido nitro-oleico biotinilado (B-NO₂-OA) fueron provistos amablemente por el laboratorio del Dr. Bruce A Freeman y el Dr. Francisco J Schopfer de la Universidad de Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA.

3.1.5 Softwares

Adobe Photoshop CS3

ImageJ

ImageStudio

FlowJo

Graphpad Prism 5.0

Microsoft Office 2010

SSDShell Applied Biosystems

ChemiDoc MP System

Marvin Sketch

AutoDock 4.2

3.2 Métodos

3.2.1 Purificación y modificación de lipoproteínas de baja densidad (LDL)

Las lipoproteínas de baja densidad LDL, fueron aisladas desde el plasma de individuos normales (117). Luego de la recolección de sangre utilizando EDTA como anticoagulante, se separó el plasma por centrifugación. Una vez obtenido el plasma se diluyeron 0,29 g de KBr por cada ml de plasma y se colocaron en tubos de ultracentrífuga, utilizando aproximadamente 1/3 de su volumen, se agregó igual cantidad de NaCl 0,15 M suavemente por las paredes del tubo. Una vez balanceadas, las muestras se centrifugaron a 65000 g en una centrifuga *Beckman coulter* (Optima DE-80K) por 1 h a 4 °C. Posteriormente se recuperó la banda del medio (color naranja) y se dializó contra PBS 1X (relación: 1/1000 v/v) por 24 h a 4 °C, para eliminar el exceso de sales. Esta fracción se dividió en dos viales, uno para mantener como fracción de LDL nativa, protegida de la oxidación utilizando butil-hidroxi-tolueno (BHT) y la segunda oxidada con CuSO₄ 8 h a temperatura ambiente (LDLox/LDLm). Ambas fracciones fueron protegidas de la luz y guardadas a 4 °C. Para la cuantificación de las lipoproteínas purificadas se utilizó el Kit de ácido bicinconínico (BCA, Pierce).

3.2.2 Marcación de lipoproteínas con sonda fluorescente Dil

Dil es una dialquilcarbocianina (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'- tetramethyl indocarbocyanine perchlorate) de cadena larga lipófila que se une a las lipoproteínas y emite fluorescencia a 565 nm. Las LDL (1 mg/ml) se incubaron durante 16 h a 37 °C con 3 µl de Dil (0,1 mM) por cada 1 mg de lipoproteína. Luego las LDL se filtran con un filtro de 0,45 µm de poro y finalmente se pasan a través de una columna C-10 para eliminar el colorante no unido.

3.2.3 Caracterización de las lipoproteínas

La concentración proteica fue determinada utilizando el kit de BCA, como fue mencionado previamente. Para ello las muestras diluidas se incubaron 30 min a 37 °C para dar lugar a la reacción del ácido bicinconínico y luego se midió la absorbancia a 562 nm. Por otro lado, se caracterizó la movilidad electroforética de las lipoproteínas en un gel de agarosa al 5 % en *buffer* Tris-glicina 1X pH=8,3 con posterior coloración con azul de *Coomassie*, para identificar las diferentes fracciones lipoproteicas.

3.2.4 Western blot

El día previo al experimento 1 millón de células fueron colocadas en cada pocillo de una placa de 6 pocillos. Luego de recibir los estímulos correspondientes las células fueron lisadas en PBS Triton X-100 suplementado con 1 mM de PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 10 mM de ortovanadato de sodio y coctel inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich). La concentración proteica fue determinada utilizando el kit BCA. Entre treinta y cuarenta µg de proteínas se diluyeron en *Sample Buffer* 5X con o sin el agregado de DDT (ditiotreitól)

según se necesitaron condiciones reductoras o no. Las muestras con DTT se calentaron a 100 °C y las que no presentan DTT a 75 °C durante 5 min. Los lisados proteicos totales fueron resueltos en geles EGPA-SDS (acrilamida/bisacrilamida) al 10%, 12% o 15% según requería el experimento y las proteínas a identificar. La corrida se llevó a cabo a voltaje constante (100 V) durante 120 min en buffer de corrida (Tris-glicina con SDS). Posteriormente las proteínas se transfirieron desde el gel a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare Life Science, Amsterdam) durante 60 min a 100 V. Para evitar las uniones inespecíficas, las membranas se bloquearon con leche libre de grasas al 5 % durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de sucesivos lavados con TBS 1X Tween20 se incubaron *overnight* con el anticuerpo primario a 4 °C, o según indicaba el fabricante. Luego de 3 lavados con TBS 1X-T-20 las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente se visualizaron utilizando el sistema *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA). Para la respectiva cuantificación de las bandas obtenidas en los ensayos de Western blot, se realizó una densitometría de dichas bandas utilizando el programa *ImageJ 1.x* (NIH).

3.2.4 Anticuerpos primarios

	Dilución	Marca comercial
AMPK (rabbit)	1/1000	CellSignaling
CD36 (rabbit)	1/500	Abcam
ERK ½ (mouse)	1/2000	SantaCruzBsc
GAPDH (rabbit)	1/2000	CellSignaling

HO-1 (rabbit)	1/1000	EnzoLifeScience
LC3 (rabbit)	1/1000	SigmaAldrich
LRP1 β (rabbit)	1/1000	Abcam
NQO1 (rabbit)	1/2000	CellSignaling
p62 (mouse)	1/1000	Abcam
p-AMPK (rabbit)	1/1000	CellSignaling
p-ERK 1/2 (mouse)	1/1000	CellSignaling
p-Src (rabbit)	1/1000	CellSignaling
Src (rabbit)	1/1000	CellSignaling
β -actin (mouse)	1/2000	SigmaAldrich

3.2.4.2 Anticuerpos secundarios

	Dilución	Marca comercial
Goat anti-mouse IgG IRDye® 680CW	1/10000	LI-COR®

Goat anti-rabbit IgG IRDye®

1/15000

LI-COR®

800CW

3.2.5 Citometría de flujo para el estudio de antígenos de superficie

El día anterior del experimento 1 millón de células fueron plaqueadas en cada pocillo de una placa de 6 pocillos. Luego de los estímulos correspondientes, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X frío y se levantan con *Accutase Enzyme Cell Detachment Medium* (Invitrogen®). Manteniendo todas las muestras a 4 °C, la suspensión celular se lava en *buffer* FACS (PBS 1X suplementado con suero de becerro 2 %, EDTA 1 mM y azida sódica 0,1 %) y se incuban con el anticuerpo primario marcado con fluoróforo por 20 min a 4 °C. En el caso de la citometría de flujo indirecta para evaluar la expresión de LRP1, las células lavadas se fijaron con *buffer* BD Cytifix™ (BD biosciences) por 20 min a 4 °C, se lavaron nuevamente con *buffer* FACS y se bloquearon las uniones inespecíficas con suero de cabra 10 % a 4 °C 30 min. Finalmente, las células se incubaron en *buffer* FACS con el anticuerpo primario por 20 min a 4 °C y luego de 3 lavados con el anticuerpo secundario marcado con Alexa fluor 488 en las mismas condiciones. Las muestras se evaluaron en citómetro *FACSCanto II* (BD biosciences) y se analizaron con el *software* *FlowJo* (ThreeStar). Anticuerpos primarios utilizados: anti-CD36 APC (1/25, R&D System®), anti-LRP1β (1/125, Abcam). Anticuerpos secundarios utilizados: Alexafluor 488 (Goat anti-mouse, 1/150; MolecularProbes®).

3.2.6 Citometría de flujo para la evaluación de ERO

Para la determinación de especies reactivas del oxígeno, luego de los estímulos las células fueron lavadas con HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, Gibco®). La sonda 2',7'-Diclorofluoresceína diacetato (Sigma Aldrich) se agregó en una concentración final de 1 mM en HBSS por 30 min. Posteriormente las células se lavaron con PBS 1X, se re-suspenden en *Accutase Enzyme Cell Detachment Medium* y se lavan con buffer FACS. El procesamiento de las muestras e interpretación de los resultados fue realizado igual que lo que se indicó previamente.

3.2.7 PCR tiempo real (RT-qPCR)

16 h previas al experimento 1 millón de células fueron sembradas por pocillo de una placa de 6 pocillos. Al finalizar los estímulos correspondientes y luego de lavar las células con PBS 1X frío, se agregó 1 ml de TRIzol® (Invitrogen™) para la extracción de ARN total. 1 ug de ARN total se transcribió en un volumen final de 20 µl utilizando *hexaprimers* (Invitrogen™) al azar y 50 U transcriptasa reversa M-MLV (Promega corp.). Para qPCR, el ADNc se mezcló con 1X SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific) y los *primers forward* y *reverse*, cuyas secuencias se especifican más abajo. qPCR fue llevada a cabo en un *Applied Biosystems 7500 real-time PCR System* con un *software* de detección de secuencias v1.4. Las condiciones de ciclado incluyen un calentamiento inicial a 95 °C por 10 min, seguido por 10 ciclos a 95 °C por 15 seg y 60 °C por 1 min. La especificidad fue verificada por análisis de la curva de fusión. La expresión relativa de genes fue calculada acorde con el método 2-ΔΔCt con GAPDH como control de carga. Cada muestra fue analizada en triplicado. No se observaron amplificaciones en PCRs utilizando agua DEPC como templado o muestras de RNA incubadas sin la transcriptasa reversa durante la síntesis de ADNc.

Primer	<i>Foward 5'-3'</i>	<i>Reverse 5'-3'</i>
--------	---------------------	----------------------

CD36	TCCTCTGACATTTGCAGGTCTATC	AAAGGCATTGGCTGGAAGAA
LRP1	TGGAGCAGATGGCAATCGACT	CGAGTTGGTGGCGTAGAGATAGTT
GAPDH	AAATGGTGAAGGTCGGTGTG	TGAAGGGGTCGTTGATGG
IL-1β	ACAGAATATCAACCAACAAGTGATAT TCTC	GATTCTTTCCTTTGAGGCCCA
IL-6	ATCCAGTTGCCTTCTTGGGACTGA	TAAGCCTCCGACTTGTGAAGTGGT
ABCG1	TCACCCAGTTCTGCATCCTCTT	GCAGATGTGTCAGGACCGAGT
ABCA1	AGTGATAATCAAAGTCAAAGGCACA C	AGCAACTTGGCACTAGTAACTCTG
MAPI	CGCTTGCAGCTCAATGCTAAC	TCGTACACTTCGGAGATGGG

3.2.8 Ensayos de inmuno-precipitación de CD36

Células RAW264.7 se incubaron con B-NO₂-OA 0.1 μ M por 1 h, en presencia o ausencia de SSO (*Sulfosuccinimidyl oleate*) a 4 °C con el objetivo de evitar la endocitosis del receptor. Luego de la incubación, las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1X y luego lisadas con PBS 1X Triton-X-100 1% conteniendo PMSF 1 mM, coctel inhibidor de proteasas y fosfatasas PhosSTOP™ (Sigma-Aldrich). Posterior a la cuantificación de proteínas con kit BCA, 500 μ g de proteínas fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-CD36 (1/50, Abcam) *overnight* a 4 °C. Luego, 20 μ l de proteína AG (Santa Cruz Bsc) fueron

agregados e incubados por 2 h a 4 °C. Las muestras se centrifugaron 5 min a 2500 rpm. Subsecuentemente, se realizaron lavados con PBS 1X Triton-X-100. Los *pellets* se re-suspendieron en *Sample Buffer* 1X en PBS y TCEP (tri-2-carboxietil-fosfina). Luego de calentar las muestras 5 min a 75 °C, se resuelve por electroforesis y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con estreptavidina marcada con HRP (Thermo Fisher Scientific) 1 h a 25 °C. Los revelados se llevaron a cabo usando *ChemiDoc MP System* (Bio-Rad).

3.2.9 Ensayos *in vitro* de interacción con CD36

La proteína recombinante para CD36 (CD36r, Abcam), la cual representa la porción correspondiente al dominio extracelular, fue incubada con B-NO₂-OA en presencia de NO₂-OA, OA y GSH en diferentes relaciones mol/mol por 30 min a 37 °C. Luego de las incubaciones las muestras fueron tratadas con *Sample Buffer* 1X conteniendo TCEP, como agente reductor suave, para evitar perder el complejo entre la proteína y el lípido, y se calentaron 5 min a 40 °C previo a ser corridas por electroforesis en gel EGPA-SDS. Las membranas se incubaron overnight con estreptavidina marcada con HRP y se siguió como se mencionó anteriormente. Para realizar estudios de reversibilidad de la reacción y desplazamiento de ligandos, CD36r y B-NO₂-OA se incubaron por 30 min a 37 °C y luego de este tiempo se compitió con OA y SSO por otros 30 min adicionales a 37 °C. Luego, las muestras fueron procesadas de igual manera a lo mencionado previamente.

3.2.10 Ensayos *in vitro* de interacción de CD36r con LDLm

El día previo al experimento 10 µg de la proteína recombinante CD36r fueron adsorbidos en una placa de 96 pocillos negra en 200 µl de *buffer* NaCO₃ pH

9,6. La placa se mantuvo toda la noche a 4 °C, se lavó 3 veces con PBS 1X y se incubó con NO₂-OA, OA 50 µg/ml y SSO 50 µM por 15 min a 37 °C. Luego de la incubación, 70 µg/ml de LDLm marcada con Dil (LDLm-Dil) fueron agregados 2 h a 37 °C. Finalmente se lava 3 veces con PBS 1X Triton-X-100 0,1 % y se determina la fluorescencia (excitación 530/25, emisión 590/35) en un lector de placas *Biotek Synergy HT*. Se realizó como blanco control un pocillo donde CD36r fue incubado en *buffer* sin LDLm-Dil y otro donde no se colocó CD36r.

3.2.11 Microscopía de inmuno-fluorescencia

Las células fueron sembradas sobre *coverlips* de vidrio de forma tal que al momento del experimento tuvieran una confluencia de aproximadamente 70 %. Luego de finalizados los correspondientes tratamientos con las LDLm marcadas las células se lavaron con PBS 1X frío en hielo y se fijaron con paraformaldehído/sucrosa al 4 % durante 15 min. Luego se agregó solución de *quenching* por 20 min, se permeabilizaron con saponina 0,5 % (v/v) y se bloquea con BSA (*bovine serum albumin*) al 2%. Luego se incubaron con el colorante nuclear DAPI en la dilución 1/10000 durante 1 h a 37 °C seguido de un ciclo de 3 lavados de 5 min con solución de albumina/saponina en PBS 1X. Finalmente, los *coverlips* se montan sobre portaobjetos utilizando *Mowiol* (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Las imágenes fluorescentes fueron adquiridas utilizando microscopio confocal (Olimpus FV 1200) del CEMINCO (Centro de Micro y Nanoscopía de Córdoba) UNC-CONICET, o microscopio de epifluorescencia (Leica DMI8). La cuantificación se realizó post-deconvolución utilizando *ImageJ* (NIH).

3.2.12 Ensayos de viabilidad celular

Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos. Posterior a los tratamientos correspondientes, la viabilidad celular se evaluó con el ensayo de reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Se agregó MTT 5 mg/ml al medio de cultivo en dilución 1/10 y se incubó durante 2-3 h a 37 °C y 5 % de CO₂. Posterior a la incubación, se descarta el medio de cultivo y se agregan 100 µl de DMSO (dimetil sulfóxido) por well. Luego de agitar por 5-10 min, se lee la absorbancia a 540 nm.

3.2.13 Ensayos de migración celular

Los ensayos para evaluar migración celular fueron realizados utilizando canastos *transwell* o cámaras de Boyden, tales como se representa más abajo (Fig. 11). Luego de colocar las cámaras en una placa de 12 pocillos, las células fueron suspendidas en la cámara superior con medio completo por 2 h para permitir la adhesión. Luego, en la cámara inferior se agregaron los diferentes estímulos en medio suplementado con SFB 2 % por 16 h. Luego de permitir la migración a través de los poros del canasto, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X. Para mejorar la visualización en el microscopio de las células migratorias, el remanente celular no migratorio se removió utilizando un hisopo. Finalmente, las membranas fueron fijadas con paraformaldehído 4 % por 30 min y teñidas con cristal violeta por 20 min para su posterior observación en un microscopio de campo claro (Olympus).

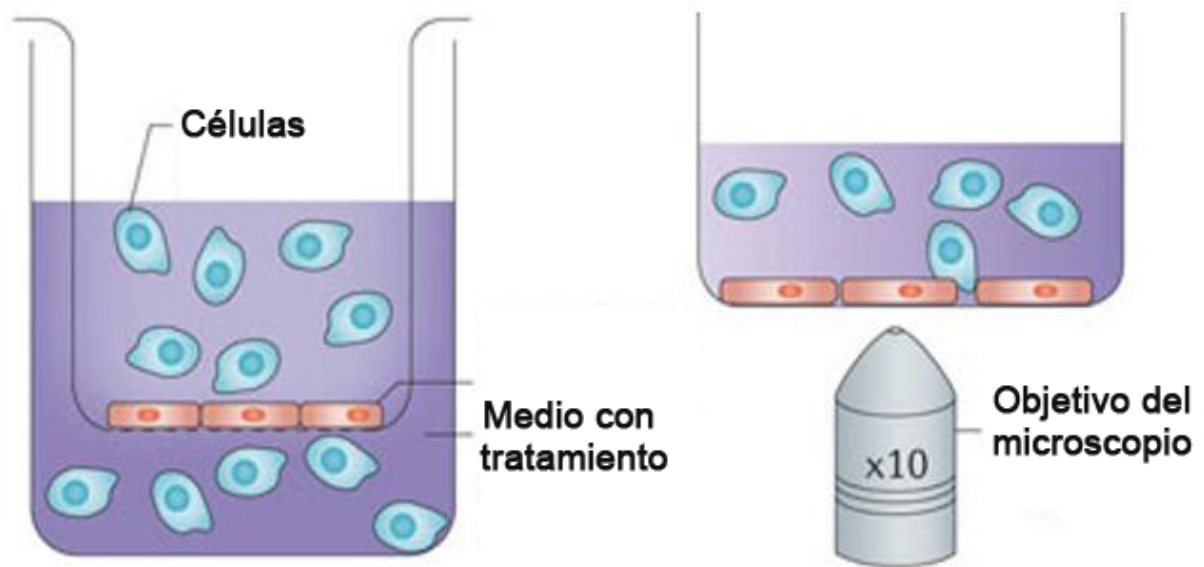


Fig. 11. Ensayo de migración *trans-well*. Modificado de *Creative Bioarray* (www.creative-bioarray.com, último acceso 10/08/2019). Figura representativa del ensayo de migración *transwell* con cámara de Boyden, donde las células se siembran en la cámara superior, y el medio con estímulos se coloca en la cámara inferior, permitiendo de esta manera que las células migren en dirección cámara superior-cámara inferior.

3.2.14 Extracción de lípidos para el análisis por espectrometría de masa

Para el análisis de la incorporación de LDLm, las células fueron tratadas con medio completo en presencia de 50 µg/ml de LDLm por 2, 4, 8 y 24 h. Luego del tratamiento los sobrenadantes se recuperaron, las células se levantaron y lisaron. Previo a la extracción de lípidos de las células estándares internos de colesterol (Cholesterol-d7; Avanti Polar Lipids, Inc.) y ésteres de colesterol (16:0-cholesteryl ester, Avanti Polar Lipids, Inc.) y TG (17:0, Un-chek Prep, Inc.) fueron agregados a una concentración final de 500 nM. La extracción de lípidos se realizó con ácido fórmico 1 M/Isoporpanol/Hexano (2:20:30, v/v/v) seguido por el agregado de 1 ml de hexano. La fase orgánica (superior) se transfirió a un vial limpio, se secó con nitrógeno, se reconstituyó en 100 µl de cloroformo/metanol (20/80, v/v) y se analizó por cromatografía líquida/espectrometría de masa (LC/MS).

Luego de definir como tiempo de trabajo 24 h en función de las diferencias observadas en la acumulación de colesterol y ésteres de colesterol en células

tratadas con LDLm comparado con las no tratadas, las células se pre-incubaron con NO₂-OA 5 µM y SSO 50 µM en DMEM-*high glucose* al 2 % SFB, por 20 min previo a las 24 h de tratamiento con las lipoproteínas en presencia del inhibidor de ACAT1, con el fin de enlentecer el eflujo y focalizar los experimentos principalmente a la captación de colesterol.

Para los ensayos de eflujo de colesterol, luego de cargar las células con 50 µg/ml LDLm por 24 h, las células se dejaron recuperar en medio DMEM 2 % SFB por 16 h. Posteriormente se agregaron los estímulos y comenzó a tomarse muestras de sobrenadante de 20 µl en los tiempos de 1, 2, 4, 8, 12 y 48 h. Al final del experimento las células se lavaron y levantaron como se indicó anteriormente. A las alícuotas de los sobrenadantes se le agregaron los estándares internos de colesterol y ésteres de colesterol a una concentración final igual a la indicada previamente. Subsecuentemente, se agregaron 500 µl de éter, la fase orgánica se aisló, se secó bajo nitrógeno y se re-suspendió en cloroformo/metanol para el posterior análisis por cromatografía líquida/espectrometría de masa (LC/MS).

Los solventes utilizados para las extracciones y análisis por espectrometría de masa fueron de grado HPLC o superior obtenidos de *Burdick and Jackson* (Muskegon, MI).

3.2.15 Análisis por LC-MS de colesterol y ésteres de colesterol

El análisis de colesterol y ésteres de colesterol fueron realizados utilizando UHPLC-ESI MS/MS con cromatografía en fase reversa (UHPLC focused Vanquish, Thermo Scientific) acoplado a un espectrómetro de masa *Q exactive* (Thermo Scientific) y a uno triple cuadrupolo (api 500, Sciex, San Jose, CA) en simultaneo. Las muestras fueron resueltas utilizando una columna C18 UHPLC (100 X 2,1 mm, tamaño de partículas de 1,7 µm; Thermo Scientific) con un sistema de gradiente de solventes constituido por un solvente A: agua 50 %/acetonitrilo 50 %/ácido fórmico 0,1 % y solvente B: isopropanol 90%/

acetonitrilo 10 %/ ácido fórmico 0,1 % a una velocidad de flujo de 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. Las muestras se colocaron en la columna a un 65 % de B y se eluyeron con un incremento lineal en el solvente B (de 65 % a 100 % en 6 min), el gradiente fue mantenido al 100 % de B por 9 min y luego se vuelve a las condiciones iniciales por 2 min.

El espectrómetro de masa *Q exactive* estuvo equipado con una fuente de *electrospray* HESI y fue operado en modo ion positivo utilizando los siguientes parámetros: temperatura del calentador de gas auxiliar 300 °C, temperatura capilar de 380 °C, flujo de envoltura de gas 38, flujo de gas auxiliar 11, flujo de gas de barrido 2, voltaje del spray 4,5 kV, nivel *S-lens RF* 70 %. Escaneado completo MS obtenido en una ventana de relación *m/z* de 300-950. Para el espectrómetro API 5000 los siguientes parámetros fueron utilizados: modo ion-positivo del *electrospray* con el gas de colisión en 5 unidades, cortina de gas a 40 unidades, voltaje del spray iónico 5000 V y temperatura 600 °C. El potencial de desarmado fue de 90 eV, potencial de entrada de 5 eV, energía de colisión 35 eV y el potencial de colisión de salida 10 eV. Las siguientes transiciones MRM se utilizaron: 369.3/147.3 y 376.3/147.3 para colesterol o ésteres de colesterol y d7-Colesterol o d7-ésteres de colesterol respectivamente (Fig. 12). El contenido de colesterol y esterés de colesterol fue determinado como analito/estándares internos/proteínas.

Los experimentos correspondientes al análisis de lípidos por espectrometría de masas, fueron realizados en el laboratorio del Dr. Burce A. Freeman y Dr. Francisco J Schopfer en la Universidad de Pittsburgh, Pittsburgh, PA, Estados Unidos, en el contexto de una colaboración activa entre los dos laboratorios.

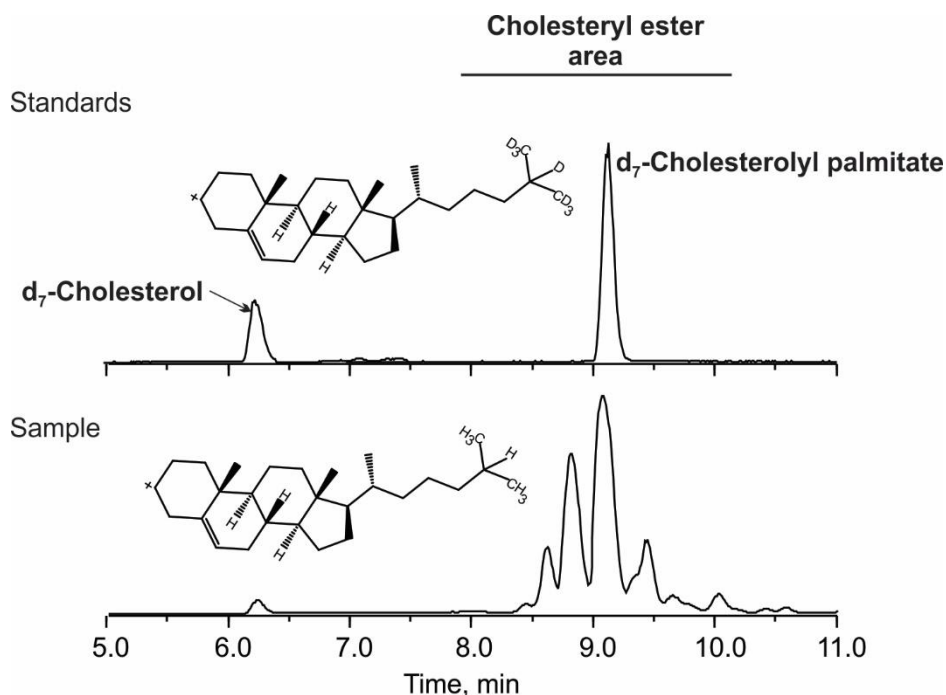


Fig. 12. Cromatograma representativo del perfil de colesterol y ésteres de colesterol. Comparación entre el colesterol y los ésteres de colesterol de las muestras (panel inferior, MRM: 369.3/147.2) y estándares deuterados (panel superior, MRM: 376.3/147.2).

3.2.16 Estudios *in silico*

Para caracterizar la interacción entre NO₂-OA y CD36, se realizaron ensayos *in silico*, para ello las estructuras orgánicas de los ligando fueron dibujadas en *MarvinSketch* (ChemAxon, Ltd.) y transformadas a formato PDBQT utilizando *AutoDock4*. La estructura cristalina de CD36 se obtuvo desde *Protein Data Bank* (PDB ID: 5LGD). La porción de *PfEMP1* unida a CD36 fue eliminada junto con todos los heteroátomos presentes en dicha estructura, seguido de todas las modificaciones necesarias y el agregado de cargas (118). La proteína se consideró como entidad rígida sin cadenas flexibles y las moléculas de agua y de glicerol fueron eliminadas, seguido del agregado de hidrógenos con el servidor H++ (biophysics.cs.vt.edu/H++, último acceso 8/8/2019). Para los estudios de *docking Smina* (biophysics.cs.vt.edu/H++) (una modificación de *AutoDock Vina*) (119) fue utilizado con dos funciones de puntuación distintas; *Autodock4* (120) y *Vinardo* (121), ambas alcanzando resultados similares. Los resultados obtenidos con *autodock4* fueron elegidos para ser incluidos en el

desarrollo de este trabajo tesis. Un criterio de exhaustividad de 1000 fue utilizado. Se exploraron 3 regiones alrededor de la Lys164 de la proteína a 4, 6 y 8 Å alrededor de este residuo. VMD (www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/), *Maestro* (Schrödinger Release 2019-2: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.) y el servidor PLIP (*PLIP web service, provided by TU Dresden/Redivia*, ultimo acceso 09/26/2019) fueron utilizado para el análisis de los resultados. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el Dr. Marcelo Puiatti del Departamento de Química Orgánica de ésta facultad.

3.2.17 Biotinilación de proteínas de superficie

Luego de realizar los correspondientes tratamientos, las células se lavaron con PBS 1X frío sobre hielo y se incubaron 2 h a 4 °C con una solución de biotina (EZ-link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin [cat: 21331], Thermo Scientific) de 0,12 mg/ml en PBS 1X pH 8. Luego, se realizó un lavado con solución de glicina 0,1 mM durante 30 min y un lavado con PBS 1X para eliminar el exceso de biotina. Luego las proteínas biotiniladas (proteínas de superficie celular, debido a que la reacción se lleva a cabo a 4 °C) se aislaron utilizando *beads* de agarosa conjugadas con estreptavidina (Pierce™ Streptavidin Agarose [cat: 20353], Thermo Scientific). La incubación con los *beads* se realizó por 2 h a temperatura ambiente, seguido de una centrifugación a 5000 rpm por 5 min. El precipitado de los *beads* contiene las proteínas de membrana biotiniladas unidas a la estreptavidina presente en la superficie de los mismos. Estas proteínas de membrana se analizaron por Wester blot.

3.2.18 Tratamiento estadístico de los datos

Según las condiciones experimentales se realizaron diferentes tratamientos estadísticos. En el caso de presentar solo dos grupos experimentales, se

realizó un test *t-student*. En el caso de presentar tres o más grupos experimentales se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido por un test *Bonferroni* y en el caso que en los grupos experimentales más de una condición experimental afectara a la variable dependiente se realizó un ANOVA de dos vías seguido por un test *Bonferroni*. En ambos casos el valor $p < 0,05$ se consideró significativo. En todos los experimentos los gráficos representan media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. En el caso de la cuantificación de inmuno-fluorescencias al menos 20 células fueron evaluadas al azar por condición. Éste análisis estadístico se realizó con el software GraphPad prism 5.0.

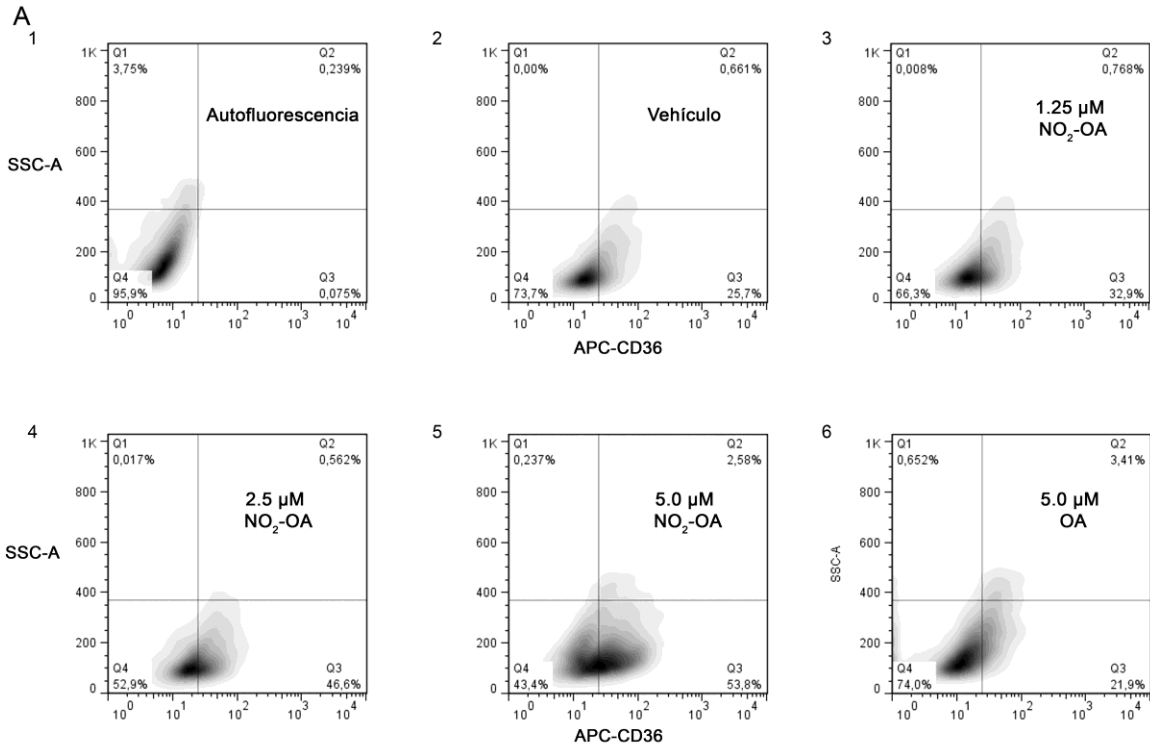
4. RESULTADOS

4.1 Estudio de la regulación de CD36 por acción del ácido nitro-oleico (NO₂-OA)

4.1.1 Efecto del NO₂-OA sobre la expresión en membrana plasmática de CD36

Como se mencionó en la sección 1.2.2, la expresión génica del receptor *scavenger* CD36, se encuentra regulada principalmente por el factor de transcripción *Nrf2*, de la vía antioxidante *Keap1/Nrf2*, y por el receptor nuclear *PPAR* γ (122, 123). Debido a que ambas vías de regulación han mostrado ser blanco de los ácidos grasos nitrados (124, 125), nos propusimos estudiar el efecto del NO₂-OA sobre la expresión del receptor CD36 en macrófagos.

En primera instancia, debido a que CD36 es un receptor de membrana (126), y es allí donde ejerce sus principales funciones de reconocimiento e internalización de ligandos (4, 31), estudiamos mediante citometría de flujo la expresión de CD36 en membrana de células RAW264.7 bajo condiciones de impermeabilización. La figura 13A demuestra que el tratamiento con el NO₂-OA incrementa de manera dosis dependiente (1,25 a 5 μ M) la proporción relativa de células positivas para la expresión de CD36 (de un 25,7 % a un 53,8 %) luego de 8 h de tratamiento. Asimismo, el tratamiento con el ácido oleico (OA) como control no electrófilo, no tuvo efecto sobre la expresión de CD36 en membrana. En la figura 13B se representan estos resultados como el histograma de expresión de CD36 en la línea celular RAW264.7.



B

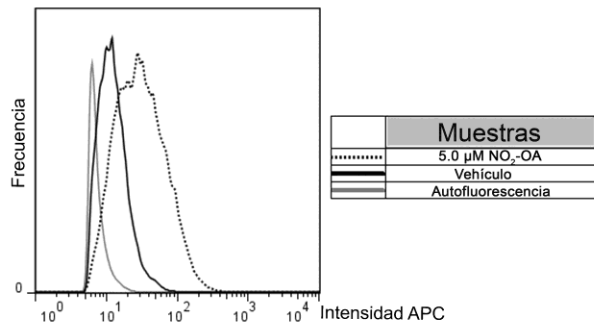


Figura 13. Efecto del NO₂-OA en la expresión de CD36 en células RAW264.7. A. Análisis por citometría de flujo directa de CD36 en células RAW264.7 impermeabilizadas, tratadas con el NO₂-OA, OA o vehículo durante 8 h. Los resultados son representados en diagramas de densidad, donde se grafica la complejidad citoplasmática (Side Scatter-A) vs intensidad de fluorescencia en el canal APC para CD36. B. Histograma de la frecuencia vs intensidad de fluorescencia de CD36 (APC). La línea gris representa la auto-fluorescencia de las células, mientras que la línea negra y la punteada representan el tratamiento con el vehículo y NO₂-OA 5 μM por 8 h respectivamente.

Posteriormente, se calculó la intensidad de fluorescencia media o MFI por sus siglas en inglés, el cual nos da idea del nivel de expresión de CD36 por unidad celular evaluada. El tratamiento con NO₂-OA mostró un aumento de la expresión celular de CD36 en superficie dependiente de la dosis (Fig. 14A) y con una cinética de expresión máxima a tiempos entre las 4 y 8 h (Fig. 14B).

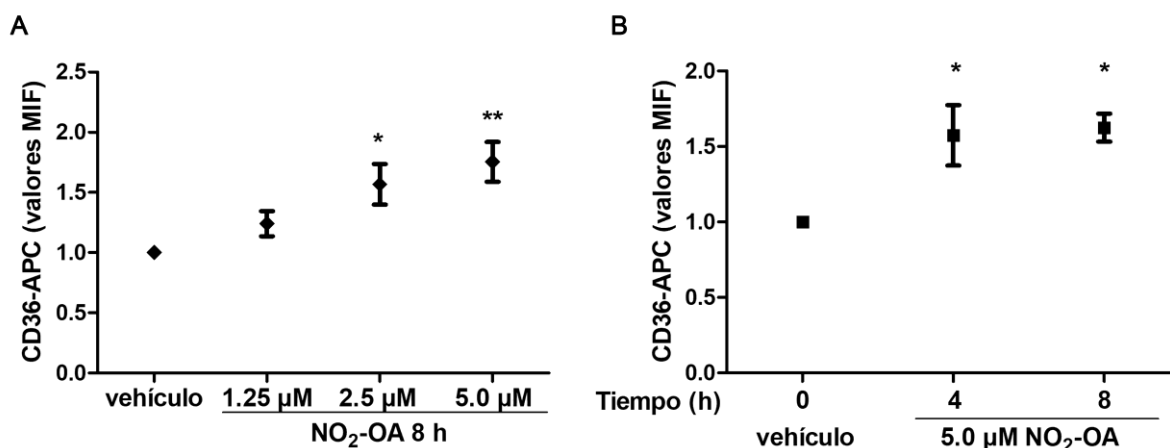


Figura 14. Efecto del NO₂-OA sobre la expresión de CD36 en membrana plasmática de células RAW264.7. A y B. Evaluación de la dependencia de la dosis y del tiempo en la intensidad de fluorescencia media de CD36 inducida por el NO₂-OA en células RAW 264.7 impermeabilizadas. Los datos representan la Media \pm SEM de los MFI obtenidos de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición vehículo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Finalmente, para confirmar éstas observaciones, procedimos a analizar la expresión superficial de CD36 en macrófagos aislados de médula ósea (BMDM) de ratones BALBc salvajes (Wild type, WT). Luego de 8 h de tratamiento, el NO₂-OA indujo un significativo incremento en la expresión de CD36, en forma dependiente de la dosis, dando robustez a los hallazgos descritos en la línea celular RAW264.7 (Fig. 15). En éste sistema celular el OA incrementó de manera estadísticamente significativa la expresión de CD36 pero en menor medida que el estímulo con NO₂-OA, resultados similares habían sido descritos en otros trabajos (127, 128).

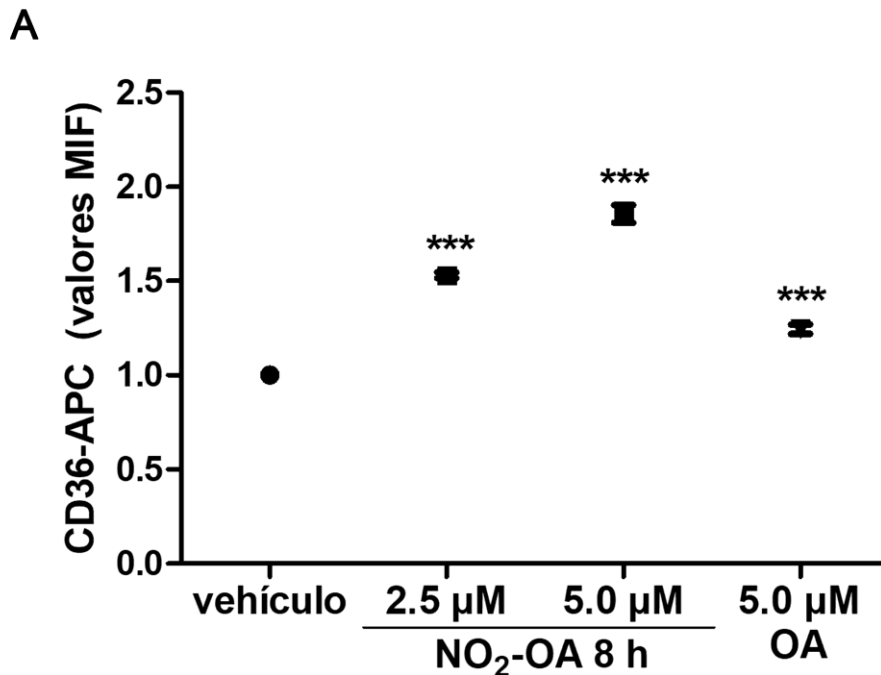


Figura 15. Efecto de NO₂-OA en la expresión de CD36 en membrana plasmática de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM). Evaluación mediante citometría de flujo de CD36 en superficie de BMDM impermeabilizadas luego de 8 h de tratamiento con 2,5 o 5,0 μM de NO₂-OA y 5,0 μM de OA. Los datos representan la Media ± SEM de los MFI obtenidos de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición vehículo, *** p<0.001.

4.1.2 Estudio de la regulación transcripcional del receptor CD36

ejercida por el NO₂-OA

Para evaluar la regulación ejercida por el NO₂-OA sobre la expresión de CD36, se procedió a evaluar el nivel de los transcritos mediante ensayos de RT-qPCR. En la figura 16 se muestra que el NO₂-OA incrementa los niveles de ARNm de CD36 en forma dependiente del tiempo, alcanzando un aumento significativo a las 2 h y retornando a los niveles basales 6 h posteriores al tratamiento. El OA no mostró cambios significativos en la regulación de los transcritos de CD36, similar a lo descrito por otros estudios realizados en macrófagos RAW264.7 y células musculares lisas (129, 130). Sin embargo, en otros tipos celulares como adipocitos y

células tumorales, el OA moduló a nivel transcripcional la expresión de CD36 (127, 128).

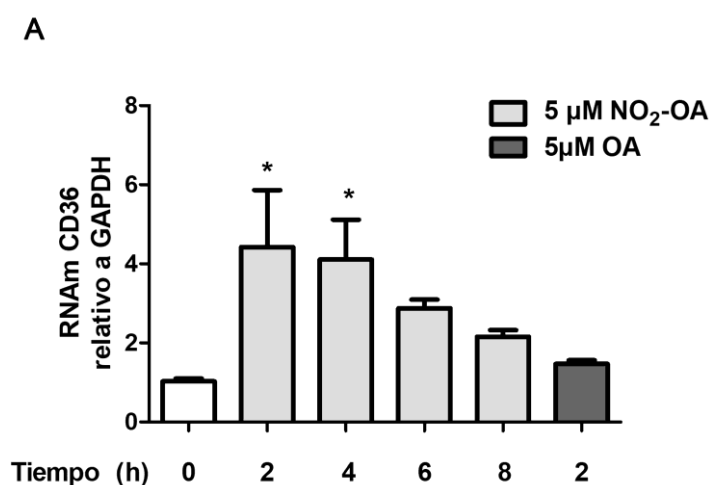


Figura 16. Modulación transcripcional de CD36 por NO₂-OA. Células RAW264.7 fueron tratadas con NO₂-OA o OA a diferentes tiempos (2, 4, 6 y 8 h). Las células se levantaron en Trizol® y posterior a la extracción del ARNm las muestras se analizaron por RT-qPCR. Los datos representan la Media ± SEM obtenidos de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición tiempo 0 h, * p<0.05.

Con el objetivo de evaluar si el incremento en los niveles de transcritos se traducía en un aumento en los niveles proteicos del receptor CD36 y de establecer el mecanismo que participa de esta regulación, analizamos el efecto del NO₂-OA sobre la expresión proteica de CD36 mediante ensayos de Western blot. En estos ensayos Bardoxolona (CDDO) fue utilizado como un control positivo de activación de la vía *Keap1/Nrf2* y de la expresión de CD36. La figura 17 muestra que el NO₂-OA incrementa significativamente los niveles proteicos de CD36 después de 8 h de tratamiento, de manera dependiente de la dosis. CDDO, como era esperado, mostró resultados similares a los observados con NO₂-OA. Como se describió previamente, el NO₂-OA activa la vía *Keap1/Nrf2*, responsable de la regulación de la expresión de enzimas detoxificantes o de fase II, como HO-1 y NQO1. Es por ello que la expresión de HO-1 fue evaluada como control positivo de activación de ésta vía de señalización intracelular.

A

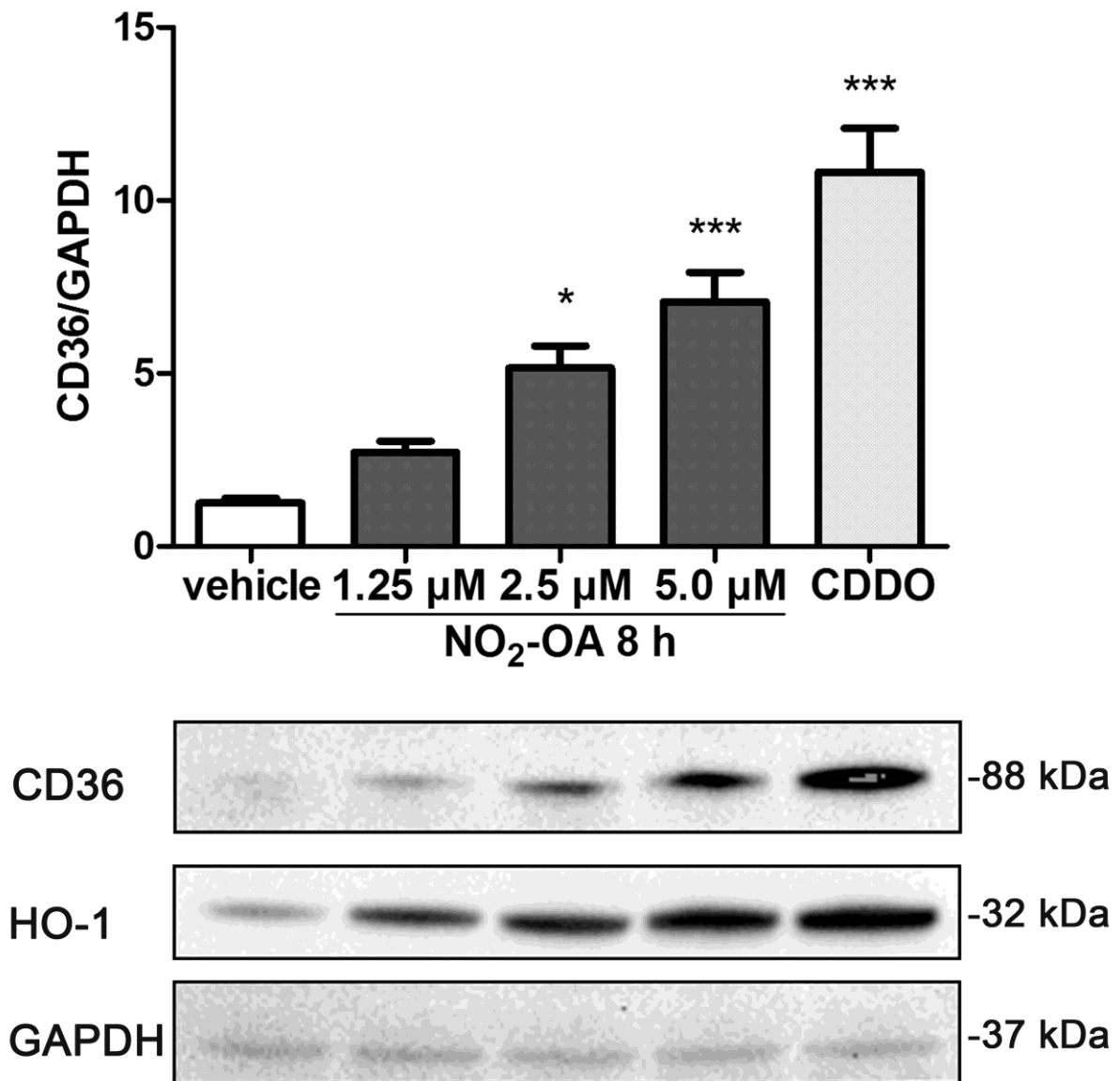


Figura 17. Expresión proteica de CD36 por NO₂-OA. Células RAW264.7 fueron incubadas con 1,25, 2,5 o 5 μM de NO₂-OA o 300 nM de CDDO, conocido activador de la vía *Keap1/Nrf2*, durante 8 h. Los datos representan la Media ± SEM obtenidos de un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición vehículo, * p<0.05, *** p<0.001.

4.1.3 Estudio de la participación del receptor nuclear *PPAR* γ

en la expresión de CD36 mediada por el NO₂-OA

Como se mencionó anteriormente, uno de los factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de CD36 es el receptor nuclear *PPAR* γ . Éste funciona como un factor de transcripción activado por ligandos, principalmente de naturaleza lipídica y regula importantes procesos involucrados en el metabolismo de lípidos, glúcidos y en la respuesta inflamatoria (44). Debido a que los nitrolípidos fueron descritos como ligandos de *PPAR* γ , se evaluó la participación de este receptor en la regulación de CD36 utilizando estrategias farmacológicas. La figura 18 representa ensayos de Western blot que muestran que rosiglitazona (agonista de *PPAR* γ) no afecta la expresión proteica de CD36 y HO-1, y que GW9662 (antagonista de *PPAR* γ), es incapaz de bloquear la regulación proteica de CD36 mediada por el NO₂-OA. Además, al evaluar el efecto del OA como control no electrófilo, no se observaron cambios significativos en CD36. Estos resultados sugieren que el receptor *PPAR* γ no es el principal regulador de la expresión de CD36 inducida por el NO₂-OA.

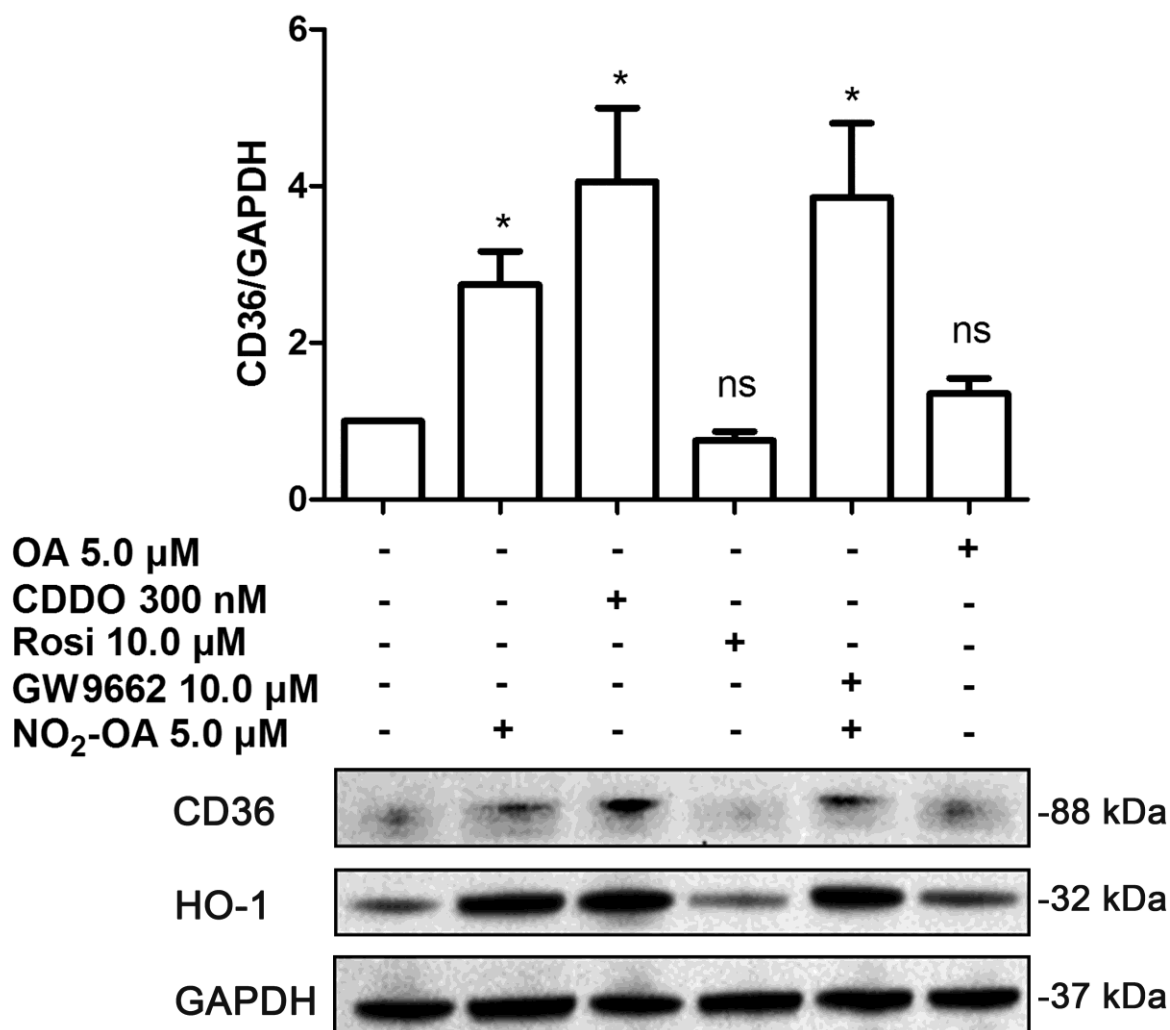


Figura 18. Estudio de la participación de *PPARγ* en la expresión proteica de CD36. A. Las células fueron tratadas por 8 h con rosiglitazona 10 μM, CDDO 300 nM, OA 5 μM y con NO₂-OA 5 μM. Este último tratamiento con o sin pre-incubación con GW9662 10 μM. Los datos representan la Media ± SEM obtenidos de un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición control sin tratamiento, * p<0.05.

4.1.4 Estudio de la participación de la vía *Keap1/Nrf2* en la expresión de CD36 mediada por el NO₂-OA

Con el objetivo de estudiar la participación del factor de transcripción *Nrf2* en la regulación de la expresión de CD36, se utilizaron BMDM de ratones BALBc deficientes (*Knock out, KO*) para *Nrf2* y salvajes (WT), como controles. La figura 19A muestra ensayos de Western blot, los cuales revelan que el tratamiento con el NO₂-OA incrementa significativamente los niveles proteicos de CD36 en macrófagos provenientes de los ratones WT, mientras que en macrófagos derivados de ratones KO para *Nrf2* esta regulación se ve significativamente disminuida. CDDO fue utilizado como un control positivo de regulación de la expresión de CD36 vía activación del factor de transcripción Nrf2. Por otro lado, el análisis de los transcritos de CD36 en cultivos primarios de macrófagos *Nrf2*-KO (Fig. 19B) incubados con NO₂-OA mostró, similar que a nivel proteico, una significativa pérdida de la inducción de RNAm para CD36 comparado con los resultados provenientes de macrófagos obtenidos de ratones WT. En éste modelo celular el OA mostró incrementar los niveles de ARNm para CD36. Estos resultados sugieren una participación clave de la vía de señalización *Keap1/Nrf2* en la regulación de la expresión de CD36 inducida por NO₂-OA.

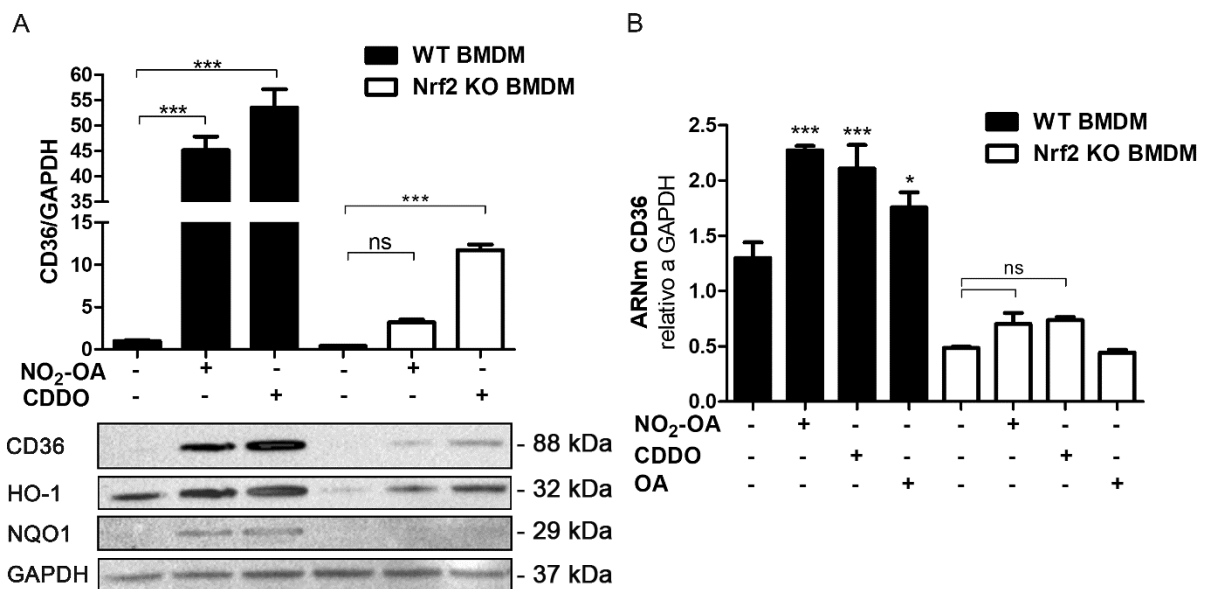


Figura 19. Rol del factor de transcripción *Nrf2* en la expresión de CD36. **A.** Análisis de los niveles proteicos de CD36 luego de 8 h de tratamiento con NO₂-OA 5 μ M, CDDO 300 nM en BMDM de ratones WT y KO para *Nrf2* por Western blot. **B.** Análisis de los niveles de transcritos de CD36 luego de 4 h de tratamiento con NO₂-OA 5 μ M, CDDO 300 nM y OA 5 μ M, por RT-qPCR en BMDM de ratones WT y KO para *Nrf2*. Los datos representan la Media \pm SEM obtenidos de un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición control sin tratamiento dentro de cada grupo experimental (Nrf2 KO o WT), * p<0.05, *** p<0.001.

4.2 Estudio del efecto del NO₂-OA sobre la funcionalidad del receptor CD36

4.2.1 Efecto del NO₂-OA en la incorporación y acumulación de

colesterol y ésteres de colesterol en células RAW264.7

En etapas tempranas de la aterosclerosis, el receptor CD36 participa en el reconocimiento e incorporación de LDLm en macrófagos, favoreciendo la acumulación intracelular de colesterol y sus ésteres, e induciendo su diferenciación a célula espumosa. Debido a ello, nos propusimos estudiar el efecto del NO₂-OA en la incorporación de LDLm en células RAW264.7 mediante la determinación de los niveles intracelulares de colesterol y sus esteres por espectrometría de masas. En la figura 20 se muestra que las células incubadas con LDLm en presencia del nitroalqueno por 24 h, acumulan niveles significativamente menores, tanto de colesterol (A) como de ésteres de colesterol (B), comparado con las células que solo fueron incubadas con LDLm.

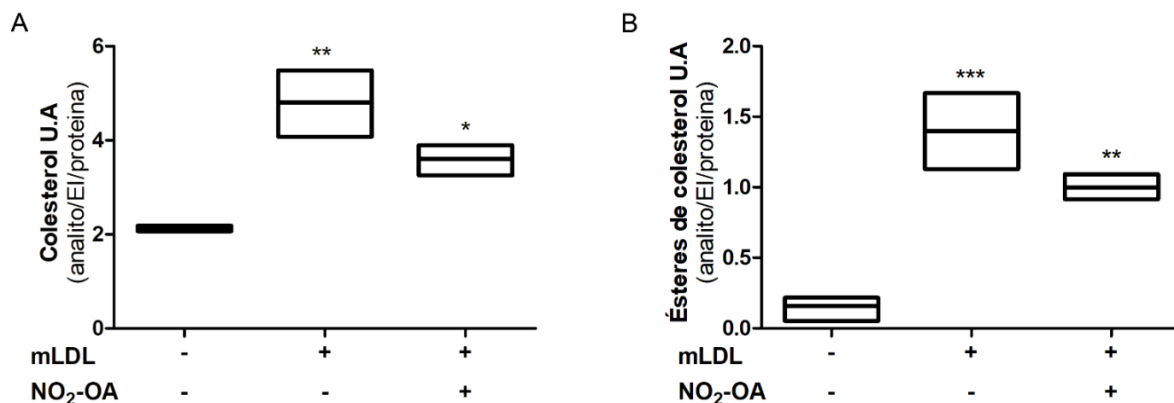


Figura 20. Efecto del NO₂-OA en la incorporación y acumulación intracelular de colesterol y ésteres de colesterol en células RAW264.7. Macrófagos RAW264.7 fueron tratados durante 24 h con 50 µg/ml de LDLm en presencia o ausencia de NO₂-OA 5 µM en *DMEM-high glucose* suplementado con BSA 2 %. El contenido de colesterol (A) y ésteres de colesterol (B) dentro de las células fue analizado mediante LC/MS. Los datos representan la Media ± SEM obtenidos de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición control sin tratamientos, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Con el objetivo de evaluar el efecto de los nitrolípidos en la unión e incorporación de las LDLm, las células RAW264.7 se incubaron con LDLm conjugadas con la sonda fluorescente Dil en presencia o ausencia del pre-tratamiento con NO₂-OA y posteriormente se evaluó unión e internalización mediante microscopía de fluorescencia. La figura 21, muestra que la pre-incubación de los macrófagos con 5,0 μM de NO₂-OA reduce significativamente la incorporación de las LDLm marcadas con Dil. Resultados similares a los observados con NO₂-OA fueron descritos, en células RAW264.7 pre-incubados con el ligando antagonista de CD36, SSO (131, 132).

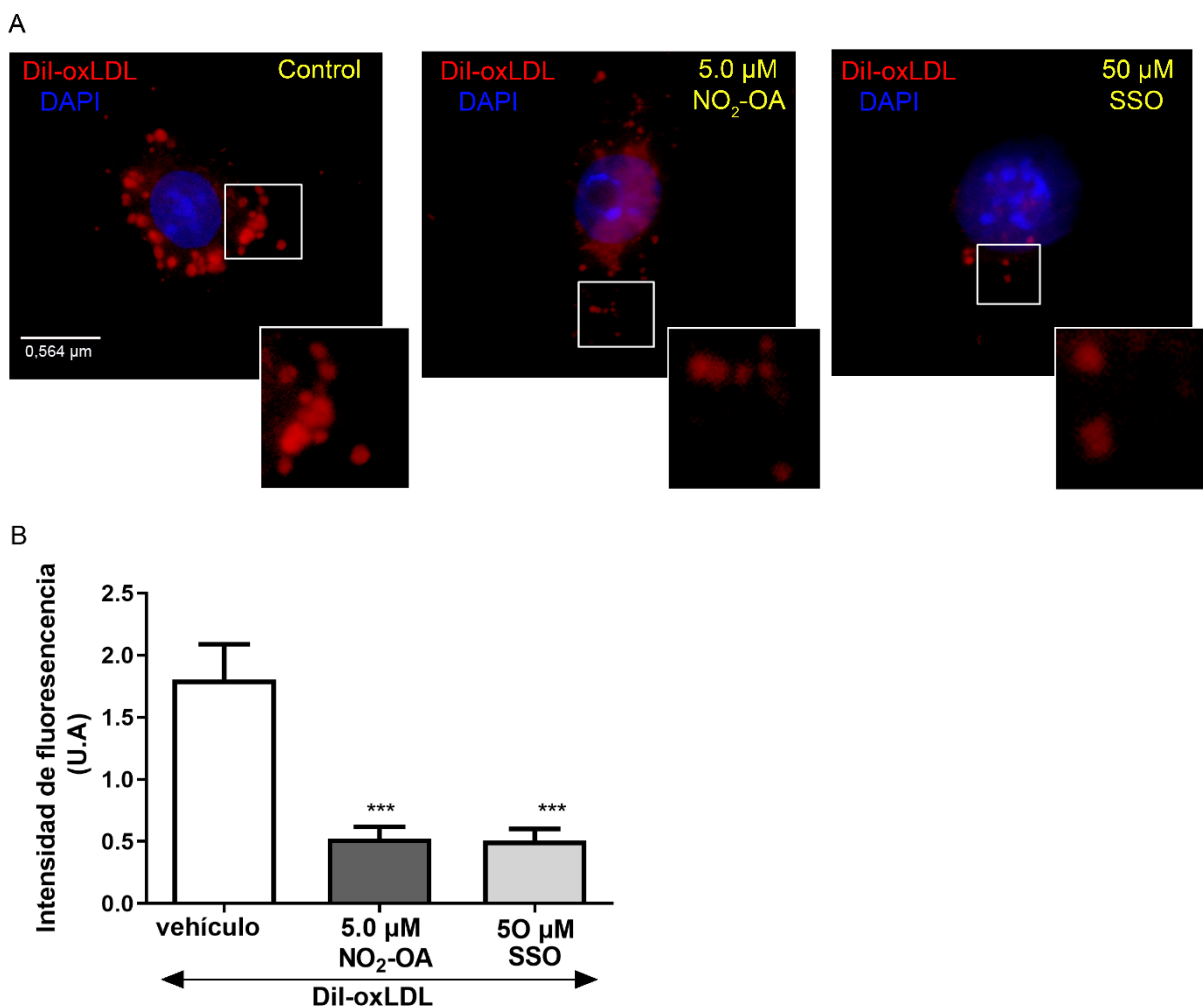


Figura 21. Efecto del NO₂-OA en la incorporación de LDLm-Dil en células RAW264.7. Células RAW264.7 fueron pre-incubados con NO₂-OA 5 μM, SSO 50 μM ó vehículo por 15 min previo al tratamiento con 50 μg/ml de LDLm-Dil por 2 h a 4 °C para permitir la unión de las lipoproteínas a los receptores de superficie. Posteriormente las células fueron lavadas y colocadas a 37 °C para permitir su incorporación. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal (Olympus FV1200). Para la cuantificación, al menos 20 células por condición fueron analizadas. **A.** Las imágenes son representativas de uno de al menos 3 experimentos independientes. **B.** Los datos representan la

Media en unidades arbitrarias (U.A) \pm SEM obtenidas de las cuantificaciones de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición vehículo, *** $p < 0.001$.

Con el objetivo de estudiar *in vitro* si el NO₂-OA afecta la interacción de LDLm con CD36, se realizaron experimentos de unión utilizando la proteína recombinante de CD36 (rCD36) la cual fue adsorbida en una placa de 96 pocillos y se evaluó su interacción con las lipoproteínas conjugadas a Dil en presencia del nitroalqueno (Fig. 22A). En la figura 22B, se muestra que el pre-tratamiento con el NO₂-OA o SSO (control positivo de desplazamiento), reducen significativamente la unión de LDLm-Dil a CD36 hasta valores próximos los obtenidos para el blanco de reacción. En este sistema el OA no mostró un efecto inhibitorio significativo. Estos resultados revelan la inhibición en la unión de LDLm a CD36 inducida por el nitroalqueno, sustentando los hallazgos previamente descritos en el sistema celular de macrófagos RAW264.7.

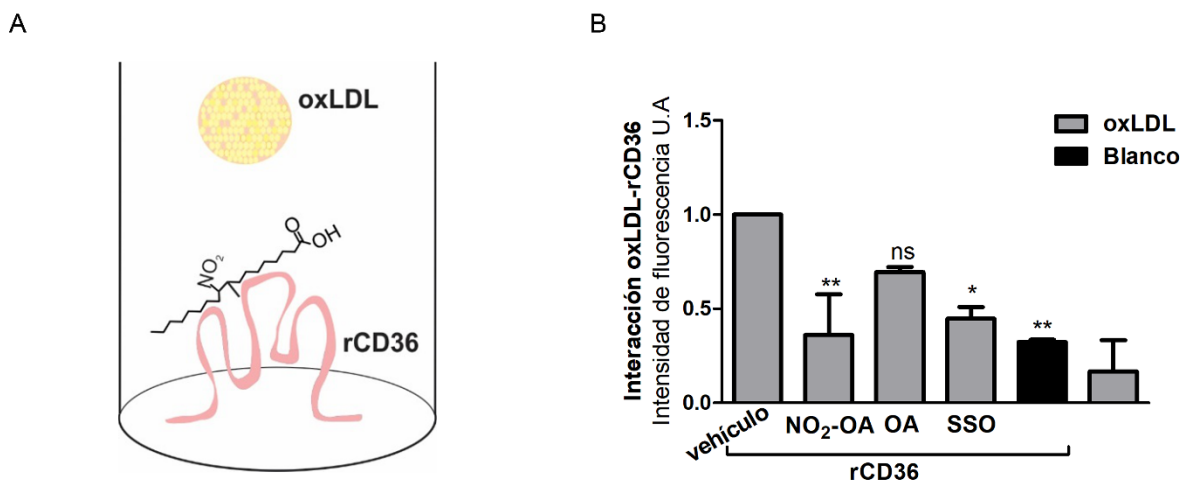


Figura 22. Efecto del NO₂-OA en la interacción entre LDLm-Dil y CD36. **A.** Esquema representativo del diseño experimental tipo ELISA donde la proteína rCD36 se adsorbió a una placa de 96 pocillos, para luego estudiar el efecto de los ligandos en la interacción de la proteína recombinante con LDLm-Dil. **B.** NO₂-OA, OA, SSO o vehículo fueron incubados por 15 min previo a la incubación con LDLm-Dil por 2 h a 37 °C. Luego se lavó el exceso y se midió la intensidad de fluorescencia en un lector de placas *Biotek Synergy HT*. Dos blancos fueron realizados, uno con la proteína recombinante en ausencia de LDLm-Dil y el otro con LDLm-Dil en ausencia de la proteína recombinante. Los datos representan la Media \pm SEM obtenidas de las cuantificaciones de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición vehículo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.3 Estudio *in vitro* de la interacción entre NO₂-OA y CD36

4.3.1 Caracterización de la interacción de NO₂-OA con CD36 en

células RAW264.7

En función de los resultados de la inhibición de la unión de las LDLm al receptor CD36 mediada por el NO₂-OA; nos planteamos estudiar si los nitroalquenos interaccionan con CD36 y de esta forma bloquean su interacción con las lipoproteínas modificadas. Para ello, realizamos un ensayo de co-inmunoprecipitación utilizando como herramienta el NO₂-OA marcado con biotina (B-NO₂-OA) el cual se incubó con células RAW264.7 a 4°C para favorecer la interacción con el CD36 de membrana y evitar la endocitosis de dicho receptor. La inmunoprecipitación del receptor CD36 en células RAW264.7 incubadas con B-NO₂-OA, reveló la interacción entre éstas dos moléculas (Fig. 23). Dicha interacción fue inhibida cuando las células fueron pre-incubadas con SSO, agente alquilante que reacciona de forma covalente e irreversible con la Lys164 de CD36 (38). Estos resultados representan el primer indicio que los nitroalquenos interaccionarían de manera directa con CD36 y que dicha interacción podría tener lugar en el sitio de unión a ligandos, involucrando residuos críticos, como es la Lys164.

A

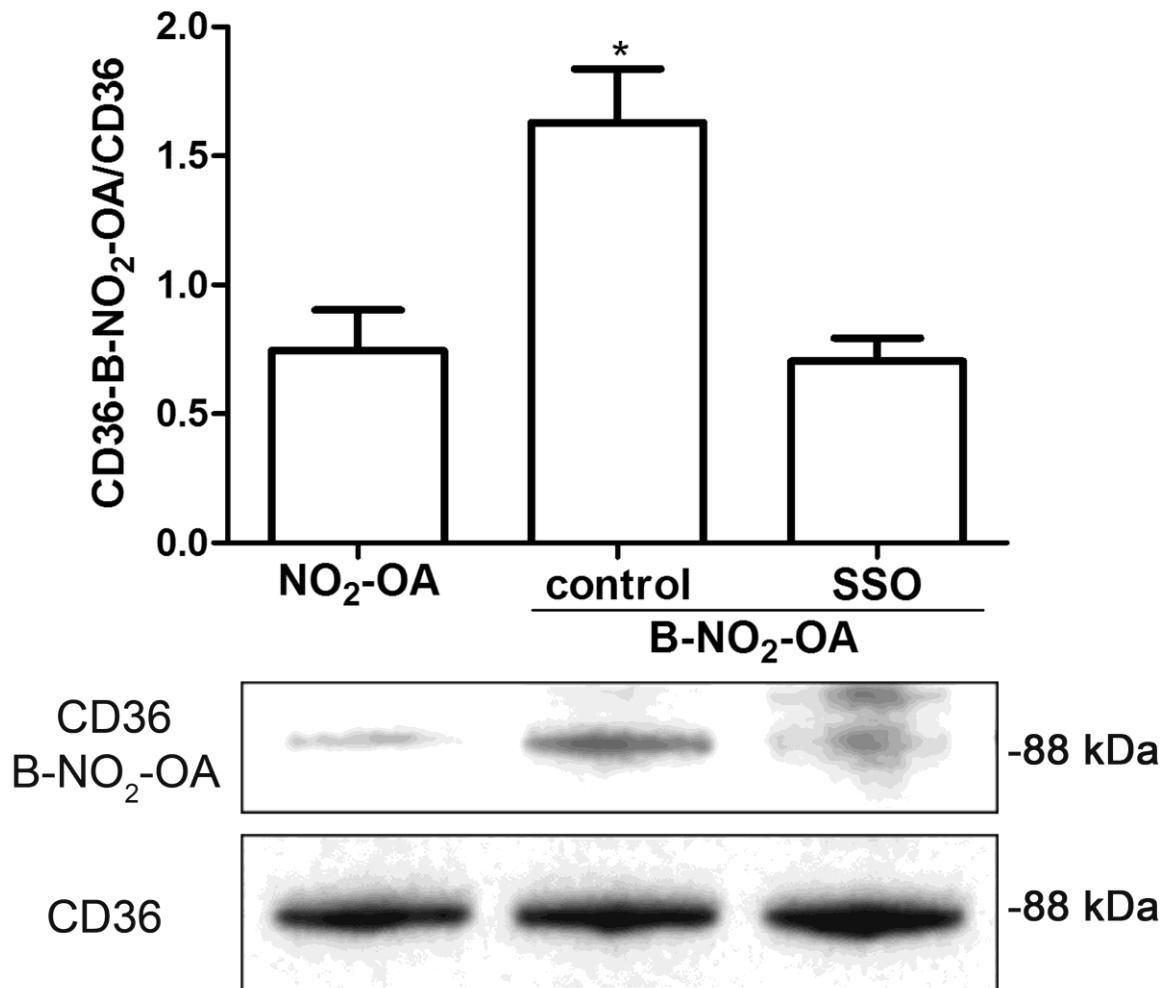


Figura 23. Estudio de la interacción entre NO₂-OA y CD36 en macrófago RAW264.7. A. Las células RAW264.7 fueron incubadas con 0,1 µg/ml de B-NO₂-OA por 15 min a 4 °C en presencia o ausencia de 50 µM de SSO, utilizando como control libre de biotina el NO₂-OA no marcado con biotina. Luego de inmuno-precipitar la proteína CD36 según se indicó en la sección de materiales y métodos, las muestras fueron separadas por electroforesis en poliacrilamida (EGPA-SDS) y los inmuno-blot revelados con estreptavidina-HRP. Los datos representan la Media ± SEM obtenidas de un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición de NO₂-OA no marcado, * p<0.05.

4.3.2 Estudio in vitro de la interacción entre NO₂-OA y CD36

Con el objetivo de estudiar las propiedades de la interacción entre el NO₂-OA y CD36, se realizaron ensayos de interacción directa donde se incubó el B-NO₂-OA

con rCD36 en diferentes relaciones molares (0,5; 1,0; 2,0; 5,0; y 10,0; B-NO₂-OA/rCD36) durante 30 min. Como se muestra en la figura 24, el NO₂-OA interaccionó de manera dosis dependiente con el receptor CD36. A partir de estos resultados se eligió como concentración de trabajo para los experimentos subsiguientes la relación molar 2:1 ya que mostro una señal robusta, producto de la interacción con CD36.

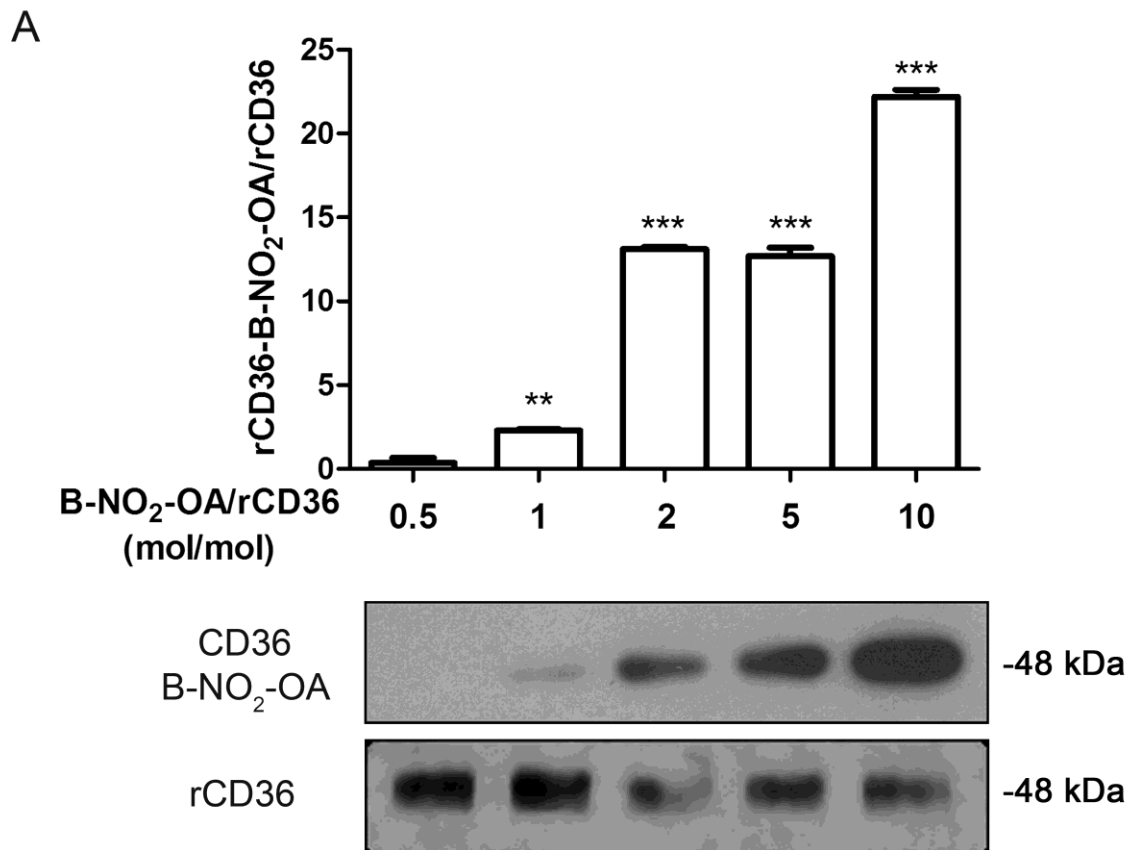


Figura 24. Estudio *in vitro* de la interacción entre NO₂-OA y CD36. A. La proteína recombinante de CD36 (0,5 µg) fue incubada con B-NO₂-OA a diferentes relaciones molares, según se indica en la figura, por 30 min. Los complejos rCD36-B-NO₂-OA fueron separados por EGPA-SDS y los inmunoblot revelados con estreptavidina-HRP. Los datos representan la Media ± SEM obtenidas de un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición 0.5 relación mol/mol, ** p<0.01, *** p<0.001.

4.3.3 Ensayos de competencia de ligandos por su unión a CD36

Con el objetivo de evaluar si el nitroalqueno podría interferir con la unión de otros ligandos a CD36, se realizaron ensayos de competencia. Para ello, la unión del B-NO₂-OA a rCD36 fue competido con NO₂-OA no marcado y OA en diferentes relaciones molares expresadas como mol ligando/mol B-NO₂-OA. La figura 25 muestra que tanto el NO₂-OA no marcado, como el OA compiten al nitroalqueno biotinilado por la unión a CD36. Además, el OA mostró una mayor inhibición de la unión del ligando biotinilado a la relación molar de 1:10, sugiriendo que podría tener un acceso más facilitado al sitio de unión, mientras que a concentraciones de 1/100 equivalentes a 0,14 mM podría estar alcanzando la concentración micelar crítica (CMC) y por ello disminuyendo su unión al receptor.

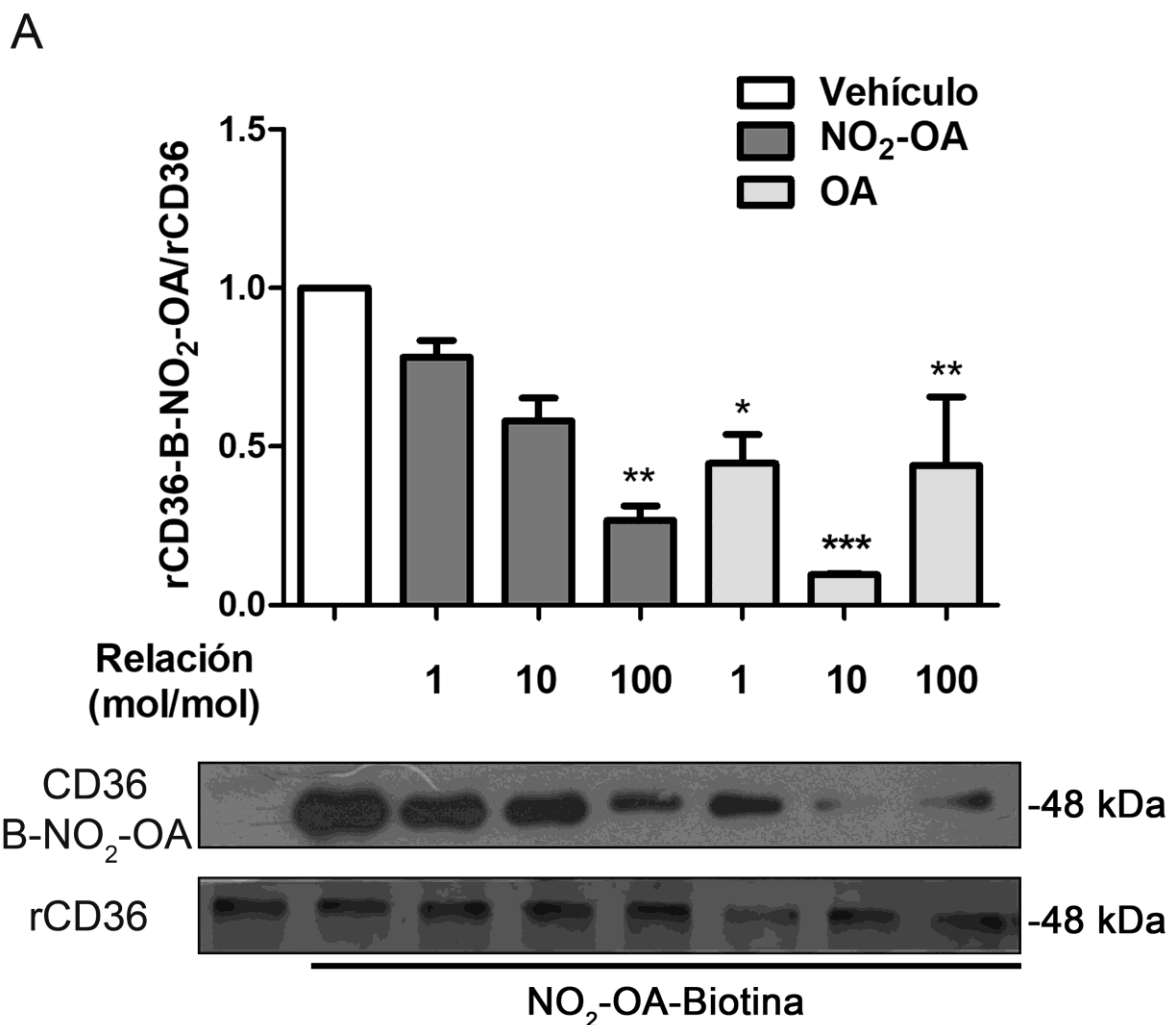


Figura 25. Ensayos de competencia entre diferentes ligandos de CD36. A. rCD36 fue incubada con B-NO₂-OA en presencia de NO₂-OA y OA en diferentes relaciones molares (moles ligando/moles de B-NO₂-OA) por 30 min. Los complejos luego fueron evaluados en un EGPA-SDS y revelados con

estreptavidina-HRP. Los datos representan la Media \pm SEM obtenidas de un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición vehículo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Finalmente, se evaluó la reactividad electrofílica del NO₂-OA en la unión a CD36. Para ello, se compitió la unión con el agregado de glutatión reducido (GSH) al ensayo. El GSH inhibió de forma dosis dependiente la formación y detección del complejo rCD36-B-NO₂-OA (Fig. 26) ya que reacciona de forma directa con el B-NO₂-OA mediante la reacción de adición de Michael (14).

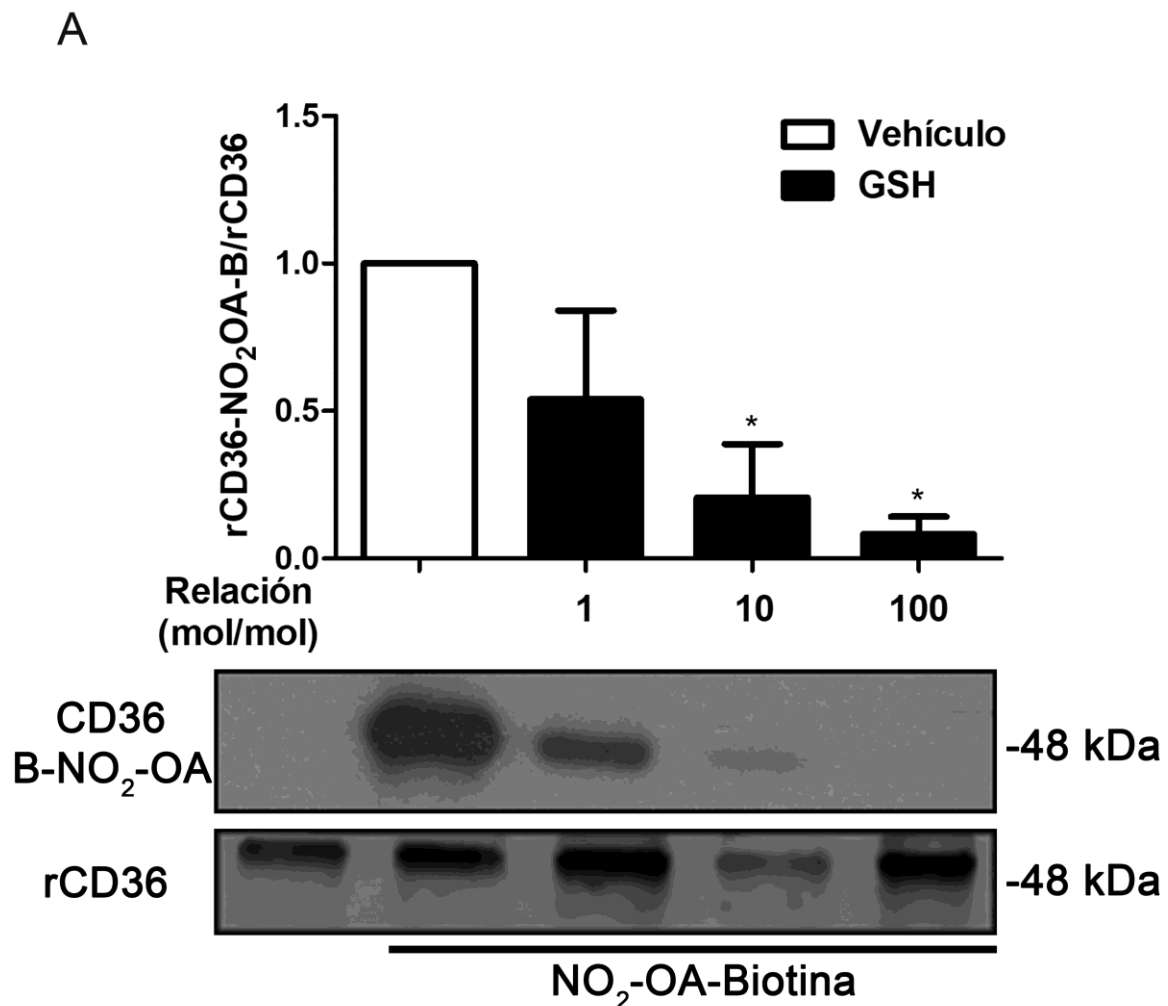


Figura 26. Ensayos de competencia con GSH. A. La proteína recombinante de CD36 fue incubada con B-NO₂-OA en presencia de diferentes relaciones molares GSH (moles GSH/moles de B-NO₂-OA) por 30 min. Los complejos luego fueron evaluados por EGPA-SDS y revelados con estreptavidina-HRP. Los datos representan la Media \pm SEM obtenidas de un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición vehículo, * $p < 0.05$.

4.3.4 Ensayos de desplazamiento de B-NO₂-OA del complejo B-NO₂-OA-CD36

por otros ligandos de CD36

Con el objetivo de estudiar la reversibilidad de esta reacción, diseñamos ensayos de desplazamiento donde se incubaba la proteína rCD36 con B-NO₂-OA por 30 min, permitiendo la formación del complejo rCD36-B-NO₂-OA previo a la incubación con otros ligandos conocidos de CD36 (SSO y OA). La figura 27A muestra que SSO fue capaz de desplazar efectivamente la unión del B-NO₂-OA a rCD36 con un exceso molar 10:1 respecto de B-NO₂-OA. Sin embargo, OA que había competido a NO₂-OA no fue capaz de desplazarlo efectivamente aún a altas relaciones molares de 100:1 (Fig. 27B). En conjunto estos resultados indicarían que la unión del NO₂-OA a CD36 es reversible y que su desplazamiento es dependiente del tipo de ligando, probablemente requiera de un ligando capaz de interactuar covalentemente con la Lys164.

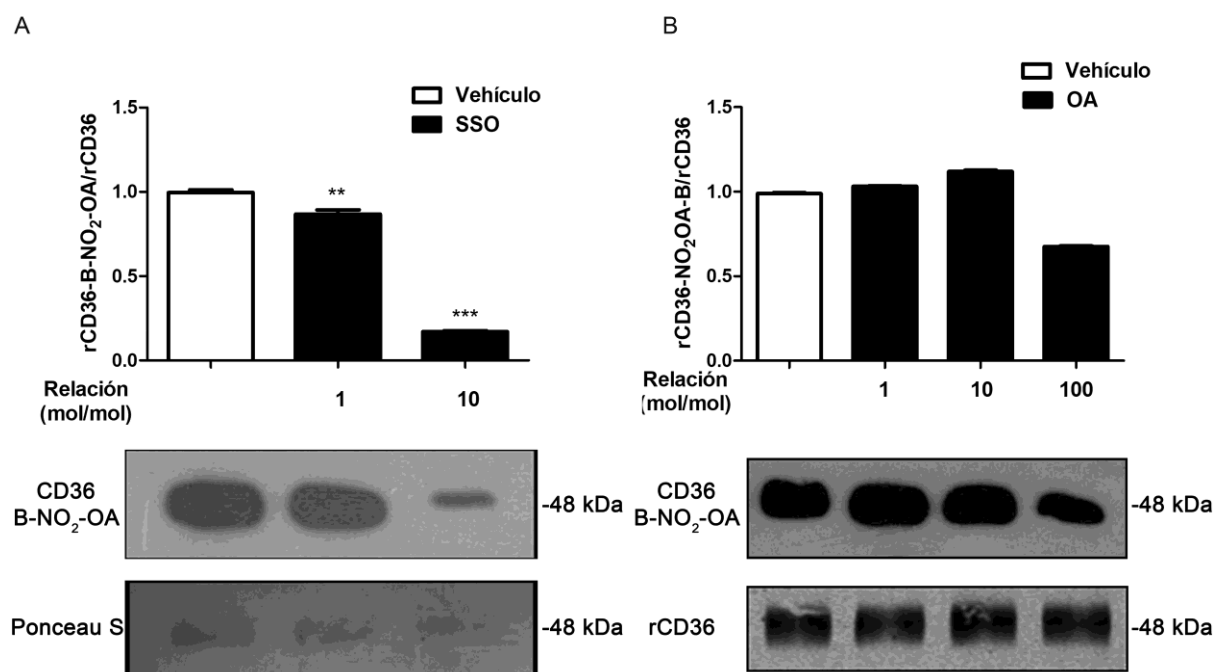


Figura 27. Ensayos de desplazamiento del complejo rCD36-B-NO₂-OA. Luego de formar el complejo rCD36-B-NO₂-OA incubando dichos compuestos 30 min a 37 °C, en la relación molar indicada en el experimento de la figura 24, el mismo fue competido por otros 30 min con diferentes relaciones molares de SSO (A) y OA (B). Los complejos luego fueron evaluados en un EGPA-SDS y revelados con estreptavidina-HRP. Los datos representan la Media ± SEM obtenidas de un

experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición vehículo, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.4 Estudios de modelado y *docking* molecular

Con el objetivo de proponer un modelo molecular de interacción entre el NO₂-OA y CD36 se realizaron estudios de *docking* molecular. Basados en la evidencia experimental que mostró que SSO bloquea la interacción entre CD36 y B-NO₂-OA (Fig. 23) se propone que ambos ligandos podrían compartir el sitio de unión a ligandos, el cual involucraría la Lys164. Para ello, con el objetivo de modelar la interacción entre CD36 y el nitroalqueno, se exploró una región alrededor de la Lys164 a una distancia de 4, 6 y 8 Å. En estos estudios el OA fue también evaluado como control no electrófilo. Los complejos más estables fueron obtenidos con las distancias de 6 Å y cuando cajas más grandes a 8 Å, alrededor de la Lys164, fueron exploradas no se encontraron complejos con otras regiones de la proteína. Tanto NO₂-OA como OA mostraron unirse a la misma región de la proteína CD36, pero el nitroalqueno exhibió menores energías de unión, es decir, formación de complejos más estables (Tabla 1).

	Energía de unión (kcal/mol) de los complejos en diferentes regiones alrededor de la Lys164		
Ligando	4 Å	6 Å	8 Å
NO₂-OA	-23.7	-27.1	-25.7
	-23.2	-27.1	-25.3
OA	-22.6	-23.7	-22.4
	-22.0	-23.7	-22.3

La figura 28A representa todas las geometrías encontradas para el nitroalqueno en las diferentes regiones. Las figuras 28B y 28C representan las dos geometrías más estables (antes tabuladas), las cuales se diferencian principalmente por la

orientación que toma en el complejo el grupo nitro, mientras que la cadena alifática prácticamente ocupa la misma región.

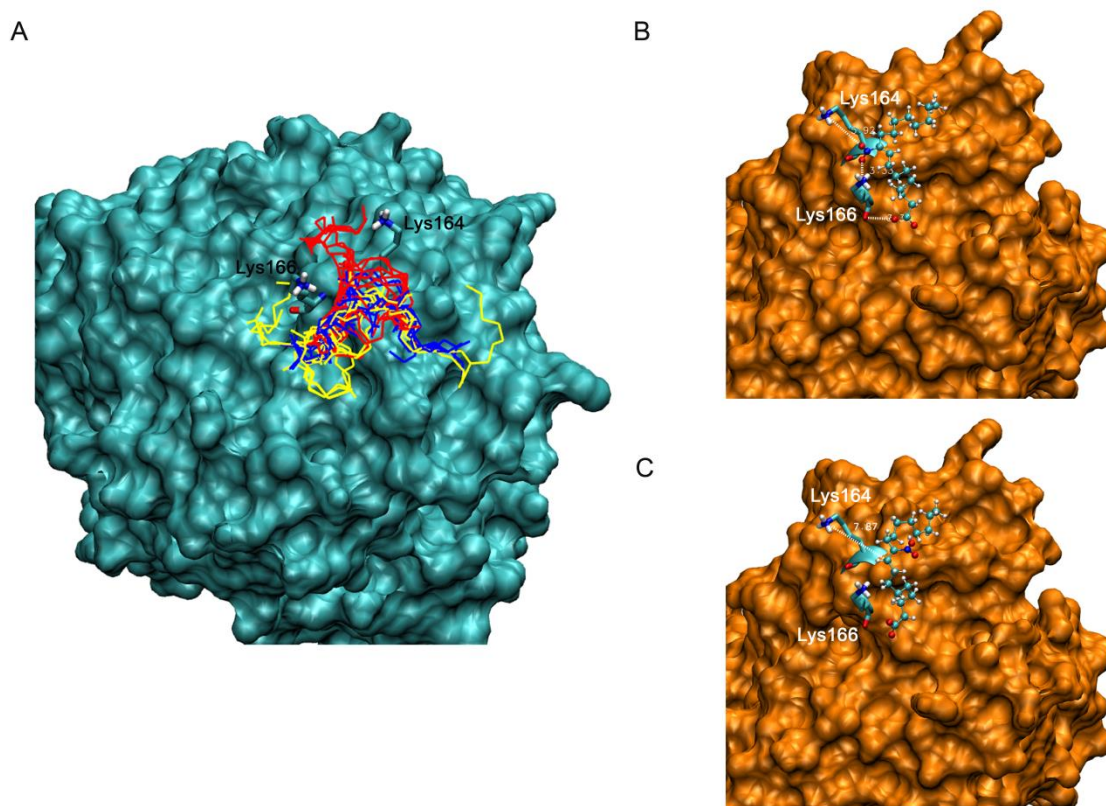


Fig. 28. Estudios de docking molecular relevan interacción del NO₂-OA con la región cercana a la Lys164 de CD36. A. Superposición de las conformaciones obtenidas para el nitroalqueno en las regiones de búsqueda a 4 (rojo), 6 (azul) y 8 Å (amarillo) alrededor de la Lys164. **B y C.** Representación de los dos complejos más estables obtenidos para el NO₂-OA. Los átomos del ligando se encuentran representados de forma diferencial al receptor en el cual los residuos Lys164 y Lys166 son indicados. Los hidrógenos no polares del ligando se incluyen en la figura para una mejor representación.

En ambas geometrías el grupo carboxilo del ligando interacciona con el grupo hidroxilo de la Ser168 mediante puente hidrógeno (2,63 y 3,62 Å respectivamente), mientras que el grupo nitro forma un puente hidrógeno fuerte con Lys166 con una distancia de 2,66 Å, (Fig. 28B y 29 panel izquierdo), y con Asn163 a 3,19 Å (Fig. 28C y 29 panel derecho). La figura 29 representa en vista 3D estas interacciones y para una observación dinámica de las mismas se puede dirigir a los siguientes links: <https://cutt.ly/5eyO93M> y <https://cutt.ly/9eyO4wW> panel derecho e izquierdo, respectivamente. No se observan interacciones fuertes con la Lys164, en cambio este residuo se encuentra libre, móvil y disponible para un ataque nucleofílico al

carbono β del nitroalqueno para iniciar una reacción de adición de Michael a 7,8 y 8,1 Å del doble enlace C-C. Los fuertes puentes hidrógeno formados por el nitroalqueno funcionarían como ancla y de esta forma la Lys164 podría moverse como la cola de un escorpión para encontrar el carbono β e iniciar la reacción.

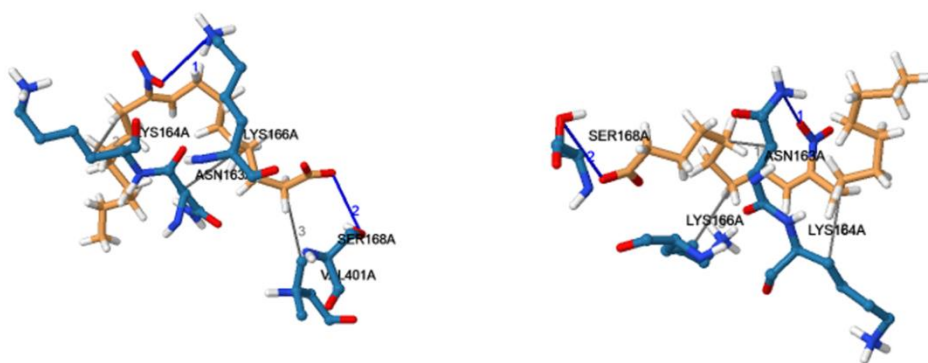


Fig. 29. Representación 3D de las interacciones de los complejos NO₂-OA-CD36. Representación tridimensional de los complejos NO₂-OA-CD36 en la región cercana a la Lys164, mostrando las interacciones con residuos relevantes del receptor CD36. El complejo de la fig. 28B está representado en el panel izquierdo y el complejo de la fig. 28C en el panel derecho. Los carbonos del ligando se encuentran representados en naranja y los carbonos de los amino ácidos del receptor en cian. En azul se representan los átomos de nitrógeno, en rojo los oxígenos y en blanco los hidrógenos.

Las geometrías obtenidas para el OA, evaluado como control, fueron muy similares a las obtenidas con el nitroalqueno (Fig. 30), sin embargo este ácido graso no presenta un doble enlace activo que pudiera ser blanco de un ataque nucleofílico para iniciar una reacción de adición de Michael. Por lo tanto sería poco probable una reacción con la Lys164, y la falta de interacción con dicho residuo podría explicar la incapacidad del OA para bloquear la unión de LDLm a CD36.

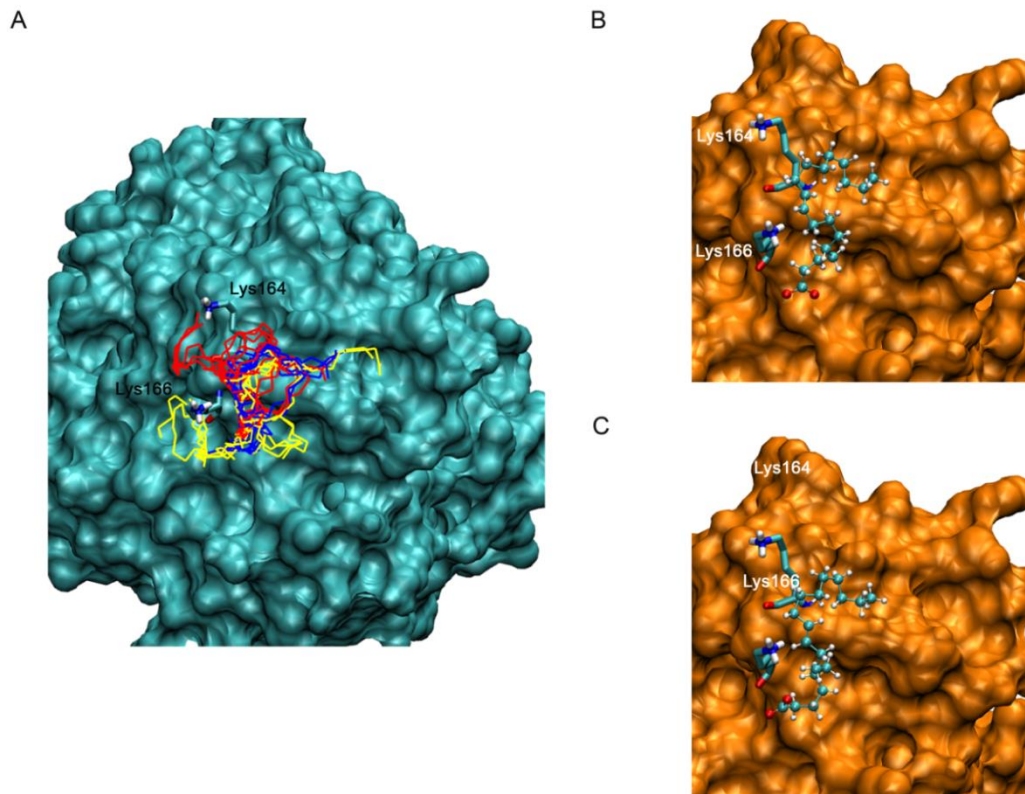


Fig. 30. Complejos obtenidos por docking molecular del OA con la región cercana a la Lys164 de CD36. **A.** Superposición de las conformaciones obtenidas para el OA en las regiones de búsqueda a 4 (rojo), 6 (azul) y 8 Å (amarillo) alrededor de la Lys164. **B y C.** Representación de los dos complejos más estables obtenidos para el OA. Los átomos del ligando se encuentran representados de forma diferencial al receptor en el cual los residuos Lys164 y Lys166 son indicados. Los hidrógenos no polares del ligando se incluyen en la figura para una mejor representación.

La figura 31 muestra las interacciones de las dos conformaciones más estables obtenidas para el OA y la proteína CD36 en tres dimensiones. En dicha figura se aprecia la falta de interacción con la Lys164 y la ausencia de un doble enlace C-C activo para una reacción de adición de Michael con dicho residuo. Estas interacciones pueden apreciarse en forma dinámica en los siguientes links: <https://cutt.ly/ZeyP3dU> y <https://cutt.ly/meyP79H>, respectivamente para cada complejo (izquierda o fig. 30A, derecha o fig. 30B).

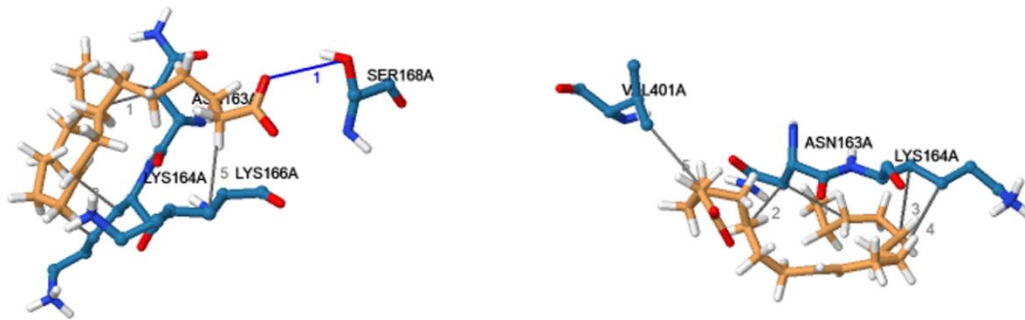


Fig. 31. Representación 3D de las interacciones de los complejos OA-CD36. Representación tridimensional de los complejos OA-CD36 en la región cercana a la Lys164, mostrando las interacciones con residuos relevantes del receptor CD36. El complejo de la fig. 30B está representado en el panel izquierdo y el complejo de la fig. 30C en el panel derecho. Los carbonos del ligando se encuentran representados en naranja y los carbonos de los amino ácidos del receptor en cian. En azul se representan los átomos de nitrógeno, en rojo los oxígenos y en blanco los hidrógenos.

4.5. Estudio de la señalización inducida por NO₂-OA vía CD36

4.5.1 NO₂-OA induce señalización de CD36 en macrófagos RAW264.7

El receptor CD36 además de funcionar como un translocador de ácidos grasos al interior celular, inicia a través de la fosforilación de proteínas pertenecientes a la familia de las tirosina quinasas Src vías de señalización intracelular (31, 32)(75, 133, 134). En este contexto la Lys164 del receptor ha sido caracterizado como residuo crítico, ya que su alquilación por SSO, inhibe tanto la internalización como la señalización (135). Por ello, nos propusimos evaluar si la interacción del NO₂-OA con CD36 tiene la capacidad de activar vías de señalización intracelular, para ello las células RAW264.7 fueron incubadas con NO₂-OA y PA, éste último utilizado como control.

La figura 32 muestra que el tratamiento de las células RAW264.7 con el NO₂-OA induce la fosforilación de la proteína Src, la cual fue inhibida por la pre-incubación con SSO. Estos resultados sugieren que dicha activación es mediada por CD36. En el mismo experimento se utilizó PA como un control positivo de fosforilación de Src

a través de CD36.

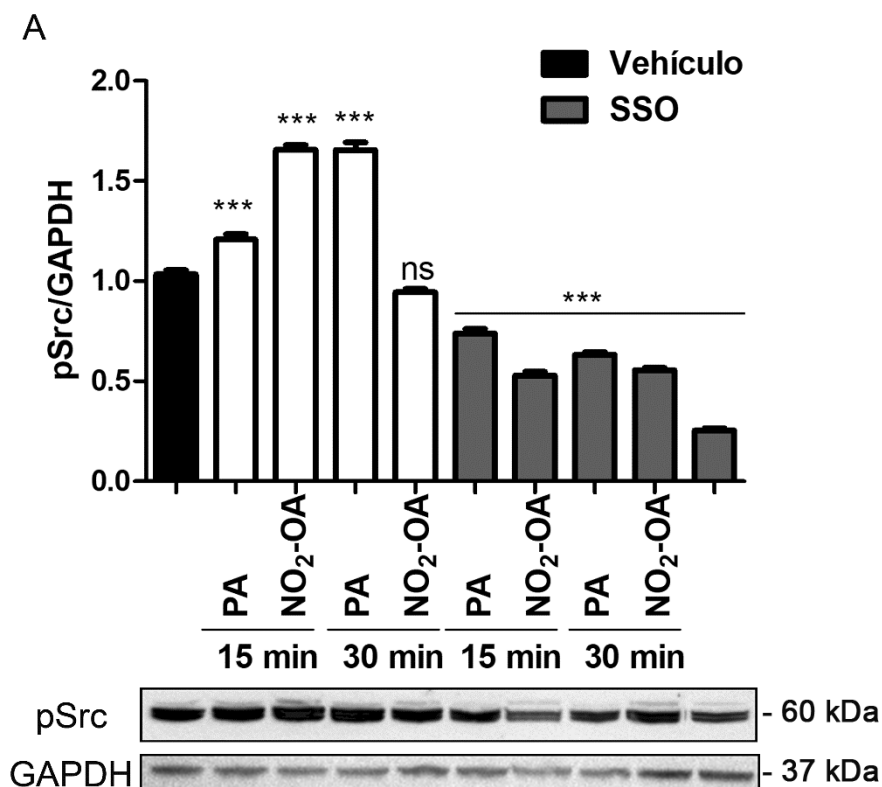


Figura 32. Fosforilación de la proteína Src inducida por el NO₂-OA. A. Las células RAW264.7 fueron incubadas en presencia o ausencia de SSO (50 μ M) por 20 min, y luego tratadas con NO₂-OA (5 μ M) o PA (300 μ M) por 15 y 30 min. Los datos representan la Media \pm SEM obtenidas de un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición vehículo, *** $p < 0.001$.

La asociación de la fosforilación de Src con la activación de la proteína AMPK, nos llevó a evaluar su activación por los nitroalquenos (75). En la figura 33A, se muestra que el NO₂-OA induce la fosforilación de la proteína AMPK, pero que dicha fosforilación no fue inhibida por SSO (Fig. 33B), sugiriendo que en el sistema celular estudiado, la activación de AMPK por NO₂-OA sería independiente de CD36. El PA, también fue evaluado, pero a diferencia de lo reportado por otros trabajos no mostró cambios significativos en la fosforilación de AMPK.

La fosforilación de MAPK inducida vía CD36 es de principal importancia en diversos tipos celulares, principalmente en macrófagos y células musculares lisas, ya que

regula procesos involucrados tanto en la migración celular como en la endocitosis de LDLm. En cuanto a la activación de MAPK se observó que NO₂-OA tuvo comportamientos similares a los encontrados con la vía de APMK, donde la activación de ERK mostró ser independiente de CD36, sin embargo, observamos que SSO mostró tener un efecto sinérgico sobre el NO₂-OA en la activación de ERK (Fig. 33C).

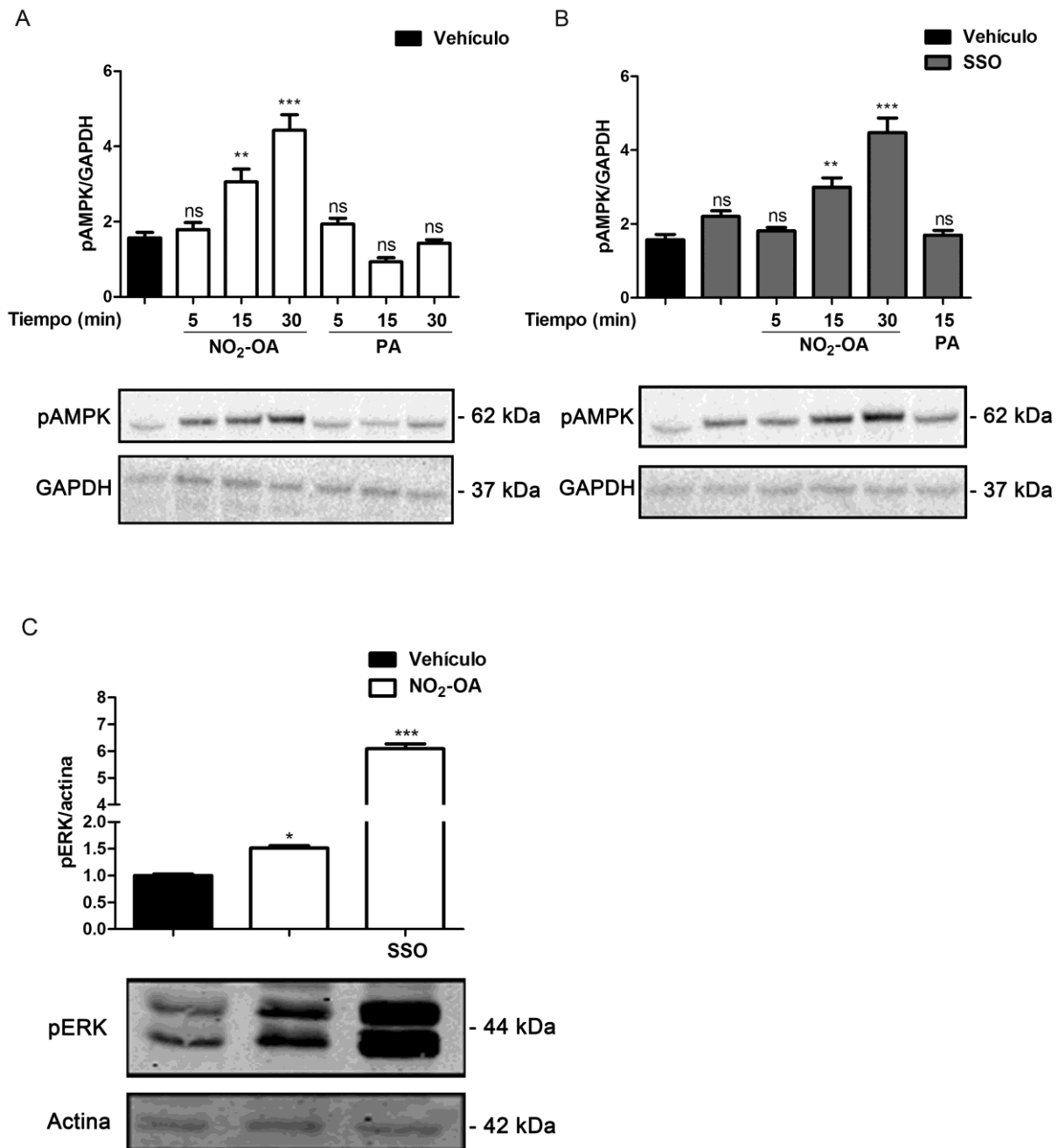


Figura 33. Inducción de la fosforilación de AMPK y ERK por el NO₂-OA. Las células RAW264.7 fueron incubadas en ausencia (A) y presencia (B) de SSO (50 μM) por 20 min previo a la

estimulación con NO₂-OA (5 μM) y PA (300 μM) a los tiempos indicados. **C.** Las células RAW264.7 fueron incubadas en presencia o ausencia de SSO 50 μM por 20 min, y luego se trataron con NO₂-OA 5 μM durante 5 min. Los datos representan la Media ± SEM obtenidas de un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición vehículo * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

4.5.2 Estudio de la señalización dependiente de CD36 inducida

por NO₂-OA en mioblastos L6

Con el objetivo de evaluar señalización en otro sistema celular relevante, se utilizó la línea celular de mioblastos de rata L6 la cual se caracteriza por tener una significativa expresión del receptor CD36. En la figura 34A, se muestra que el NO₂-OA induce la fosforilación de la proteína ERK, la cual fue inhibida cuando las células se preincubaron con SSO, sugiriendo que dicha activación involucra directamente a CD36. Además, la utilización de LDLm como control positivo en los ensayos mostró una fosforilación dependiente de CD36 similar a lo observado para la activación mediada por el nitroalqueno (Fig. 34B).

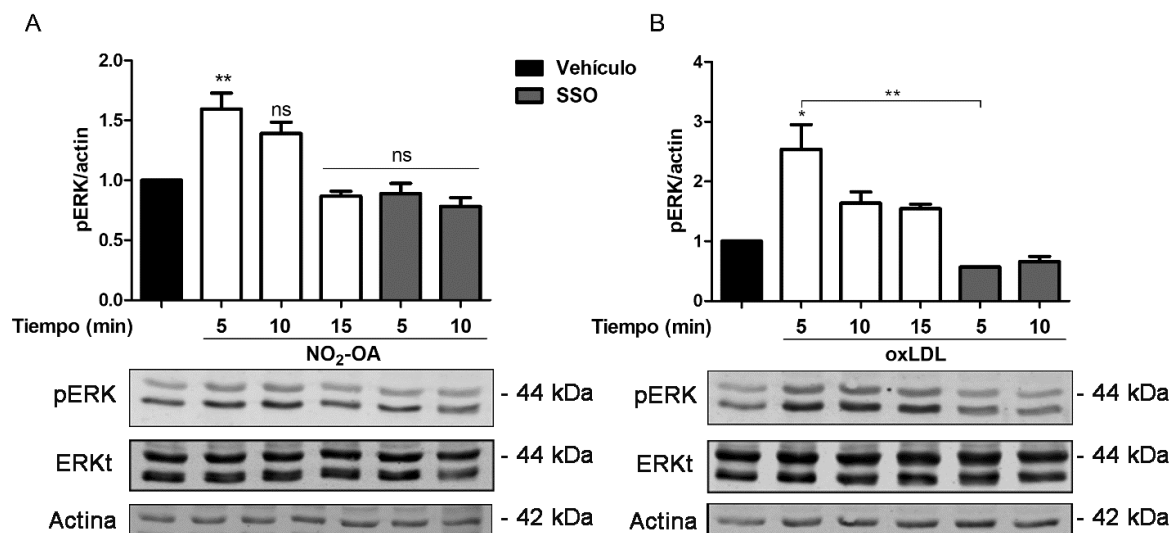


Figura 34. Activación de la proteína ERK por el NO₂-OA y LDLox. Las células L6 fueron incubadas con o sin SSO 50 μM por 20 min, y luego se trataron con NO₂-OA 5 μM (**A**) o LDLox 100 μg/ml (**B**), durante los tiempos indicados. Los datos representan la Media ± SEM obtenidas de un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición vehículo o entre las columnas indicada por la barra (fig. B), * p<0.05, ** p<0.01.

Para confirmar la participación de CD36/Src en esta vía de señalización, se utilizó el inhibidor de la proteína Src, PP1. La figura 35 muestra que el pre-tratamiento de las células L6 con PP1 inhibió la fosforilación de ERK inducida por NO₂-OA o LDLm, sin embargo el potencial de inhibición en las LDLm fue menor. El inhibidor de las MAPK, PD98059, se utilizó como un control de inhibición. Estos resultados sugieren que en mioblastos el NO₂-OA induce fosforilación de ERK1/2 vía CD36/Src.

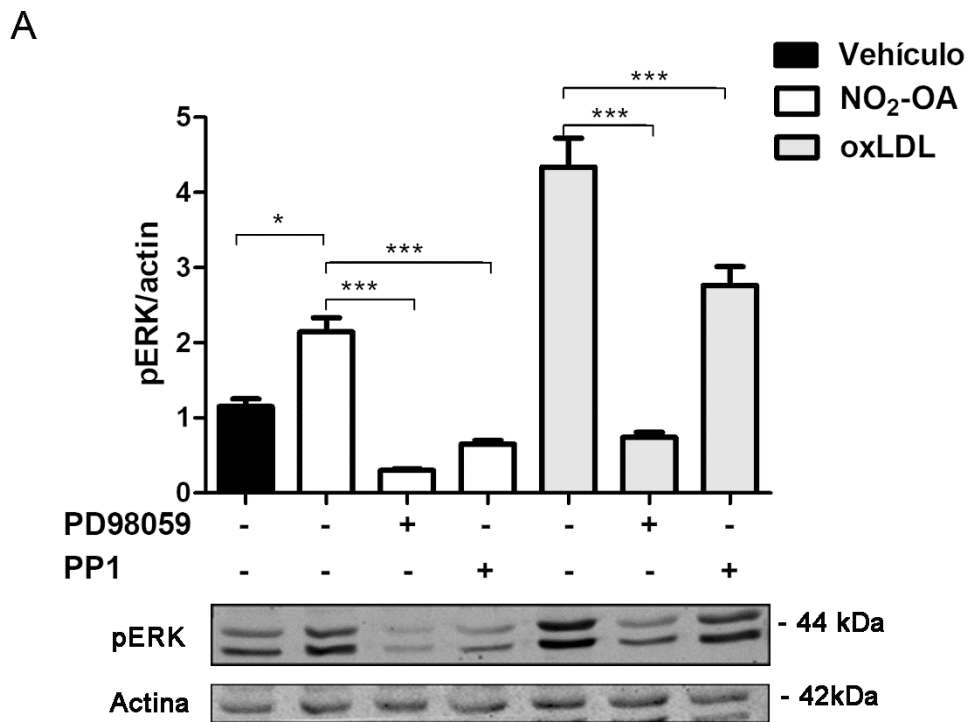


Figura 35. Participación de CD36/Src en la activación de ERK. Las células L6 fueron incubadas en presencia o ausencia de PP1/PD98059 10 μ M y luego con NO₂-OA 5 μ M o LDLox 100 μ g/ml, durante 5 min. Los datos representan la Media \pm SEM obtenidas de un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Comparaciones entre columnas conectadas por las barras, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

4.6 Estudio de la regulación del eflujo de colesterol por el NO₂-OA

4.6.1 Estimulación de sobrecarga de colesterol en células RAW264.7

Dentro de las diferentes etapas que regulan el metabolismo lipídico en macrófagos

la formación de depósitos celulares y el eflujo de colesterol son de gran importancia para evitar la diferenciación a célula espumosa. Con el objetivo de estudiar el efecto de los nitrolípidos sobre los acúmulos intracelulares de colesterol se indujo la acumulación de colesterol en células RAW264.7 para ser utilizados experimentalmente. Para ello, tratamos a las células RAW264.7 con LDLm a diferentes tiempos y evaluamos la cinética de acumulación de colesterol. La figura 36 muestra que a las 24 h de tratamiento con LDLm las células presentan la mayor acumulación de colesterol con respecto al control sin LDLm. Es por ello que se estableció 24 h de incubación como tiempo para transformar a los macrófagos en células “tipo espumosas”, las cuales son la línea de partida para los próximos experimentos.

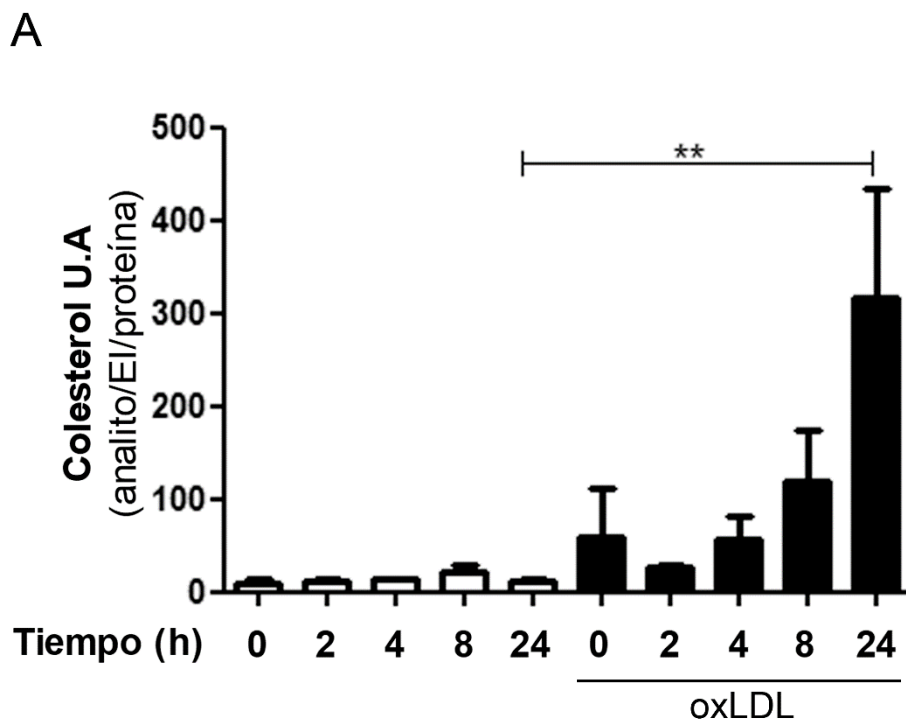


Figura 36. Cinética de acumulación de colesterol para la formación de células espumosas. Células RAW264.7 fueron incubadas con o sin LDLm 100 µg/ml, por diferentes tiempos. El contenido de colesterol total dentro de las células fue analizado mediante LC/MS. Los datos representan la Media ± SEM obtenidos de al menos 3 experimentos independientes. Comparación entre las columnas conectadas por las barras, ** p<0.01.

Debido a que en el diseño experimental para el estudio del eflujo de colesterol las células serán tratadas con el nitroalqueno por tiempos de hasta 8 h se realizó un

ensayo de MTT para evaluar alteraciones en el metabolismo celular que pudieran afectar su viabilidad. La figura 37 muestra que la incubación con las LDLm por 24 h, y el posterior tratamiento con NO₂-OA (5 μM) por otras 8 h no afectó el metabolismo de las células RAW264.7.

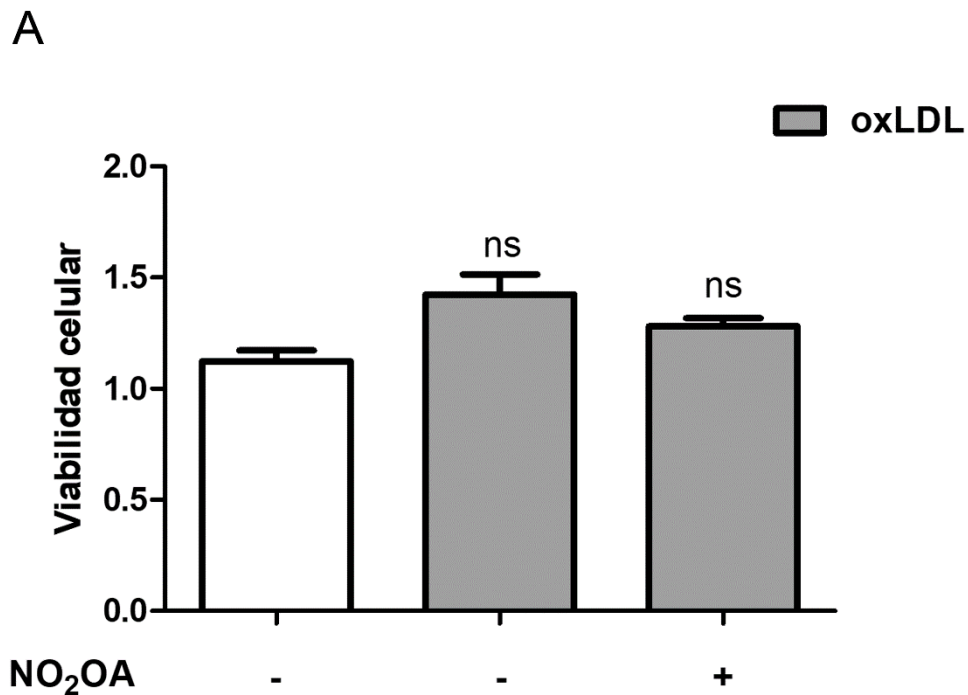


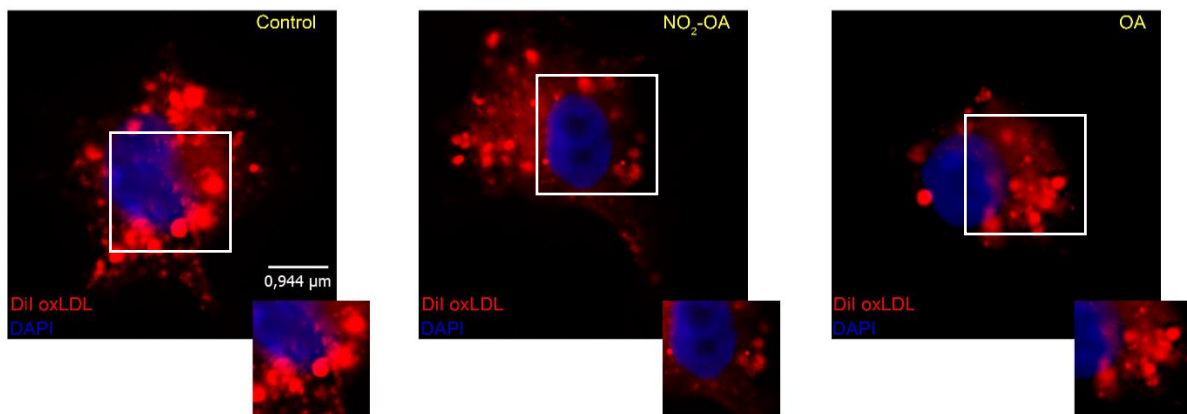
Figura 37. Estudio del metabolismo celular normal por MTT. A. Células RAW264.7 fueron incubadas con o sin LDLm 100 μg/ml por 24 h y luego con NO₂-OA 5 μM por 8 h. Dos horas antes de la finalización de los estímulos se agregó el reactivo MTT y se midió su absorbancia a 540 nm en un lector de placas *Biotek Synergy HT*. Los datos representan la Media ± SEM obtenidos de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Comparación con la condición control sin estímulos (barra blanca).

4.6.2 Estudio del efecto del NO₂-OA en la liberación de colesterol

Para evaluar el efecto del NO₂-OA en la liberación o eflujo de colesterol en los macrófagos RAW264.7 cargados con LDLm marcadas con Dil (LDLm-Dil) se incubaron con NO₂-OA u OA (5 μM). La figura 38 muestra que el tratamiento con el nitroalqueno redujo significativamente la intensidad de fluorescencia en las células luego de 24 h de tratamiento, con respecto al control tratado con vehículo. La incubación con OA incrementó el contenido lipídico en las células posiblemente

como consecuencia de su incorporación.

A



B

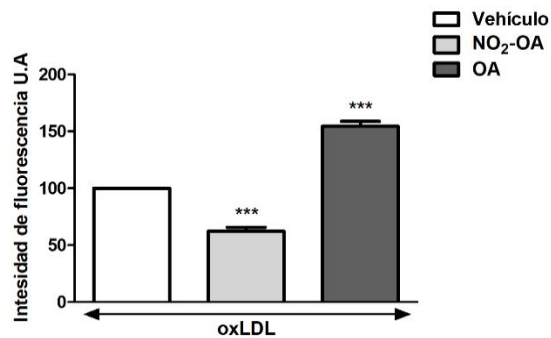


Figura 38. Ensayo de eliminación de colesterol en macrófagos con sobrecarga. Células RAW264.7 fueron incubadas con LDLm-Dil 100 μg/ml por 24 h y luego con vehículo, NO₂-OA 5 μM u OA 5 μM por 24 h adicionales. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio *Leica DMI8*. **B.** Para las cuantificaciones se analizaron al menos 20 células al azar por condición. Los datos representan la Media ± SEM obtenidos de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición control, *** p<0.001.

4.6.3 Caracterización de la cinética de liberación de colesterol

Con el objetivo de evaluar si el efecto observado por NO₂-OA en los ensayos de microscopia de fluorescencia era consecuencia de un mayor eflujo de colesterol, analizamos el contenido de colesterol y ésteres de colesterol liberado al sobrenadante mediante espectrometría de masas. Para ello, realizamos un estudio de cinética de liberación de colesterol, muestreando el medio de cultivo cada una hora, hasta las 48 h (Fig. 39). El resultado indicó que existe una liberación rápida en

las primeras 4 h, permitiéndonos utilizar este tiempo de trabajo para los siguientes experimentos. Luego de las 4 h, el colesterol en el sobrenadante comienza a disminuir debido a la esterificación que sufre en las HDL, y luego de las 8 h comienza a incrementar nuevamente, pero de manera más paulatina. Con respecto a los ésteres de colesterol, los mismos presentan cambios marcados luego de las 4 h, tiempo que coincide con la disminución en el colesterol, confirmando la hipótesis de su esterificación en las HDLs. Posteriormente, solo analizamos los cambios en colesterol, debido a que la forma de eliminación de los macrófagos es como colesterol libre.

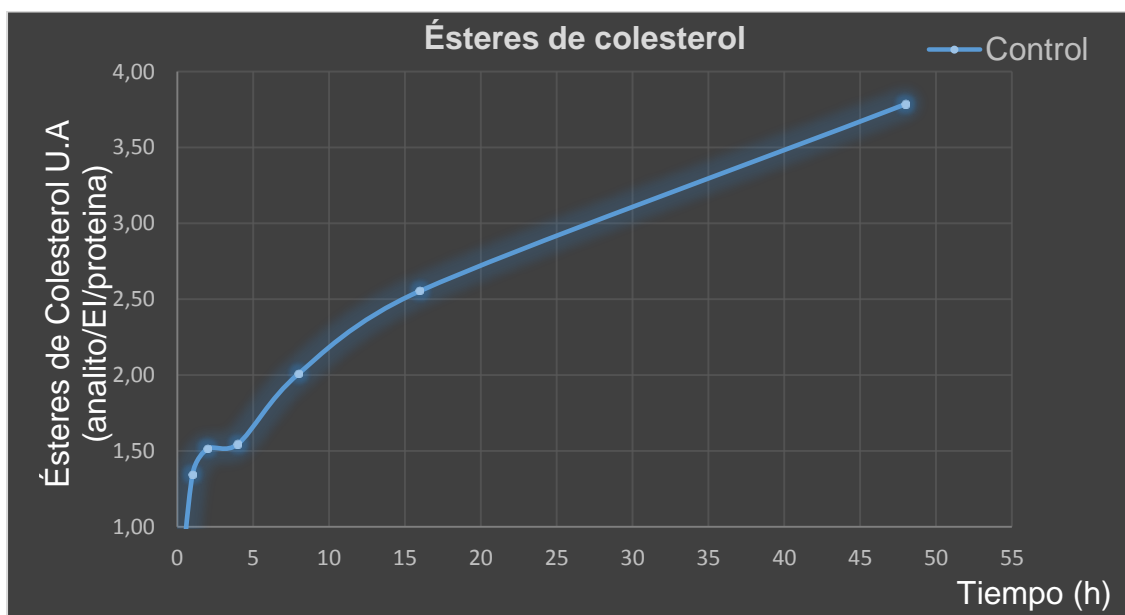
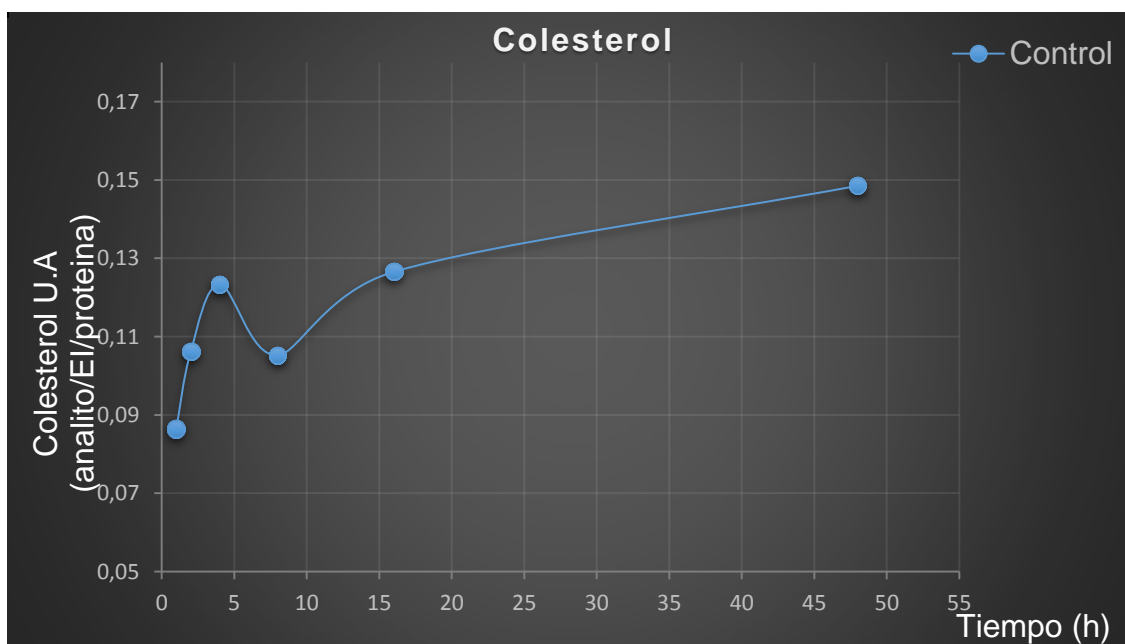


Figura 39. Estudio de la liberación de colesterol por células con sobrecarga. Células RAW264.7 fueron incubadas con LDLm 100 $\mu\text{g/ml}$ por 24 h. Luego de lavarlas y dejarlas recuperar por 16 h, se comienza a evaluar la liberación de colesterol al medio. El contenido de colesterol y ésteres de colesterol en sobrenadante fue analizado por LC/MS. Los datos representan la Media obtenidas de al menos 3 experimentos independientes. El, estándar interno.

Una vez caracterizada la cinética, evaluamos el efecto del $\text{NO}_2\text{-OA}$ en la liberación de colesterol a tiempos de 1 a 4 h, periodo donde se observó una mayor pendiente en la liberación de colesterol. La figura 40 muestra que el tratamiento con el nitroalqueno, incrementa significativamente los niveles de colesterol liberados al sobrenadante a las 2 y 4 h post-tratamiento, comparado con el control tratado con vehículo. Estos resultados indican que el $\text{NO}_2\text{-OA}$ favorece la liberación de colesterol en macrófagos cargados.

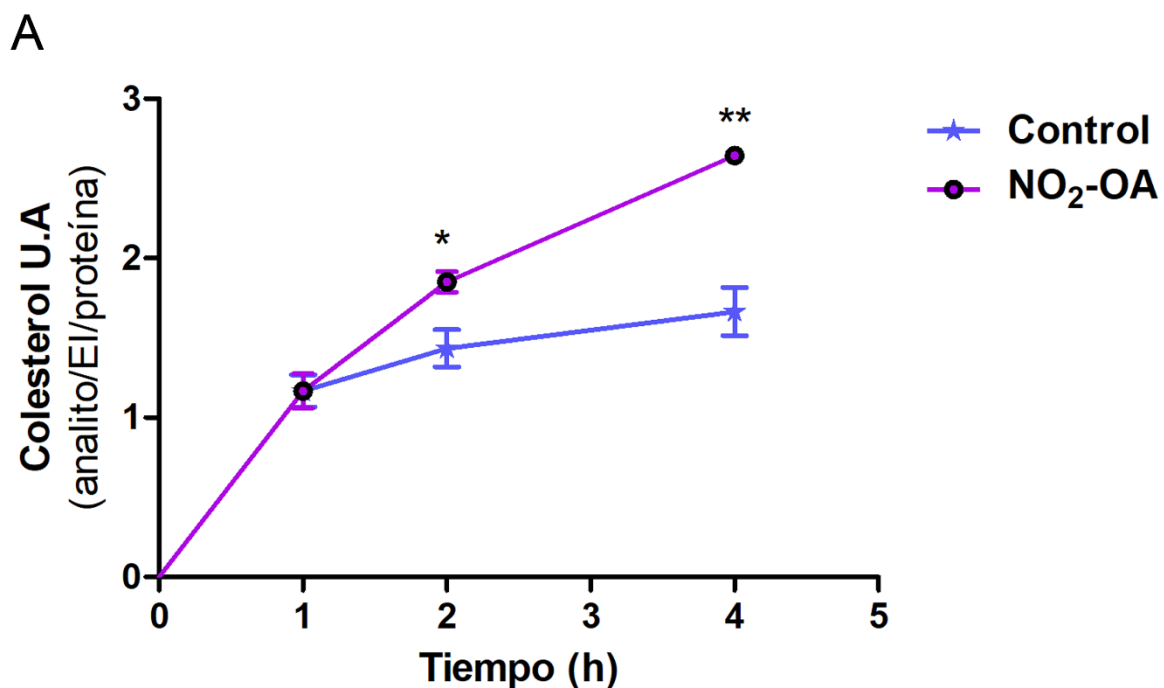


Figura 40. Estudio del efecto del $\text{NO}_2\text{-OA}$ en la liberación de colesterol. Células RAW264.7 fueron incubadas con LDLm 100 $\mu\text{g/ml}$ por 24 h. Luego de lavarlas y dejarlas recuperar por 16 h, se trataron con vehículo o $\text{NO}_2\text{-OA}$ 5 μM a los tiempos indicados y se evalúa la liberación de colesterol al medio. El contenido de colesterol y ésteres de colesterol en sobrenadante fue analizado por LC/MS. Los datos representan la Media \pm SEM obtenidas de al menos 3 experimentos independientes. Ensayos de ANOVA de dos vías seguido por un test Bonferroni fueron realizados. Comparación con tiempo 1 h, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.7 Estudio del flujo autofágico en células cargadas con LDLm

En los últimos años numerosos trabajos han relacionado la acumulación intracelular de colesterol proveniente de LDLox en macrófagos con la inhibición del flujo autofágico y la consecuente inhibición de la degradación de los depósitos de lípidos (*lipid droplets*) favoreciendo el desarrollo de la aterosclerosis (104, 105, 108). Las proteínas LC3 II y p62 forman parte de los autofagosomas, por lo tanto, una acumulación de las mismas hace referencia a un bloqueo del flujo autofágico. Es por ello que evaluamos la participación del NO₂-OA en el flujo autofágico de células cargadas con LDLm por 24 h y luego tratadas o no con el NO₂-OA. La figura 41 muestra que luego de incubar macrófagos RAW264.7 con LDLm, las células comienzan a acumular tanto LC3II (Fig. 41A) como p62 (Fig. 41B), sugiriendo un bloqueo en el flujo autofágico. En nuestro sistema celular cuando las células cargadas de colesterol fueron tratadas a posteriori con el nitroalqueno, se redujeron significativamente los niveles de LC3II y p62, lo que indicaría la restauración del flujo autofágico. Estos resultados demuestran que el nitroalqueno participaría en la inducción de la liberación de colesterol mediante la restauración del flujo de autofagia en macrófagos cargados con LDLm.

Además fue descrito que la activación de AMPK promueve el proceso autofágico por inhibir a mTOR, el cual es un inhibidor de dicho proceso celular. Debido a que el NO₂-OA activa AMPK, evaluamos la participación de esta vía de señalización en la restauración del flujo autofágico mediante el uso de su inhibidor *Compound C*. Los resultados muestran (Fig. 41) que la preincubación con el inhibidor de AMPK impide que el nitroalqueno reduzca los niveles acumulados de LC3II y p62. Por lo tanto los resultados sugieren que la acción del NO₂-OA sobre el metabolismo lipídico podría estar asociada a la activación del flujo autofágico a través de la fosforilación de AMPK en macrófagos cargados con LDLm.

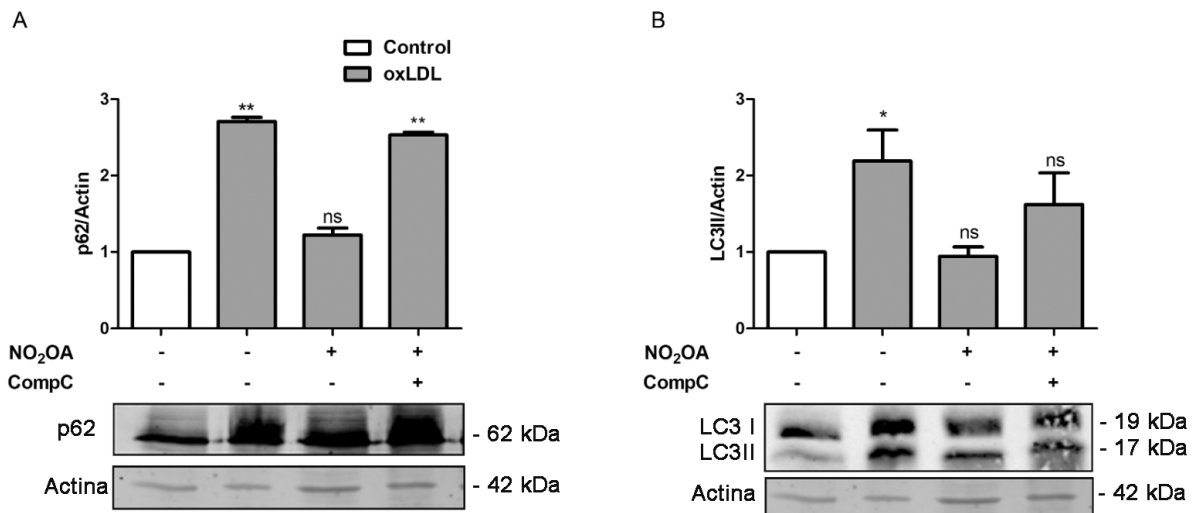


Figura 41. Estudio del efecto del NO₂-OA en el flujo autofágico. Células RAW264.7 fueron incubadas con LDLm 100 µg/ml por 24 h. Luego de lavarlas y dejarlas recuperar por 16 h, se tratan con vehículo o NO₂-OA 5 µM por 8h, pre-incubando o no con Compound C 3,3 µM por 20 min. Las células se levantan y se procesan para el análisis por Western blot. Los datos representan la Media ± SEM obtenidas de un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición control (columna blanca), * p<0.05, ** p<0.01.

Para confirmar que los niveles aumentados de LC3 II y de p62 se debían a un flujo autofágico reducido y no a un incremento en la expresión génica, se realizó el análisis de RT-qPCR para el gen *MAP 1*, que codifica para la proteína LC3I. La figura 42 muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión de *MAP 1* confirmando que el aumento de LC3II se debería a la disminución del flujo autofágico.

A

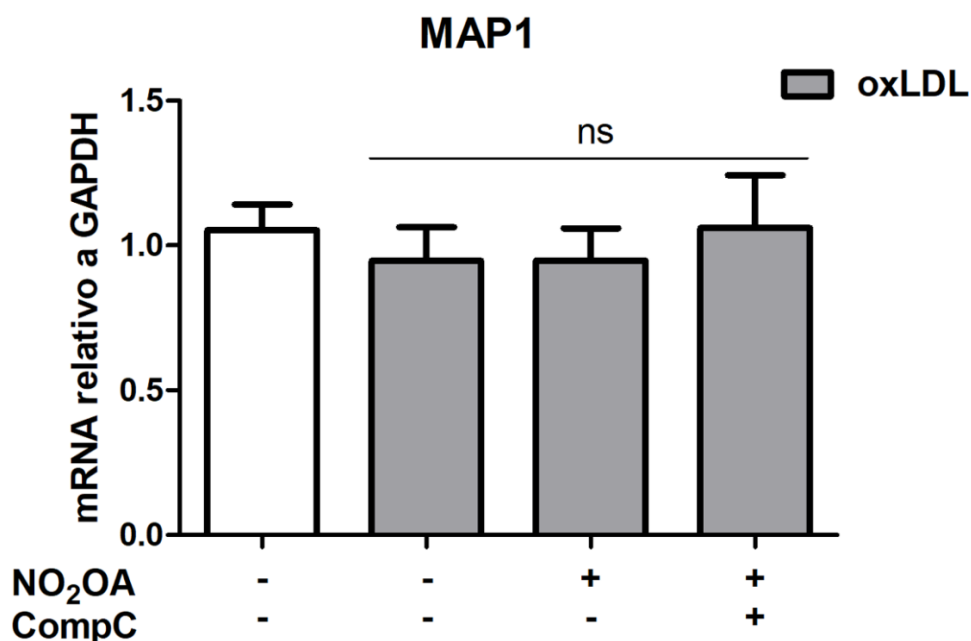


Figura 42. Estudio de la expresión génica de MAP1. A. Células RAW264.7 fueron incubadas con 100 µg/ml de LDLm por 24 h. Luego de lavarlas y dejarlas recuperar por 16 h, algunos pocillos fueron pre-incubadas o no con el inhibidor Compound C (3,3 µM) por 20 min antes de ser tratadas con vehículo o NO₂-OA (5 µM) durante 8 h. Finalmente, las células se cosecharon y procesan para el análisis por RT-qPCR. Los datos representan la Media ± SEM obtenidas de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición control sin tratamiento (columna blanca).

4.8 Estudio del efecto del NO₂-OA sobre el estado inflamatorio y

el estrés oxidativo en macrófagos cargados con LDLm

La acumulación de LDLm por los macrófagos RAW264.7 conduce a la activación de componentes proinflamatorios y la generación de ERO (136). Asimismo, los lípidos nitrados fueron descritos por poseer efectos antiinflamatorios y antioxidantes (137). En función de ello, se evaluó como el NO₂-OA afecta en macrófagos cargados marcadores de inflamación (IL-6) y la generación de ERO. La figura 43A muestra que el NO₂-OA redujo significativamente los niveles de IL-6, y los niveles de especies reactivas del oxígeno medidas con la sonda DFCH (Fig. 43B) luego de 8 h de tratamiento, indicando que el NO₂-OA no solo disminuye el contenido de

colesterol en células cargadas, sino que también mejora el perfil inflamatorio y oxidativo.

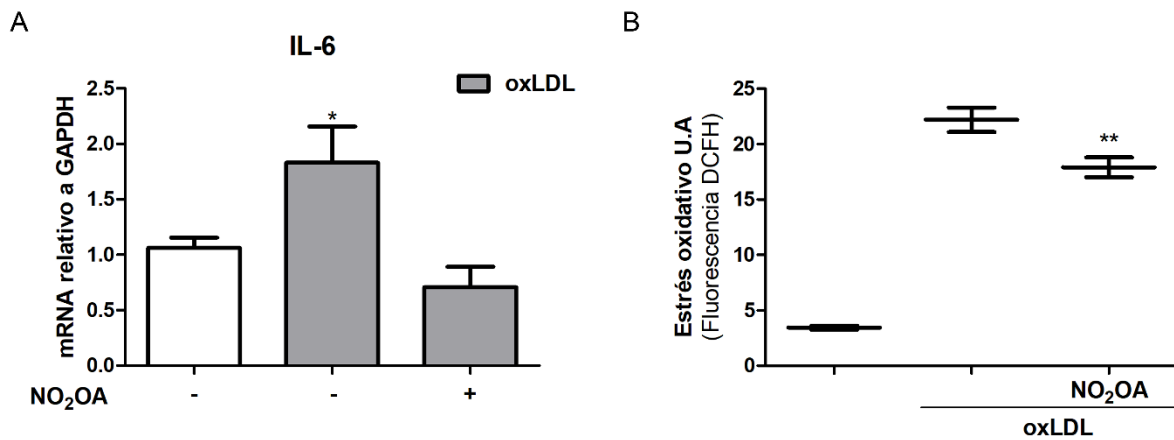


Figura 43. Estudio del efecto del NO₂-OA en la inflamación y el estrés oxidativo celular. Células RAW264.7 fueron incubadas con LDLm 100 µg/ml por 24 h. Luego de lavarlas y dejarlas recuperar por 16 h, se trataron con vehículo o NO₂-OA 5 µM por 8h. **A.** Las células se procesaron para el análisis por RT-qPCR para evaluar los niveles de RNAm de IL-6. **B.** Las células se lavan y se incuban por 30 min en buffer HBSS con la sonda DCFH, luego se levantan y se analizan por citometría de flujo en citómetro *FACS Canto II*. Los datos representan la Media ± SEM obtenidas de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición control sin tratamiento, * p<0.05, ** p<0.01.

4.9 Estudio del efecto del NO₂-OA en la migración celular

La diferenciación de macrófago a célula espumosa induce un perfil pro-inflamatorio asociado a una reducida capacidad migratoria lo que favorece el desarrollo y evolución de la placa aterosclerótica. Numerosos grupos de trabajo, han planteado la hipótesis de que la inducción de la migración de estas células desde la placa de ateroma, en la íntima de las arterias, favorecería la emigración y la reversión de la placa (138, 139). Por lo tanto, nos planteamos evaluar como el NO₂-OA influencia la migración de las células RAW264.7. Para ello, realizamos ensayos de migración en transwells. La figura 44B muestra que el NO₂-OA incrementa significativamente la migración de los macrófagos RAW264.7 en comparación con el vehículo (fig. 44A). La LDLm por sí sola no indujo cambios en la migración (fig. 44C), pero la pre-incubación con LDLm inhibió la migración inducida por el NO₂-OA (fig. 44D). Es

importante destacar que cuando el NO₂-OA se pre-incubó con las células y luego se agregó la LDLm, la migración inducida por NO₂-OA no se ve afectada (fig. 44E). Esto se debe a que el NO₂-OA estaría inhibiendo la interacción de la LDLm con el receptor CD36, cuya señalización lleva a la inhibición en la migración de los macrófagos. En estos ensayos PMA fue utilizado como control positivo de la migración de los macrófagos (fig. 44F).

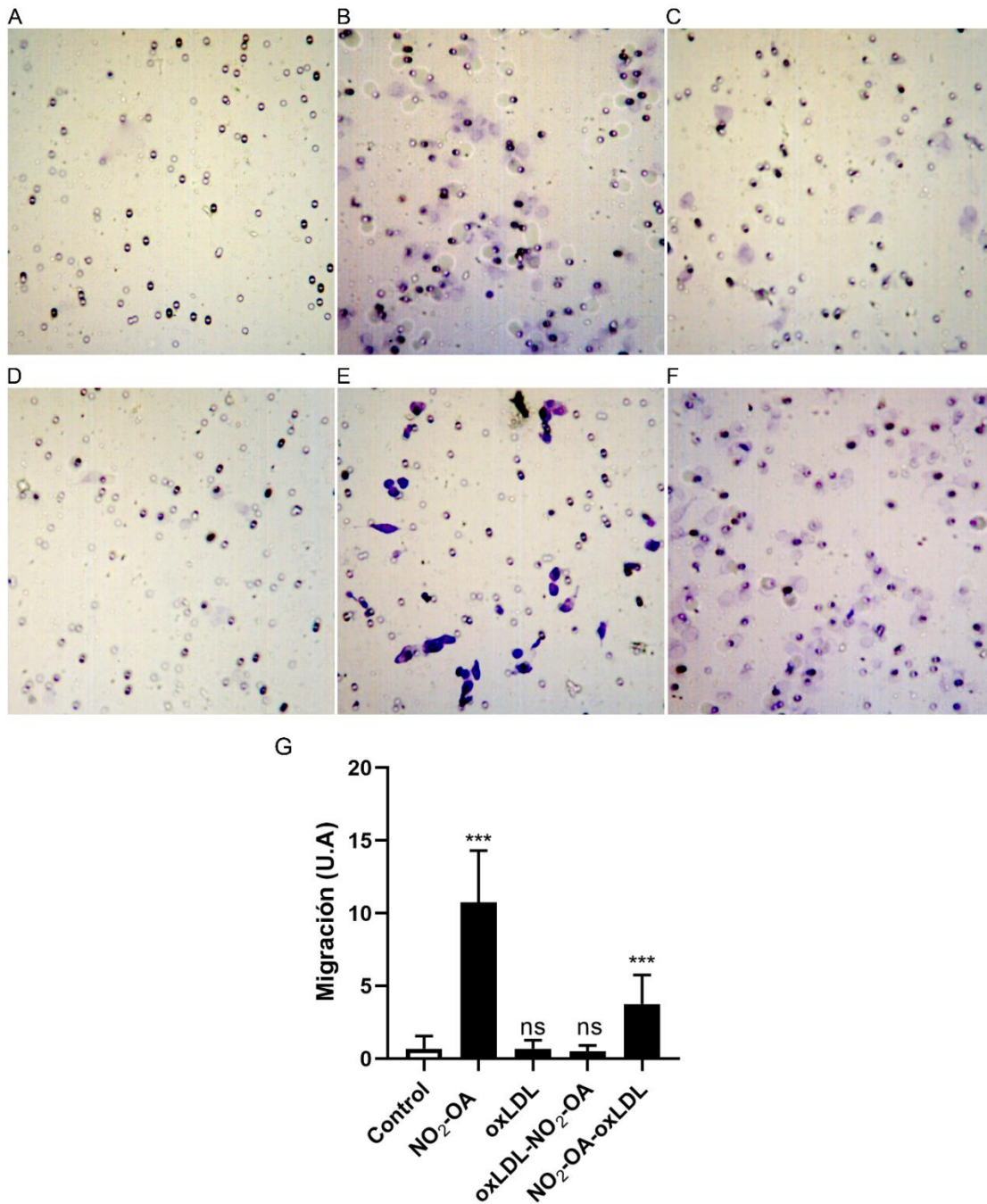


Figura 44. Estudio de la modulación en la migración celular. Células RAW264.7 fueron incubadas con los diferentes estímulos en canastos *transwell* (cámaras de *Boyden*). Luego de

lavarlas, las membranas se fijan con paraformaldehído 4 %, se montan y se visualizan en un microscopio de campo claro Olympus asociado a una cámara Nikon. **A.** Vehículo. **B.** NO₂-OA 5 μM 16 h. **C.** LDLm 50 μg/ml 16 h. **D.** LDLm 50 μg/ml y NO₂-OA 5 μM 16 h. **E.** Preincubado 30 min con NO₂-OA 5 μM, seguido de LDLm 50 μg/ml por 16 h. **F.** PMA (forbol-12-miristato-13-acetato) 16 h. En la figura 30G se muestran las cuantificaciones del número de células que migran al otro lado del canasto, en al menos 5 campos al azar por condición de al menos 3 experimentos independientes. Los datos representan la Media ± SEM obtenidas. Comparación con la condición control, *** p<0.001.

4.10 Estudio del efecto del NO₂-OA en la regulación del receptor

scavenger LRP1

4.10.1 Efecto del NO₂-OA en la expresión en membrana plasmática del LRP1

Como se mencionó anteriormente, dentro de los receptores *scavenger*, el receptor LRP1 juega un rol importante en la captación de LDLag y en el desarrollo de la placa de ateroma. Con el objetivo de estudiar si NO₂-OA regula la expresión de LRP1 en membrana plasmática, células RAW264.7 no permeabilizadas fueron evaluadas por citometría de flujo. La figura 45A, muestra el incremento de la expresión de LRP1 en membrana inducido por el NO₂-OA luego de 4h de incubación. Si bien los cambios son estadísticamente significativos, evaluamos si los mismos también ocurrían a tiempos cortos de 5 a 30 min. Para ello, utilizando el ensayo de biotilación de proteínas de superficie se pudo observar que el NO₂-OA incrementa la expresión en membrana del receptor de forma bifásica (45B).

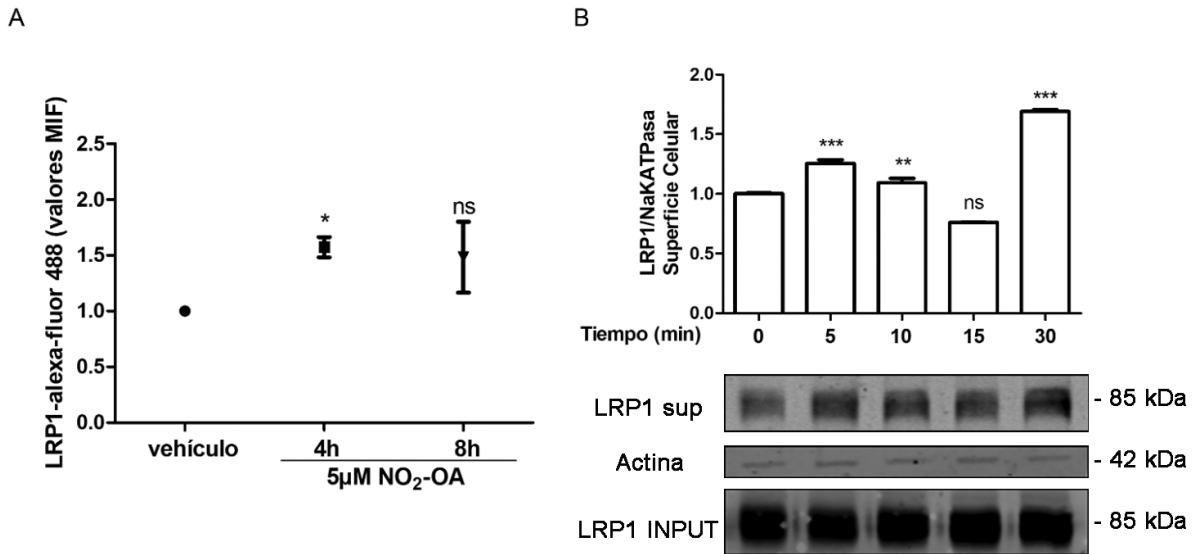


Figura 45. Estudio de la regulación en la expresión de LRP1 en membrana plasmática. A. Células RAW264.7 impermeabilizadas fueron incubadas con NO₂-OA 5 µM o vehículo, y luego analizadas por citometría de flujo en citómetro *FACS Canto*. **B.** Las células se tratan con NO₂-OA a diferentes tiempos, luego a 4 °C se las incubó con sulfo-biotina y se procesan las muestras para el análisis por biotilación de proteínas de superficie (ver materiales y métodos). Los datos representan la Media ± SEM obtenidas de un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición vehículo (A) o tiempo 0 min (B), * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

4.10.1 Efecto del NO₂-OA sobre la regulación génica del LRP1

Para estudiar la regulación en los niveles de transcritos de LRP1 ejercida por NO₂-OA, procedimos a evaluar los niveles de ARNm. La figura 46 muestra el incremento estadísticamente significativo del ARNm para LRP1 por NO₂-OA, aunque lo hace de forma más leve a la ejercida sobre CD36.

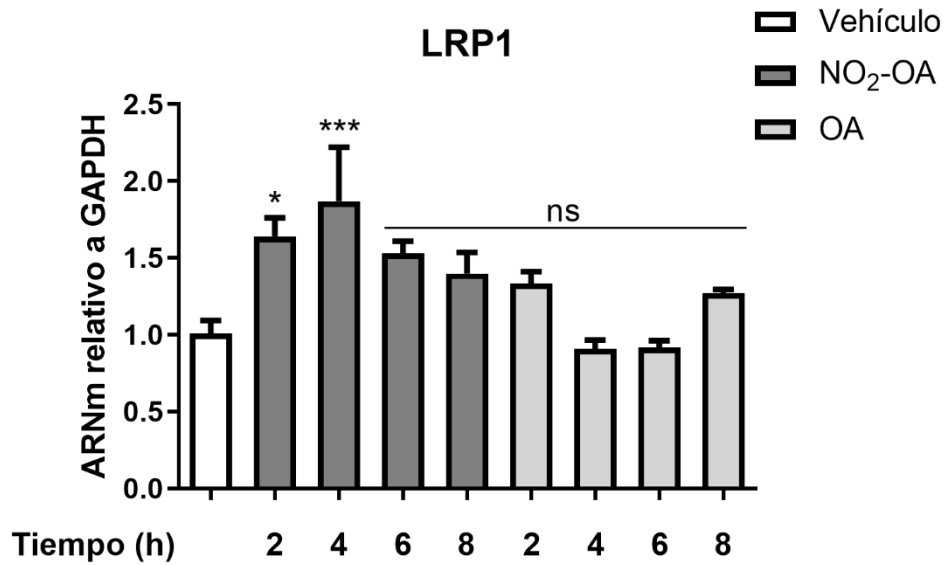


Figura 46. Estudio de la regulación ejercida por el NO₂-OA en los niveles de transcritos de LRP1. Células RAW264.7 fueron tratadas con NO₂-OA 5µM o OA 5µM. Las células se lavaron y se levantaron en TRIzol® para su análisis por RT-qPCR. Los datos representan la Media ± SEM obtenidos de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición vehículo, * p<0.05, *** p<0.001.

Para evaluar si este leve incremento en los niveles de transcritos se veía acompañado por un incremento en los niveles proteicos, mediante Western blot evaluamos la regulación de la expresión proteica de LRP1 ejercida por el nitroalqueno. La figura 47, muestra que el nitroalqueno incrementó significativamente los niveles proteicos de LRP1 2 h posteriores al tratamiento, retornando a los valores basales luego de las 8 h. HO-1 nuevamente se utilizó como control de actividad del NO₂-OA (Fig. 47B).

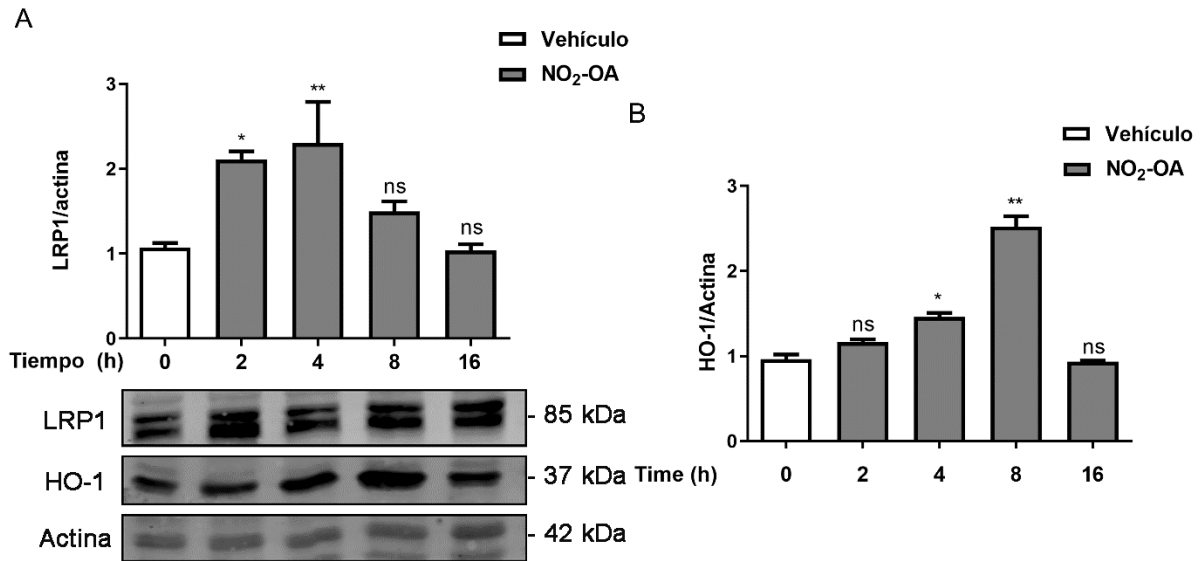


Figura 47. Estudio de la regulación ejercida por el NO₂-OA en los niveles proteicos de LRP1. A. Incremento en los niveles proteicos de LRP1 inducidos por NO₂-OA en forma tiempo dependiente. Las células RAW264.7 fueron tratadas con NO₂-OA 5 μM a diferentes tiempos. Las células se levantan y se procesan para su análisis por Western blot. **B.** Cuantificación de la expresión de HO-1. Los datos representan la Media ± SEM obtenidos de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición vehículo, * p<0.05, ** p<0.01.

Debido a que el efecto en los niveles de transcripto fue relativamente débil, a que los niveles proteicos incrementaron significativamente a tiempos cortos y considerando que LRP1 es una proteína de alto peso molecular, nos propusimos evaluar si este incremento estaba dado por una mayor síntesis proteica. Para lograr dicho objetivo, las células se pre-incubaron con el inhibidor de la actividad peptidil transferasa ribosomal (cicloheximida), para bloquear la síntesis proteica. La figura 48 muestra que cicloheximida, fue incapaz de bloquear el incremento en la expresión proteica de LRP1 inducida por NO₂-OA, sugiriendo que dicha regulación es independiente de la síntesis proteica. Sin embargo, como era de esperar, lo contrario fue observado con la cinética de expresión de HO-1 por NO₂-OA donde cicloheximida inhibió la expresión proteica de HO-1 a nivel traduccional (Fig. 48B).

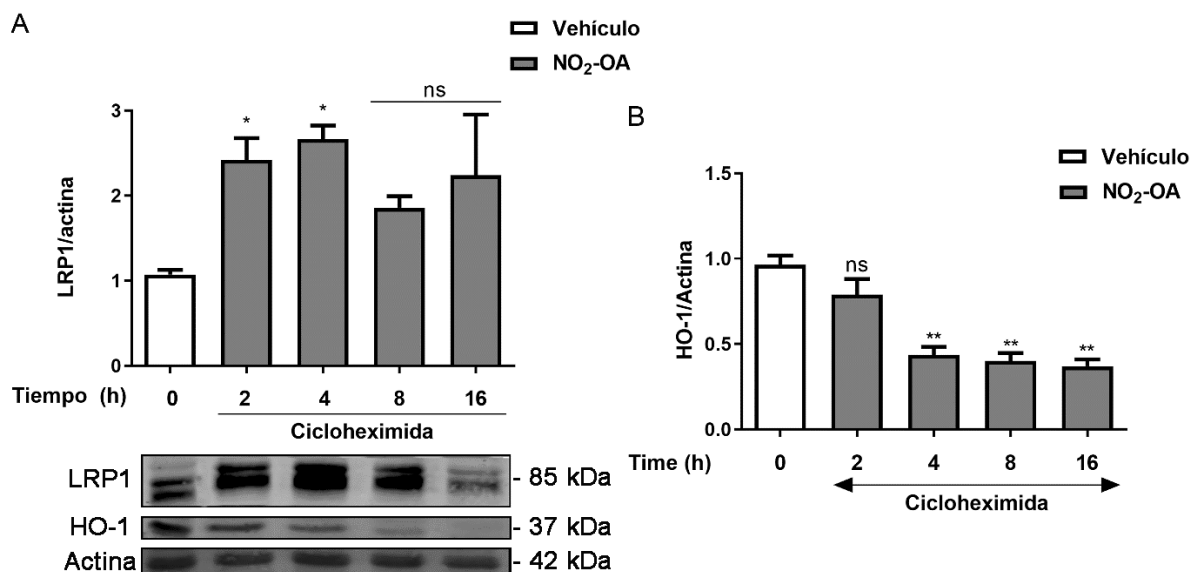


Figura 48. Estudio de la participación de la síntesis de proteínas en la regulación de los niveles proteicos de LRP1. **A.** Las células RAW264.7 fueron pre-tratadas con cicloheximida 10 μ M, seguido de NO₂-OA 5 μ M a diferentes tiempos. Las células se levantan y se procesan para su análisis por Western blot. **B.** Cuantificación de la expresión de HO-1. Los datos representan la Media \pm SEM obtenidos de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición vehículo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.10.1 Participación del proteosoma en la regulación de los niveles

proteicos de LRP1

Debido a que el incremento en los niveles proteicos de LRP1 mostró ser independiente de la síntesis proteica, planteamos como hipótesis que el NO₂-OA podría estar regulando la degradación de LRP1. La figura 49A muestra que el NO₂-OA incrementa los niveles de LRP1, y que el co-tratamiento con MG132, inhibidor del proteosoma, tiene un efecto aditivo sobre los niveles de LRP1. Cuando evaluamos los niveles totales de proteínas ubiquitinadas tanto el NO₂-OA como el MG132 incrementaron estos niveles (Fig. 49B), sugiriendo que el NO₂-OA podría estar involucrado en la degradación proteica de LRP1 por vía proteasomal.

En conjunto estos resultados demuestran que el NO₂-OA no solo es capaz de regular a CD36, sino que también regula la expresión de otro receptor *scavenger* de gran relevancia en el desarrollo y progresión de la patología como es LRP1. Estos

hallazgos abren paso para futuras investigaciones tendientes a evaluar el sentido de la modulación de LRP1 a nivel del metabolismo de colesterol en macrófagos, como así también el impacto que esto pudiera tener a niveles de células musculares lisas de la vasculatura donde LRP1 ha demostrado tener gran implicancia. En este sentido, resultados preliminares que no han sido incluidos en esta tesis, sugieren la co-localización entre los receptores CD36 y LRP1, revelado por ensayos de co-inmunoprecipitación y de inmunofluorescencia, la cual incrementó en presencia de ligandos de CD36 como LDLm y NO₂-OA.

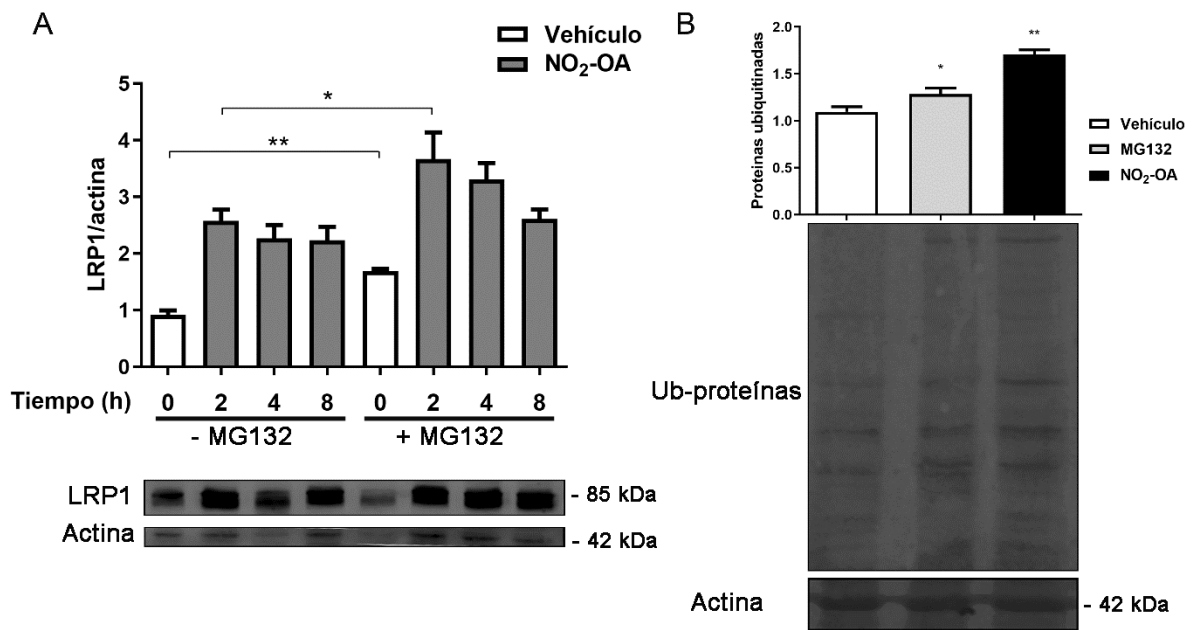


Figura 49. Estudio de la participación del proteasoma en la regulación de los niveles proteicos de LRP1. **A.** Las células RAW264.7 fueron pre-tratadas o no con MG132 10 μ M, seguido de NO₂-OA 5 μ M a diferentes tiempos previo a su análisis por Western blot. **B.** Las células fueron tratadas con NO₂-OA 5 μ M, MG132 10 μ M o vehículo por 4 h. Las células se levantan y se procesan para su análisis por Western blot. Los datos representan la Media \pm SEM obtenidos de al menos 3 experimentos independientes. Comparación con la condición vehículo o lo indicado por las barras superiores, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

5. DISCUSIÓN

El infarto agudo de miocardio y los accidentes cerebrovasculares son, en su mayoría, el resultado del desprendimiento o ruptura de la placa de ateroma que lleva a la formación de un trombo ocluyente. El desarrollo de la placa de ateroma está determinado por numerosos factores de riesgo cardiovascular (RCV) que incluyen a la obesidad, tabaquismo, hipertensión, diabetes y sedentarismo entre otras patologías de naturaleza inflamatoria como artritis. En la aterosclerosis la alteración vascular es el paso inicial en el desarrollo de la patología gatillado principalmente por la dislipidemia y la pérdida de la función endotelial, la cual es caracterizada por una menor biodisponibilidad de óxido nítrico. En este contexto, el sistema inmune innato representado por los monocitos de sangre periférica y los macrófagos tisulares, es el principal protagonista de los cambios a nivel del endotelio vascular como así también en la íntima de la pared arterial.

La activación del endotelio conduce a un incremento en la permeabilidad del mismo facilitando la extravasación de componentes celulares y humorales del plasma como monocitos y lipoproteínas ricas en Apo-B a la íntima vascular. Estos cambios en la composición celular del subendotelio inducen una mayor producción de especies reactivas del nitrógeno (ERN) y del oxígeno (ERO) exacerbando el daño tisular y estimulando el proceso inflamatorio.

Este círculo vicioso de activación celular e inflamación en el microambiente tisular de la íntima favorece el desarrollo de la placa de ateroma. Las lipoproteínas modificadas generadas como resultado de las condiciones oxidantes son incorporadas por los macrófagos provenientes de los monocitos circulantes o por macrófagos residentes a través de receptores *scavenger*, como CD36, LOX-1, SR-A1 y LRP1, alterando el metabolismo normal del colesterol, favoreciendo la acumulación de lípidos y la diferenciación a célula espumosa. Además, estas alteraciones metabólicas conllevan a una reducción del potencial migratorio de la célula, y una disrupción en los mecanismos que regulan el eflujo de colesterol (82, 83, 105). Los niveles de expresión de CD36 y el desarrollo de aterosclerosis están relacionados tanto en estudios clínicos como en animales de experimentación (27, 140).

Bajo la influencia del microambiente inflamatorio los macrófagos responden incrementando su potencial oxido-reductor e induciendo la formación de numerosos mediadores lipídicos. Estos mediadores sintetizados como productos de la oxidación del ácido araquidónico por acción enzimática o no enzimática dan lugar a las prostaglandinas e isoprostanos con efectos deletéreos sobre la íntima vascular.

Lara-Guzman y col. describieron que macrófagos THP-1, además de sintetizar los compuestos antes mencionados producen 2 potentes prostaglandinas anti-inflamatorias sugiriendo que la célula espumosa modularía vías que pueden aliviar la citotoxicidad y el proceso inflamatorio (141). En el mismo sentido, Bonacci y col. demostraron que macrófagos activados con LPS e $INF\gamma$ sintetizan un nuevo grupo de lípidos bioactivos conocidos como nitrolípidos o nitroalquenos (142). Estos mediadores lipídicos son formados endógenamente por reacciones de tipo no enzimática o radicalar que involucran a especies derivadas del óxido nítrico (NO^*) y del nitrito (NO_2^-) con ácidos grasos insaturados.

A diferencia de otros lípidos bioactivos conteniendo carbonilos alfa,beta-insaturados en su estructura como HNE, o Prostaglandina J2 (PGJ2) los nitroalquenos reaccionan de forma reversible con residuos aminoacídicos presentes en proteínas o con ácidos nucleicos (143). Esta reactividad es la responsable de la actividad biológica de los nitroalquenos la cual se traduce en modificaciones post-traduccionales sobre proteínas específicas como son *PPAR γ* , *Keap1/Nrf2* y *NF- κ B* afectando la expresión de un gran número de genes anti-inflamatorios y citoprotectores (17, 125, 137). Estas reacciones contribuyen al mantenimiento de la homeostasis celular y a la adaptación al estrés inflamatorio y metabólico, como se demuestra por los efectos benéficos de los nitroalquenos en modelos de aterosclerosis, daño cardíaco por isquemia/reperfusión y enfermedades asociadas a síndrome metabólico (144–146).

Rudolph y col. demostraron que animales ApoE KO alimentados con dieta rica en grasa tratados con NO_2 -OA, desarrollaban placas más lentamente y de menor tamaño que los animales controles o no tratados. Esto se acompañó de un menor contenido de colesterol en la placa y menor infiltrado inflamatorio (146). Otros estudios demostraron que los nitroalquenos reducen la inflamación vascular,

disminuyen la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-1 β y MCP-1), la expresión de moléculas de adhesión (VCAM) en macrófagos, mediante la inhibición del factor de transcripción NF- κ B (147). Si bien los nitroalquenos regulan la respuesta inflamatoria de macrófagos *in vivo* e *in vitro*, el estudio del efecto de los nitroalquenos sobre el metabolismo de colesterol en dichas células aún no ha sido abordado. **En este contexto patológico de inflamación crónica donde el macrófago tiene un rol central en el desarrollo de la placa de ateroma se decidió estudiar el efecto de los nitroalquenos sobre la expresión de los receptores scavenger.**

En este trabajo demostramos que el NO₂-OA regula el metabolismo de colesterol en macrófagos a través de la modulación del receptor scavenger CD36. El nitroalqueno afectó, tanto la expresión del receptor como su función. Con respecto a la expresión de CD36, el NO₂-OA incrementó los niveles transcripcionales (Fig. 16) y proteicos de CD36 (Fig. 13, 14,17) en macrófagos RAW264.7 y en macrófagos derivados de médula ósea de ratones WT (Fig. 15).

Al interpelar acerca de los mecanismos involucrados en la respuesta de CD36 encontramos que la vía antioxidante *Keap1/Nrf2* participó en la respuesta a NO₂-OA. En trabajos anteriores habíamos puesto en evidencia que los nitroalquenos modifican cisteínas específicas de la proteína Keap1 permitiendo la liberación y translocación nuclear del factor de transcripción *Nrf2* (125). La confirmación de la participación de esta vía en la regulación de la expresión de CD36 se basó principalmente en 2 aspectos, 1) la pérdida de la modulación de CD36 en macrófagos derivados de medula ósea de ratones deficientes para el factor de transcripción *Nrf2* y 2) el perfil de expresión de CD36 y de los genes antioxidantes HO-1 o NQO-1 activadas por la señalización dependiente de *Nrf2* (Fig. 19). Resultados similares de la expresión de CD36 llevaron a diferentes autores a plantearse el interrogante acerca de la función de *Nrf2* en la aterosclerosis ya que su activación mantiene en niveles altos la actividad antioxidante y anti-aterogénica en los tejidos, sin embargo la estimulación de la expresión de CD36 lo relaciona con el desarrollo de la aterosclerosis (57).

Además de investigar la regulación por los nitroalquenos a través de la vía *Keap1/Nrf2*, se estudió la participación del receptor nuclear *PPAR γ* con diferentes antagonistas y agonistas de su función. Los nitroalquenos fueron descritos por Schopfer y col como ligandos parciales de este receptor ya que se unen a una cisteína crítica del mismo pero no inducen un perfil de señalización comparable con la de otros ligandos de *PPAR γ* (124, 148). Esto podría explicar que en nuestro modelo no observemos regulación de la expresión de CD36 por los nitroalquenos mediante esta vía (Fig. 18).

CD36 es una glicoproteína de membrana (149), ampliamente expresada en diversos tejidos, la cual media la unión e internalización de numerosos ligandos, tales como trombospondina-1, AG de cadena larga, LDLm (150), fosfolípidos oxidados (151), etc. De esta manera CD36 facilita el transporte de lípidos al interior celular los cuales en miocitos son utilizados para el suministro energético a través de β -oxidación mientras que en el adipocito son solo destinados a depósito. El tráfico de lípidos a través de la membrana celular mediado por CD36 involucra un dominio extracelular rico en aminoácidos hidrofóbicos, denominado sitio de unión a ligandos o *binding pocket* (anteriormente también nos hemos referido a este sitio como entrada 1) (29, 31). Particularmente, en su interacción con las lipoproteínas oxidadas, esta interacción es mediada por los constituyentes lipídicos presentes en la misma como fosfatidilcolina oxidada y fosfatidilserina. En éste trabajo, demostramos que la pre-incubación de macrófagos RAW264.7 con NO₂-OA redujo significativamente la acumulación de colesterol y ésteres de colesterol al ser expuestos a LDLm (Fig. 20). De la mano con estos hallazgos, cuando los macrófagos fueron incubados con LDLm-Dil, la incorporación de lípidos provenientes de estas lipoproteínas fue menor en las células que se pre-incubaron con NO₂-OA (Fig. 21). Estos resultados sugieren que el NO₂-OA afecta la unión e incorporación de las LDLm por CD36 similar a lo descrito para el antagonista de la unión de ligandos a CD36, SSO.

Estos hallazgos fueron confirmados por ensayos *in vitro* de tipo ELISA, en los cuales, la presencia de NO₂-OA inhibió la unión de LDLm a la proteína recombinante CD36 (Fig. 22), al igual que SSO (131). Estos resultados sugieren al NO₂-OA como un nuevo ligando de CD36 con capacidad de modular la unión e

interacción de otros ligandos del receptor y son consistentes con trabajos anteriores en donde se describe que diferentes ligandos de CD36 modulan su interacción con las LDLm (152–154).

Esta interacción fue evidenciada con la inmuno-precipitación de CD36 en los macrófagos RAW264.7, utilizando el NO₂-OA conjugado con biotina (B-NO₂-OA). Cuando las células fueron pre-incubadas con SSO dicha interacción se vio impedida (Fig. 21). Estos resultados fueron confirmados por ensayos in vitro donde se mostró la interacción del nitroalqueno con la proteína recombinante CD36 (Fig. 22), y además que dicha interacción pudo ser competida por el NO₂-OA no marcado y por OA (Fig. 23).

SSO, un agente alquilante aminoreactivo, que reacciona de forma covalente e irreversible con la Lys164 presente en el sitio de unión de ligando del receptor CD36, bloqueando la interacción y la incorporación de AGs y LDLm (30, 37). La Lys164 ha sido identificada como un residuo crítico no solo de la unión sino también de la señalización de CD36 por sus ligandos (75). Los ensayos de desplazamiento mostraron que SSO, a relaciones molares relativamente bajas con respecto al nitroalqueno, desplazó el complejo formado entre B-NO₂-OA-CD36 (Fig. 25A), revelando la reversibilidad de la reacción del NO₂-OA con CD36 y sugiriendo que ambos ligandos podrían compartir el mismo sitio de unión. Cuando el complejo fue competido con un ligando de CD36 que interacciona de forma no covalente, OA, no se observa un desplazamiento significativo del B-NO₂-OA, revelando una mayor avidéz de unión del nitroalqueno (Fig. 25B).

En la estructura de CD36 han sido identificados dos sitios de unión de AG. El principal identificado como entrada 1 o *binding pocket*, y un sitio secundario denominado entrada 2, el cual representa una apertura en la superficie de CD36, cuya accesibilidad está regulada por la acetilación del residuo Lys334 presente en el mismo. Nuestros ensayos de *docking* y modelado molecular, revelan que el NO₂-OA interacciona en la región próxima a la Lys164 de la proteína CD36, y lo hace con energías más bajas que las determinadas para el OA (Tabla 1). En los complejos encontrados con menor energía, el NO₂-OA forma enlaces puente hidrogeno fuerte con residuos del receptor (Lys166, Asn163 y Ser168) los cuales funcionarían como

un ancla para dicho ligando (Fig. 30). En estos complejos, la Lys164 se encuentra libre con capacidad de moverse y encontrar el carbono β del nitroalqueno, pudiendo iniciar una reacción de adición de Michael. Esta reacción podría ser el principal mediador de la unión del ácido nitro oleico a CD36. La interacción del NO₂-OA con CD36, podría a la vez competir y limitar el acceso de otros AG al receptor.

Aunque el receptor CD36 carece de dominios de señalización intracelular en su estructura es reconocido por inducir la activación de vías de señalización intracelular. En general, la cascada de señalización asociada a CD36 inicia con la fosforilación de una proteína de la familia de las Src, como Fyn o Lyn, y su continuidad cascada abajo va a depender del ligando y el tipo celular donde ocurra. En éste trabajo, no solo demostramos que el NO₂-OA se comporta como un ligando de CD36, sino que también induce la fosforilación de Src en macrófagos RAW264.7, la cual fue inhibida cuando las células fueron pre-tratadas con SSO, sugiriendo que esta activación de Src es a través de CD36 y que involucraría la interacción con la Lys164 (Fig. 32). El NO₂-OA también fosforiló a AMPK y ERK pero a diferencia de Src esta fosforilación sería por un mecanismo independiente de CD36 y de la inhibición con SSO (Fig. 33). Esta diversidad en la señalización inducida por los nitroalquenos y otros ligandos de CD36 podría ser responsable de diferentes respuestas biológicas que comprometen el metabolismo lipídico en macrófagos (75, 154). Cuando estudiamos la señalización inducida por NO₂-OA en células musculares (mioblastos L6), observamos que el NO₂-OA induce la fosforilación de ERK, a través de una vía sensible a SSO y por lo tanto dependiente de CD36 (Fig. 34). Esta dependencia de CD36 se confirmó con el uso del inhibidor de Src, PP1, el cual inhibió de manera significativa la fosforilación de ERK. Estos resultados indican que el NO₂-OA es un nuevo ligando de CD36, que induce la fosforilación de Src en macrófagos y que a diferencia de otros ligandos de CD36 como AGCL presenta un perfil de fosforilación diferencial en macrófagos.

Hasta aquí, nuestros resultados identifican al NO₂-OA como un nuevo ligando de CD36, que compite la interacción de dicho receptor con otros ligandos como las LDLm reduciendo su incorporación en macrófagos y gatillando señalización a través de CD36. Por otro lado, NO₂-OA también reguló la expresión de CD36 en macrófagos por un mecanismo dependiente de la vía *Keap1/Nrf2* e independiente

de *PPAR* γ . De esta manera el NO₂-OA prevendría la diferenciación a célula espumosa mediante la reducción en la unión de las LDLm a CD36, la incorporación de las mismas y la consecuente acumulación celular de lípidos.

En el microambiente inflamatorio característico de la íntima arterial de la aterosclerosis los macrófagos incorporan de manera excesiva LDLm al punto de superar los mecanismos naturales de eliminación de colesterol conduciendo a la diferenciación a célula espumosa (25). Estas células estimulan el reclutamiento de más células inflamatorias, produciendo altas cantidades de ERO y ERN, llevando a un círculo de retroalimentación positiva. Una vez que se ha alcanzado éste punto el proceso es difícilmente reversible, por lo tanto, la búsqueda de mecanismos que puedan inducir la regresión de la placa está continuamente en estudio. Dentro de estos posibles mecanismos de regresión de la placa encontramos la inducción de la migración de macrófagos. Este mecanismo es de gran consideración ya que favorecería la emigración del macrófago de la placa bloqueando así el círculo vicioso que retroalimenta el proceso inflamatorio (96). En esta tesis demostramos que el NO₂-OA, induce la migración de macrófagos (Fig. 44) y que dicha inducción se ve alterada en presencia de LDLm.

Otro blanco importante en la regresión de la placa de ateroma, es la reducción de la acumulación de lípidos intracelulares mediante la inducción de mecanismos de eflujo de colesterol. Se conoce que la acumulación excesiva de LDLm conduce al bloqueo de la autofagia como mecanismos de eliminación de los depósitos lípidicos en macrófagos (107, 108). En los macrófagos cargados por 24 h con LDLm el tratamiento con NO₂-OA disminuyó el contenido de lípidos intracelulares (Fig. 38). Estos resultados correlacionaron con ensayos donde se demostró que el NO₂-OA indujo una mayor liberación de colesterol libre al sobrenadante de macrófagos cargados, con respecto al control (Fig. 40).

La autofagia es un mecanismo que mantiene la homeostasis celular mediante la eliminación de organelas envejecidas y proteínas oxidadas, dañadas o mal plegadas en la célula. Este mecanismo consta de la formación de una autofagosoma de doble membrana que engloba el contenido a ser degradado el cual se fusiona con el lisosoma (autolisosoma) para su degradación final por las enzimas hidrolíticas (103,

115). La proteína LC3 juega un rol muy importante en el proceso de formación del autofagosoma, la cual se lípida para formar parte de la membrana del mismo. Una vez lipídada, LC3 cambia su movilidad electroforética denominándose LC3 II. Es por ello, que las proteínas LC3 I y LC3 II se utilizan como marcadores del flujo de autofagia, en caso de que el flujo celular sea rápido, como en macrófagos, una acumulación de LC3 II estaría asociada a una reducción en el flujo autofágico por acumulación de autofagosomas en la célula. Este caso, también se correlaciona con una acumulación de la proteína p62, la cual forma parte del autofagosoma y es degradada únicamente en el ciclo autofágico (115). En el presente trabajo se demostró que el tratamiento de macrófagos con LDLm por 24 h induce acumulación de LC3 II y p62, como ha sido descrito previamente (107), y que dicha acumulación se ve reducida cuando las células son tratadas con NO₂-OA por 4 h (Fig. 41). Esto indica que el NO₂-OA restauraría el flujo autofágico y podría ser responsable de la mayor liberación de colesterol en los macrófagos. Es importante destacar que también se evaluaron los cambios en la expresión de los canales de eflujo de colesterol ABCA1 y ABCG1 los cuales no mostraron cambios significativos en macrófagos cargados con LDLm y tratados con el nitroalqueno (información no mostrada en este trabajo de tesis).

Además de reducir el contenido de colesterol, el NO₂-OA también reduce significativamente los niveles de especies reactivas del oxígeno y de citocinas pro-inflamatoria, como la IL-6. Estos efectos probablemente asociados a sus acciones antes descriptas sobre *Nrf2* y *NF-κB*.

Por otro lado, LRP1, quien ha sido foco de investigación por muchos años en nuestro grupo de trabajo, es otro receptor de tipo *scavenger* de gran importancia en la formación de la célula espumosa y la regulación de la inflamación vascular. LRP1 presenta una amplia promiscuidad de ligandos, dentro de los cuales encontramos a las lipoproteínas agregadas (LDLag). LRP1 es necesario para su incorporación por macrófagos y por células musculares lisas de vasculatura (VSMCs) (92, 93). Resultados de esta tesis, demuestran que el NO₂-OA también regula los niveles de LRP1 en membrana (Fig. 45), incrementando rápidamente los niveles proteicos (2 h post-tratamiento) en células RAW 264.7 (Fig. 47). El incremento en los niveles de proteína mediado por NO₂-OA fue independiente de la síntesis, lo cual fue revelado

por ensayos utilizando cicloheximida (Fig. 48). De esta forma, el NO₂-OA estaría involucrado en los mecanismos de degradación de proteínas debido a sus efectos aditivos con el inhibidor de proteasoma MG132 y al incremento causado en los niveles totales de proteínas ubiquitinadas (Fig. 49).

Potencial impacto del NO₂-OA en el desarrollo de la aterosclerosis

En conclusión, en este trabajo de tesis se describió el importante rol del NO₂-OA en la regulación del metabolismo de lípidos en macrófagos y su potencial impacto en la formación de la célula espumosa. El nitroalqueno mostró un efecto dual sobre el funcionalismo de CD36, por un lado induciendo la expresión génica y la síntesis de CD36 mientras que el mismo une al receptor compitiendo la unión de las LDLm, la incorporación y acumulación de lípidos en macrófagos. Esto se explica por su capacidad de comportarse como ligando de CD36, interaccionando con residuos críticos (Lys164), para el reconocimiento de ligandos. Su efecto no solo se vio limitado al receptor CD36, sino que también mostró regular la expresión del receptor LRP1 por un mecanismo independiente de la síntesis de proteínas.

Estos hallazgos demuestran que los nitroalquenos reducen la incorporación de LDLm e incrementar el eflujo de colesterol en los macrófagos sumado a una reducción en el estado inflamatorio y el estrés oxidativo en los mismos, de esta forma confirmando el efecto anti-aterogénico demostrado previamente por Rudoph y col. y Rodriguez y col. (22, 155).

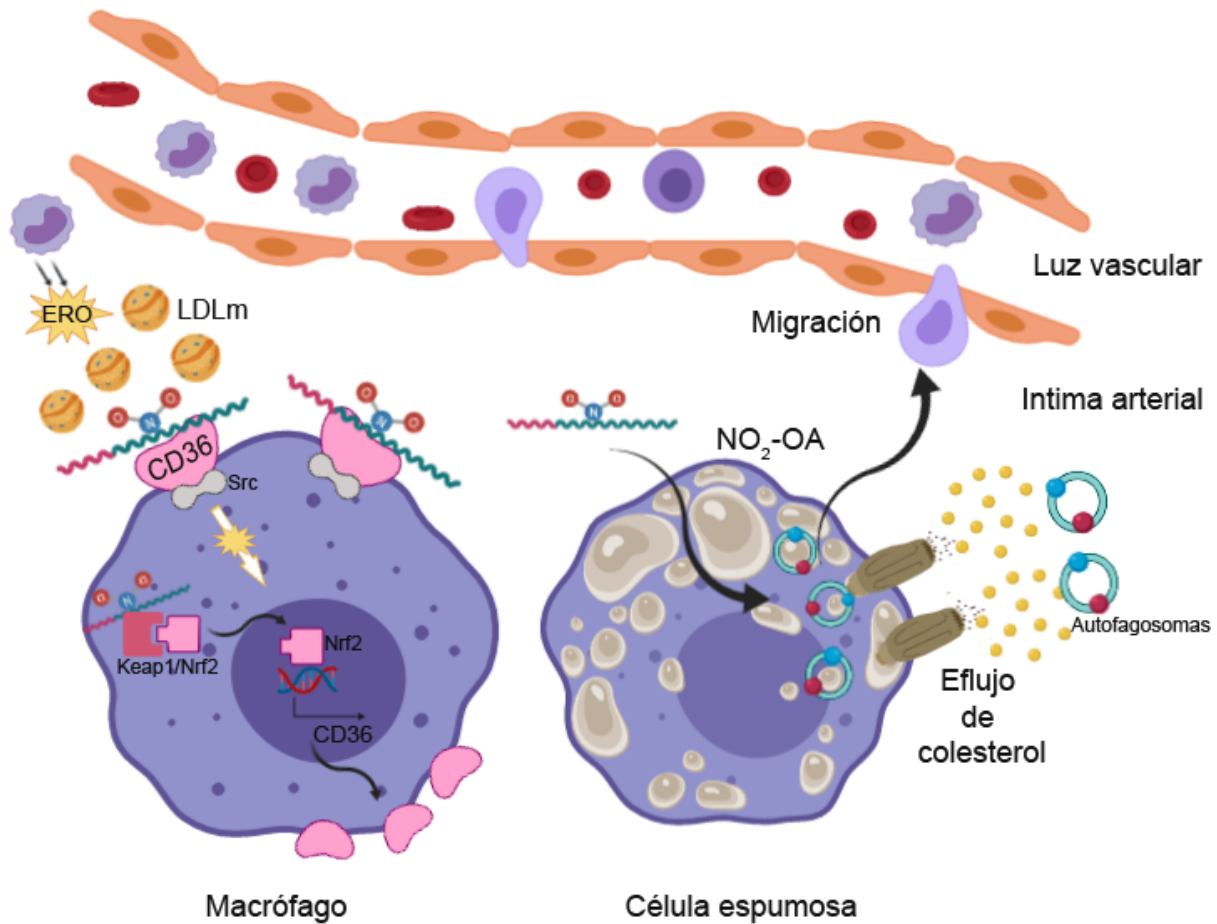


Fig. 50. Representación gráfica de los resultados más relevantes obtenidos en el presente trabajo de tesis. En condiciones fisiopatológicas de la aterosclerosis la inflamación y producción de ERO de la íntima arterial favorece la modificación de las LDL. Las LDLm son reconocidas e incorporadas vía CD36. En presencia del NO₂-OA la unión de las LDLm a CD36 se ve limitada, al igual que su subsecuente incorporación a pesar de la inducción que ejerce el nitroalqueno en la expresión de CD36 a través de la vía *Keap1/Nrf2*. Por otro lado, una vez que la acumulación de lípidos ha tenido lugar y los macrófagos se han diferenciado a células espumosas, el NO₂-OA favorece la liberación de éstos acúmulos lipídicos mediante un mecanismo aparentemente dependiente de autofagia y de la activación de AMPK. Por último, el nitroalqueno también favorece la migración de macrófagos expuestos a LDLm.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Benjamin EJ, Blaha MJ, SE, C., Cushman M, Das SR, Deo R, de Ferranti SD, Floyd J, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jiménez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Mackey RH, Matsushita K, Mozaffarian D, Mussolino ME, P, M., and Subcommittee., A. H. A. S. C. and S. S. (2017) *Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association*, 10.1161/CIR.0000000000000485.Heart
2. Catapano, A. L., Reiner, Ž., De Backer, G., Graham, I., Taskinen, M. R., Wiklund, O., Agewall, S., Alegria, E., Chapman, M. J., Durrington, P., Erdine, S., Halcox, J., Hobbs, R., Kjekshus, J., Perrone Filardi, P., Riccardi, G., Storey, R. F., and Wood, D. (2011) ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Atherosclerosis*. **217**, 3–46
3. Summerhill, V. I., Grechko, A. V, Yet, S., Sobenin, I. A., and Orekhov, A. N. (2019) The Atherogenic Role of Circulating Modified Lipids in Atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.*
4. Endemann, G., Stanton, L. W., Madden, K. S., Bryant, C. M., White, R. T., and Protter, A. A. (1993) CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **268**, 11811–11816
5. Kinlay, S., and Ganz, P. (1997) Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy. *Am. J. Cardiol.* **80**, 11–16
6. Naik, E., and Dixit, V. M. (2011) Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J. Exp. Med.* **208**, 417–420
7. Pant, S., Deshmukh, A., Gurumurthy, G. S., Pothineni, N. V., Watts, T. E., Romeo, F., and Mehta, J. L. (2014) Inflammation and atherosclerosis - Revisited. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **19**, 170–178
8. Getz, G. S. (2005) Immune function in atherogenesis. *J. Lipid Res.* **46**, 1–10

9. Ooi, B. K., Goh, B. H., and Yap, W. H. (2017) Oxidative stress in cardiovascular diseases: Involvement of Nrf2 antioxidant redox signaling in macrophage foam cells formation. *Int. J. Mol. Sci.* 10.3390/ijms18112336
10. Yang, X., Okamura, D. M., Lu, X., Chen, Y., Moorhead, J., Varghese, Z., and Ruan, X. Z. (2017) Cd36 in chronic kidney disease: Novel insights and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Nephrol.* **13**, 769–781
11. Bonacci, G., Baker, P. R. S., Salvatore, S. R., Shores, D., Khoo, N. K. H., 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
12. Ana M. FERREIRA, Mariana I. FERRARI, Andrés TROSTCHANSKY, Carlos BATTHYANY,§, José M. SOUZA, María N. ALVAREZ, Gloria V. LÓPEZ, Paul R. S. BAKER, Francisco J. SCHOPFER, Valerie O'DONNELL, Bruce A. FREEMAN, and H. R. (2009) Macrophage activation induces formation of the anti-inflammatory lipid cholesteryl-nitrolinoleate. *Biochem. J.* **417**, 223–234
13. Schopfer, F. J., Cipollina, C., and Freeman, B. a. (2011) Formation and signaling actions of electrophilic lipids. **111**, 5997–6021
14. Nadtochiy, S. M., Baker, P. R. S., Freeman, B. A., and Brookes, P. S. (2009) Mitochondrial nitroalkene formation and mild uncoupling in ischaemic preconditioning: Implications for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* **82**, 333–340
15. Lima, É. S., Di Mascio, P., Rubbo, H., and Abdalla, D. S. P. (2002) Characterization of linoleic acid nitration in human blood plasma by mass spectrometry. *Biochemistry.* **41**, 10717–10722
16. Salvatore, S. R., Vitturi, D. A., Fazzari, M., Jorkasky, D. K., and Schopfer, F. J. (2017) Evaluation of 10-Nitro Oleic Acid Bio-Elimination in Rats and Humans. *Sci. Rep.* **7**, 1–14

17. Schopfer, F. J., Cole, M. P., Groeger, A. L., Chen, C. S., Khoo, N. K. H., Woodcock, S. R., Golin-Bisello, F., Nkuru Motanya, U., Li, Y., Zhang, J., Garcia-Barrio, M. T., Rudolph, T. K., Rudolph, V., Bonacci, G., Baker, P. R. S., Xu, H. E., Batthyany, C. I., Chen, Y. E., Hallis, T. M., and Freeman, B. a. (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
18. Khoo, N. K. H., Li, L., Salvatore, S. R., Schopfer, F. J., and Freeman, B. A. (2018) Electrophilic fatty acid nitroalkenes regulate Nrf2 and NF- κ B signaling: A medicinal chemistry investigation of structure-function relationships. *Sci. Rep.* 10.1038/s41598-018-20460-8
19. Rudolph, V., Rudolph, T. K., Schopfer, F. J., Bonacci, G., Woodcock, S. R., Cole, M. P., Baker, P. R. S., Ramani, R., and Freeman, B. a. (2010) Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* **85**, 155–166
20. Cui, T., Schopfer, F. J., Chen, K., Ichikawa, T., Baker, R. S., Batthyany, C., Balu, K., Feng, X., Patel, R. P., Freeman, B. A., Yuqing, E., Chacko, B. K., and Agarwal, A. (2006) Nitrated Fatty Acids : Endogenous Anti-inflammatory. *J. Biol. Chem.* **281**, 35686–35698
21. Buchan, G. R., Bonacci, G., Fazzari, M., Salvatore, S., and Wendell, G. (2019) Nitro-fatty acid Formation and Metabolism. 10.1016/j.niox.2018.07.003.Nitro-fatty
22. Rudolph, T. K., Rudolph, V., Edreira, M. M., Cole, M. P., Bonacci, G., Schopfer, F. J., Woodcock, S. R., Franek, A., Pekarova, M., Khoo, N. K. H., Hasty, A. H., Baldus, S., and Freeman, B. a. (2010) Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 938–945
23. Shah, P. K. (2013) Pathogenesis of atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **47**,

24. Xiao-Hua Yu, Yu-Chang Fu, Da-Wei Zhang, K. Y., and Tang, C.-K. (2013) Foam cells in atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta.* **25**, 615–622
25. Yu, X. H., Fu, Y. C., Zhang, D. W., Yin, K., and Tang, C. K. (2013) Foam cells in atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta.* **424**, 245–252
26. Alique, M., Luna, C., Carracedo, J., and Ramírez, R. (2015) LDL biochemical modifications: A link between atherosclerosis and aging. *Food Nutr. Res.* **59**, 1–8
27. Chisolm, G. M., Hazen, S. L., Fox, P. L., and Cathcart, M. K. (2002) The Oxidation of Lipoproteins by Monocytes-Macrophages. *J. Biol. Chem.* **274**, 25959–25962
28. Maguire, E. M., Pearce, S. W. A., and Xiao, Q. (2019) Foam cell formation: A new target for fighting atherosclerosis and cardiovascular disease. *Vascul. Pharmacol.* **112**, 54–71
29. Hsieh, F. L., Turner, L., Bolla, J. R., Robinson, C. V., Lavstsen, T., and Higgins, M. K. (2016) The structural basis for CD36 binding by the malaria parasite. *Nat. Commun.* **7**, 1–11
30. Baillie, A. G. S., Coburn, C. T., and Abumrad, N. A. (1996) Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *J. Membr. Biol.* **153**, 75–81
31. Coburn, C. T., Knapp, J., Febbraio, M., Beets, A. L., Silverstein, R. L., and Abumrad, N. A. (2000) Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J. Biol. Chem.* **275**, 32523–32529
32. Abumrad, N. A., El-Maghrabi, M. R., Ez-Zoubir, A., Lopez, E., and Grimaldill, P. A. (1993) Cloning of a Rat Adipocyte Membrane Protein Implicated in Binding or Transport of Long-chain Fatty Acids That Is Induced during

- Preadipocyte Differentiation. *J. Biol. Chem.* **268**, 17665–17668
33. Kar, N. S., Ashraf, M. Z., Valiyaveetil, M., and Podrez, E. A. (2008) Mapping and characterization of the binding site for specific oxidized phospholipids and oxidized low density lipoprotein of scavenger receptor CD36. *J. Biol. Chem.* **283**, 8765–8771
 34. Oquendo, P., Hundt, E., Lawler, J., and Seed, B. (1989) CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell.* **58**, 95–101
 35. Asch, A. S., Silbiger, S., Heimer, E., and Nachman, R. L. (1992) Thrombospondin sequence motif (CSVTCG) is responsible for CD36 binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**, 1208–1217
 36. Rahaman, S. O., Lennon, D. J., Febbraio, M., Podrez, E. a., Hazen, S. L., and Silverstein, R. L. (2006) A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab.* **4**, 211–221
 37. Kuda, O., Abumrad, N. A., Pietka, T. A., Cvacka, J., Kopecky, J., Demianova, Z., and Kudova, E. (2013) Sulfo- N -succinimidyl Oleate (SSO) Inhibits Fatty Acid Uptake and Signaling for Intracellular Calcium via Binding CD36 Lysine 164 . *J. Biol. Chem.* **288**, 15547–15555
 38. Coort, S. L. M., Willems, J., Coumans, W. A., van der Vusse, G. J., Bonen, A., Glatz, J. F. C., and Luiken, J. J. F. P. (2002) Sulfo-N-succinimidyl esters of long chain fatty acids specifically inhibit fatty acid translocase (FAT/CD36)-mediated cellular fatty acid uptake. *Mol. Cell. Biochem.* **239**, 213–219
 39. Vögtle, T., Sadou, H., Chouabe, C., Abdoul-Azize, S., Khan, N. A., Besnard, P., Dramane, G., Akpona, S., Hichami, A., and Nieswandt, B. (2012) STIM1 regulates calcium signaling in taste bud cells and preference for fat in mice. *J. Clin. Invest.* **122**, 2267–2282
 40. Navazo, M. D. P., Daviet, L., Ninio, E., and McGregor, J. L. (2011) Identification on Human CD36 of a Domain (155-183) Implicated in Binding

- Oxidized Low-Density Lipoproteins (Ox-LDL). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 1033–1039
41. Chabowski, A., Choromańska, K., Dadan, J., Myśliwiec, P., and Choromańska, B. (2017) The role of CD36 receptor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Adv. Clin. Exp. Med.* **26**, 717–722
 42. Miquilena-Colina, M. E., Lima-Cabello, E., Sánchez-Campos, S., García-Mediavilla, M. V., Fernández-Bermejo, M., Lozano-Rodríguez, T., Vargas-Castrillón, J., Xabier Buqué, B. O., Aspichueta, P., González-Gallego, J., and García-Monzón, C. (2011) Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut.* **60**, 1394–1402
 43. Handberg, A., Norberg, M., Stenlund, H., Hallmans, G., Attermann, J., and Eriksson, J. W. (2010) Soluble CD36 (sCD36) clusters with markers of insulin resistance, and high sCD36 is associated with increased type 2 diabetes risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 1939–1946
 44. Mirza, A. Z., Althagaf, I. I., and Shamshad, H. (2019) Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications
 45. Yessoufou, A., and Wahli, W. (2010) Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. *Swiss Med. Wkly.* **140**, 1–9
 46. Petr, M., Stastny, P., Zajac, A., Tufano, J. J., and Maciejewska-Skrendo, A. (2018) The role of peroxisome proliferator-activated receptors and their transcriptional coactivators gene variations in human trainability: A systematic review. *Int. J. Mol. Sci.* 10.3390/ijms19051472
 47. Wahli, W. (2008) PPAR γ : Ally and Foe in Bone Metabolism. *Cell Metab.* **7**, 188–190
 48. Zolezzi, J. M., Santos, M. J., Bastías-Candia, S., Pinto, C., Godoy, J. A., and

- Inestrosa, N. C. (2017) PPARs in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroinflammation. *Biol. Rev.* **92**, 2046–2069
49. Dubuquoy, L., Rousseaux, C., Thuru, X., Peyrin-Biroulet, L., Romano, O., Chavatte, P., Chamailard, M., and Desreumaux, P. (2006) PPAR γ as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Gut.* **55**, 1341–1349
 50. Kobayashi, A., Kang, M., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., and Yamamoto, M. (2004) Oxidative Stress Sensor Keap1 Functions as an Adaptor for Cul3-Based E3 Ligase To Regulate Proteasomal Degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7130–7139
 51. Ishii, T., Itoh, K., Ruiz, E., Leake, D. S., Unoki, H., Yamamoto, M., and Mann, G. E. (2004) Role of Nrf2 in the Regulation of CD36 and Stress Protein Expression in Murine Macrophages: Activation by Oxidatively Modified LDL and 4-Hydroxynonenal. *Circ. Res.* **94**, 609–616
 52. Zgórzyńska, E., Dziedzic, B., Gorzkiewicz, A., Stulczewski, D., Bielawska, K., Su, K. P., and Walczewska, A. (2017) Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve the antioxidative defense in rat astrocytes via an Nrf2-dependent mechanism. *Pharmacol. Reports.* **69**, 935–942
 53. Bryan, H. K., Olayanju, A., Goldring, C. E., and Park, B. K. (2013) The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 705–717
 54. Tebay, L. E., Robertson, H., Durant, S. T., Vitale, S. R., Penning, T. M., Dinikova-Kostova, A.T., Hayes, J. D. (2016) Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease Lauren. *Free Radic. Biol. Med.* **88**, 108–146
 55. Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J. G. A., Thomazy, V. A., and Evans, R. M. (1998) PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell.* **93**, 241–252

56. Goto, K., Iso, T., Hanaoka, H., Yamaguchi, A., Suga, T., Hattori, A., Irie, Y., Shinagawa, Y., Matsui, H., Syamsunarno, M. R. A. A., Matsui, M., Haque, A., Arai, M., Kunimoto, F., Yokoyama, T., Endo, K., Gonzalez, F. J., and Kurabayashi, M. (2013) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ in capillary endothelia promotes fatty acid uptake by heart during long-term fasting. *J. Am. Heart Assoc.* **2**, 1–15
57. Sawada, H., Saito, Y., and Noguchi, N. (2012) Enhanced CD36 expression changes the role of Nrf2 activation from anti-atherogenic to pro-atherogenic in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis.* **225**, 83–90
58. Crucet, M., Wüst, S. J. A., Spielmann, P., Lüscher, T. F., Wenger, R. H., and Matter, C. M. (2013) Hypoxia enhances lipid uptake in macrophages: Role of the scavenger receptors Lox1, SRA, and CD36. *Atherosclerosis.* **229**, 110–117
59. Ortiz-Masià, D., Díez, I., Calatayud, S., Hernández, C., Cosín-Roger, J., Hinojosa, J., Esplugues, J. V., and Barrachina, M. D. (2012) Induction of CD36 and Thrombospondin-1 in Macrophages by Hypoxia-Inducible Factor 1 and Its Relevance in the Inflammatory Process. *PLoS One.* 10.1371/journal.pone.0048535
60. Ishii, T., Itoh, K., Ruiz, E., Leake, D. S., Unoki, H., Yamamoto, M., and Mann, G. E. (2004) Role of Nrf2 in the Regulation of CD36 and Stress Protein Expression in Murine Macrophages: Activation by Oxidatively Modified LDL and 4-Hydroxynonenal. *Circ. Res.* **94**, 609–616
61. Febbraio, M., Sharma, K., Pearce, S. F. A., Silverstein, R. L., Hajjar, D. P., Abumrad, N. A., and Cheng, W. (1999) A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J. Biol. Chem.* **274**, 19055–19062
62. Nozaki, S., Kashiwagi, H., Yamashita, S., Nakagawa, T., Kostner, B., Tomiyama, Y., Nakata, A., Ishigami, M., Miyagawa, J. I., Kameda-Takemura, K., Kurata, Y., and Matsuzawa, Y. (1995) Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient

- subjects. *J. Clin. Invest.* **96**, 1859–1865
63. Moore, K. J., Kunjathoor, V. V., Koehn, S. L., Manning, J. J., Tseng, A. A., Silver, J. M., McKee, M., and Freeman, M. W. (2005) Loss of receptor-mediated lipid uptake via scavenger receptor A or CD36 pathways does not ameliorate atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *J. Clin. Invest.* **115**, 2192–2201
 64. Tanaka, T., Sohmiya, K., and Kawamura, K. (1997) Is CD36 deficiency an etiology of hereditary hypertrophic cardiomyopathy? *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 121–127
 65. Nomura, M., Liu, J., Yu, Z. X., Yamazaki, T., Yan, Y., Kawagishi, H., Rovira, I. I., Liu, C., Wolfgang, M. J., Mukoyama, Y. suke, and Finkel, T. (2019) Macrophage fatty acid oxidation inhibits atherosclerosis progression. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **127**, 270–276
 66. McFarlan, J. T., Yoshida, Y., Jain, S. S., Han, X. X., Snook, L. A., Lally, J., Smith, B. K., Glatz, J. F. C., Luiken, J. J. F. P., Sayer, R. A., Tupling, A. R., Chabowski, A., Holloway, G. P., and Bonen, A. (2012) In vivo, fatty acid translocase (CD36) critically regulates skeletal muscle fuel selection, exercise performance, and training-induced adaptation of fatty acid oxidation. *J. Biol. Chem.* **287**, 23502–23516
 67. Samovski, D., Sun, J., Pietka, T., Gross, R. W., Eckel, R. H., Su, X., Stahl, P. D., and Abumrad, N. a. (2015) Regulation of AMPK Activation by CD36 Links Fatty Acid Uptake to β -Oxidation. *Diabetes.* **64**, 353–359
 68. Jain, S. S., Han, X. X., Holloway, G. P., Bezaire, V., Bonen, A., Glatz, J. F. C., Harper, M.-E., and Luiken, J. J. F. P. (2009) FAT/CD36-null mice reveal that mitochondrial FAT/CD36 is required to upregulate mitochondrial fatty acid oxidation in contracting muscle. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **297**, R960–R967
 69. Zhao, S. P., Wu, J., Zhang, D. Q., Ye, H. J., Liu, L., and Li, J. Q. (2004) Fenofibrate enhances CD36 mediated endocytic uptake and degradation of

- oxidized low density lipoprotein in adipocytes from hypercholesterolemia rabbit. *Atherosclerosis*. **177**, 255–262
70. Campbell, S. E., Tandon, N. N., Woldegiorgis, G., Luiken, J. J. F. P., Glatz, J. F. C., and Bonen, A. (2004) A Novel Function for Fatty Acid Translocase (FAT)/CD36. *J. Biol. Chem.* **279**, 36235–36241
 71. Murakami, M., and Kudo, I. (2004) *Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway*, 10.1016/S0163-7827(03)00037-7
 72. Kuda, O., Jenkins, C. M., Skinner, J. R., Moon, S. H., Su, X., Gross, R. W., and Abumrad, N. A. (2011) CD36 protein is involved in store-operated calcium flux, phospholipase A2 activation, and production of prostaglandin E2. *J. Biol. Chem.* **286**, 17785–17795
 73. Pietka, T. A., Sulkin, M. S., Kuda, O., Wang, W., Zhou, D., Yamada, K. A., Yang, K., Su, X., Gross, R. W., Nerbonne, J. M., Efimov, I. R., and Abumrad, N. A. (2012) CD36 Protein Influences Myocardial Ca²⁺ Homeostasis and Phospholipid Metabolism. *J. Biol. Chem.* **287**, 38901–38912
 74. Nahlé, Z., Hsieh, M., Pietka, T., Coburn, C. T., Grimaldi, P. A., Zhang, M. Q., Das, D., and Abumrad, N. A. (2008) CD36-dependent regulation of muscle FoxO1 and PDK4 in the PPAR δ / β -mediated adaptation to metabolic stress. *J. Biol. Chem.* **283**, 14317–14326
 75. Samovski, D., Sun, J., Pietka, T., Gross, R. W., Eckel, R. H., Su, X., Stahl, P. D., and Abumrad, N. A. (2015) Regulation of AMPK activation by CD36 links fatty acid uptake to β -oxidation. *Diabetes*. **64**, 353–359
 76. Kan Chen, Maria Febbraio, W. L. and R. L. S. (2008) A specific CD36-dependent signaling pathway is required for platelet activation by oxLDL. *Circ. Res.* **102**, 1512–1519
 77. Moore, K. J., El Khoury, J., Medeiros, L. A., Terada, K., Geula, C., Luster, A. D., and Freeman, M. W. (2002) A CD36-initiated signaling cascade mediates

- inflammatory effects of β -amyloid. *J. Biol. Chem.* **277**, 47373–47379
78. Dawson, D. W., Pearce, S. F. A., Zhong, R., Silverstein, R. L., Frazier, W. A., and Bouck, N. P. (1997) CD36 mediates the in vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J. Cell Biol.* **138**, 707–717
 79. Rahaman, S. O., Zhou, G., and Silverstein, R. L. (2011) Vav protein guanine nucleotide exchange factor regulates CD36 protein-mediated macrophage foam cell formation via calcium and dynamin-dependent processes. *J. Biol. Chem.* **286**, 36011–36019
 80. Rahaman, S. O., Li, W., and Silverstein, R. L. (2013) Vav guanine nucleotide exchange factors regulate atherosclerotic lesion development in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 2053–2057
 81. Stewart, C. R., Stuart, L. M., Wilkinson, K., Gils, J. M. Van, Halle, A., Rayner, K. J., Boyer, L., Zhong, R., A, W., Lacy-hulbert, A., Khoury, J. El, Golenbock, D. T., and J, K. (2010) CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat. Immunol.* **11**, 155–161
 82. Vasanji, A., Park, Y. M., Silverstein, R. L., Drazba, J. A., Egelhoff, T., and Febbraio, M. (2012) Oxidized LDL/CD36 interaction induces loss of cell polarity and inhibits macrophage locomotion. *Mol. Biol. Cell.* **23**, 3057–3068
 83. Young, M. P., Febbraio, M., and Silverstein, R. L. (2009) CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J. Clin. Invest.* **119**, 136–145
 84. Park, Y. M. (2014) CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp. Mol. Med.* **46**, e99-7
 85. Lillis, A. P., Duyn, L. B. Van, Murphy-ullrich, J. E., and Dudley, K. (2009) The low density lipoprotein receptor-related protein 1: Unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev.* **88**, 887–

86. May, P., Woldt, E., Matz, R. L., and Boucher, P. (2007) The LDL receptor-related protein (LRP) family: An old family of proteins with new physiological functions. *Ann. Med.* **39**, 219–228
87. Rondón-Ortiz, A. N., Cardenas, C. L. L., Martínez-Málaga, J., Gonzales-Urday, A. L., Gugnani, K. S., Böhlke, M., Maher, T. J., and Pino-Figueroa, A. J. (2017) High concentrations of rosiglitazone reduce mRNA and protein levels of LRP1 in HepG2 cells. *Front. Pharmacol.* **8**, 1–12
88. Llorente-Cortés, V., Royo, T., Otero-Viñas, M., Berrozpe, M., and Badimon, L. (2007) Sterol regulatory element binding proteins downregulate LDL receptor-related protein (LRP1) expression and LRP1-mediated aggregated LDL uptake by human macrophages. *Cardiovasc. Res.* **74**, 526–536
89. Muratoglu, S. C., Belgrave, S., Lillis, A. P., Migliorini, M., Robinson, S., Smith, E., Zhang, L., and Strickland, D. K. (2011) Macrophage LRP1 suppresses neo-intima formation during vascular remodeling by modulating the TGF- β signaling pathway. *PLoS One*. 10.1371/journal.pone.0028846
90. Dato, V. A., and Chiabrando, G. A. (2018) The role of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in lipid metabolism, glucose homeostasis and inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–13
91. El Asmar, Z., Terrand, J., Jenty, M., Host, L., Mlih, M., Zerr, A., Justiniano, H., Matz, R. L., Boudier, C., Scholler, E., Garnier, J. M., Bertaccini, D., Thiersé, D., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., Herz, J., Bruban, V., and Boucher, P. (2016) Convergent signaling pathways controlled by LRP1 (Receptor-related Protein 1) cytoplasmic and extracellular domains limit cellular cholesterol accumulation. *J. Biol. Chem.* **291**, 5116–5127
92. Costales, P., Fuentes-Prior, P., Castellano, J., Revuelta-Lopez, E., Corral-Rodríguez, M. Á., Nasarre, L., Badimon, L., and Llorente-Cortes, V. (2015) K domain CR9 of low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein 1 (LRP1) is critical for aggregated LDL-induced foam cell formation from human vascular

- smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **290**, 14852–14865
93. Lillis, A. P., Muratoglu, S. C., Au, D. T., Migliorini, M., Lee, M.-J., Fried, S. K., Mikhailenko, I., and Strickland, D. K. (2015) LDL Receptor-Related Protein-1 (LRP1) Regulates Cholesterol Accumulation in Macrophages. *PLoS One.* **10**, e0128903
 94. Qiao, Y., Guo, D., Meng, L., Liu, Q., Liu, X., Tang, C., Yi, G., Wang, Z., Yin, W., Tian, G., and Yuan, Z. (2015) Oxidized-low density lipoprotein accumulates cholesterol esters via the PKC α -adipophilin-ACAT1 pathway in RAW264.7 cells. *Mol. Med. Rep.* **12**, 3599–3606
 95. Reis, E. D., Li, J., Fayad, Z. A., Rong, J. X., Hansoty, D., Aguinaldo, J. G., Fallon, J. T., and Fisher, E. A. (2001) Dramatic remodeling of advanced atherosclerotic plaques of the apolipoprotein e-deficient mouse in a novel transplantation model. *J. Vasc. Surg.* **34**, 541–547
 96. Llodra, J., Angeli, V., Liu, J., Trogan, E., Fisher, E. A., and Randolph, G. J. (2004) From the Cover: Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 11779–11784
 97. Chereshnev, I., Trogan, E., Omerhodzic, S., Itskovich, V., Aguinaldo, J. G., Fayad, Z. A., Fisher, E. A., and Reis, E. D. (2003) Mouse model of heterotopic aortic arch transplantation. *J. Surg. Res.* **111**, 171–176
 98. Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism (2001) *J. Lipid Res.* **42**, 1513–1520
 99. Orekhov, A. N., Pushkarsky, T., Oishi, Y., Nikiforov, N. G., Zhelankin, A. V., Dubrovsky, L., Makeev, V. J., Foxx, K., Jin, X., Kruth, H. S., Sobenin, I. A., Sukhorukov, V. N., Zakiev, E. R., Kontush, A., Le Goff, W., and Bukrinsky, M. (2018) HDL activates expression of genes stimulating cholesterol efflux in human monocyte-derived macrophages. *Exp. Mol. Pathol.* **105**, 202–207
 100. Farese, R. V (2011) Lipid Droplets Finally Get a Little R-E-S-P-E-C-T. *Cell.*

101. Antoni Paul, Benny Hung-Junn Chang, Lan Li, V. K. Y. and L. C. (2008) Deficiency of Adipose Differentiation-Related Protein Impairs Foam Cell Formation and Protects Against Atherosclerosis. *Circ. Res.* **23**, 1–7
102. Klionsky, D. J. (2004) The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell Sci.* **118**, 7–18
103. Tanida, I. (2011) Autophagosome Formation and Molecular Mechanism of Autophagy. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 2201–2214
104. Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A. M., and Czaja, M. J. (2009) Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature.* **458**, 1131–1135
105. Ouimet, M., Franklin, V., Mak, E., Liao, X., Tabas, I., and Marcel, Y. L. (2011) Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. *Cell Metab.* **13**, 655–667
106. Ackermann, K., Bonaterra, G. A., Kinscherf, R., and Schwarz, A. (2019) Growth differentiation factor-15 regulates oxLDL-induced lipid homeostasis and autophagy in human macrophages. *Atherosclerosis.* **281**, 128–136
107. Ning, H., Liu, D., Yu, X., and Guan, X. (2017) Oxidized low-density lipoprotein-induced p62/SQSTM1 accumulation in THP-1-derived macrophages promotes IL-18 secretion and cell death. *Exp. Ther. Med.* **14**, 5417–5423
108. Ma, Y., Huang, Z., Zhou, Z., He, X., Wang, Y., Meng, C., Huang, G., and Fang, N. (2018) A novel antioxidant Mito-Tempol inhibits ox-LDL-induced foam cell formation through restoration of autophagy flux. *Free Radic. Biol. Med.* **129**, 463–472
109. Gu, H. F., Li, H. Z., Tang, Y. L., Tang, X. Q., Zheng, X. L., and Liao, D. F. (2016) Nicotinate-curcumin impedes foam cell formation from THP-1 cells through restoring autophagy flux. *PLoS One.* **11**, 1–15

110. Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D. G. (2005) AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* **1**, 15–25
111. Grootaert, M. O. J., da Costa Martins, P. A., Bitsch, N., Pintelon, I., de Meyer, G. R. Y., Martinet, W., and Schrijvers, D. M. (2015) Defective autophagy in vascular smooth muscle cells accelerates senescence and promotes neointima formation and atherogenesis. *Autophagy.* **11**, 2014–2032
112. Steinberg, G. R., and Kemp, B. E. (2009) AMPK in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **89**, 1025–1078
113. Ou, H., Liu, C., Feng, W., Xiao, X., Tang, S., and Mo, Z. (2018) Role of AMPK in atherosclerosis via autophagy regulation. *Sci. China Life Sci.* **61**, 1212–1221
114. Krishan, S., Richardson, D. R., and Sahni, S. (2015) Adenosine Monophosphate-Activated Kinase and Its Key Role in Catabolism: Structure, Regulation, Biological Activity, and Pharmacological Activation. *Mol. Pharmacol.* **87**, 363–377
115. Abada, A., and Elazar, Z. (2014) Getting ready for building: signaling and autophagosome biogenesis. *EMBO Rep.* **15**, 839–852
116. Anna-Kaisa Ruotsalainen, Jari P. Lappalainen, Emmi Heiskanen, Mari Merentie, Virve Sihvola, Juha Näpänkanga, Line Lottonen-Raikaslehto, Emilia Kansanen, Simone Adinolfi, K. K. (2018) Nrf2 deficiency impairs atherosclerotic lesion development but promotes features of plaque instability in hypercholesterolemic mice. *Eur. Soc. Cardiol.* 10.1093/cvr/cvy143/5039894
117. Batthyány, C., Santos, C. X. C., Botti, H., Cerveñansky, C., Radi, R., Augusto, O., and Rubbo, H. (2000) Direct evidence for apo B-100-mediated copper reduction: Studies with purified apo B-100 and detection of tryptophanyl radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* **384**, 335–340
118. Morris, G. M., Huey, R., and Olson, A. J. (2008) *UNIT using AutoDock for*

119. Trott, O., and Olson, A. (2010) Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking. *J. Comput. Chem.* **31**, 455–461
120. Forli, S., and Botta, M. (2007) Lennard-jones potential and dummy atom settings to overcome the AUTODOCK limitation in treating flexible ring systems. *J. Chem. Inf. Model.* **47**, 1481–1492
121. Quiroga, R., and Villarreal, M. A. (2016) Vinardo: A scoring function based on autodock vina improves scoring, docking, and virtual screening. *PLoS One.* **11**, 1–18
122. Ishii, T., Itoh, K., Ruiz, E., Leake, D. S., Unoki, H., Yamamoto, M., and Mann, G. E. (2004) Role of Nrf2 in the Regulation of CD36 and Stress Protein Expression in Murine Macrophages: Activation by Oxidatively Modified LDL and 4-Hydroxynonenal. *Circ. Res.* **94**, 609–616
123. Moore, K. J., Rosen, E. D., Fitzgerald, M. L., Randow, F., Andersson, L. P., Altshuler, D., Milstone, D. S., Mortensen, R. M., Spiegelman, B. M., and Freeman, M. W. (2001) The role of PPAR- γ in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat. Med.* **7**, 41–47
124. Schopfer, F. J., Cole, M. P., Groeger, A. L., Chen, C. S., Khoo, N. K. H., Woodcock, S. R., Golin-Bisello, F., Nkiru Motanya, U., Li, Y., Zhang, J., Garcia-Barrio, M. T., Rudolph, T. K., Rudolph, V., Bonacci, G., Baker, P. R. S., Xu, H. E., Batthyany, C. I., Chen, Y. E., Hallis, T. M., and Freeman, B. A. (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
125. Kansanen, E., Bonacci, G., Schopfer, F. J., Kuosmanen, S. M., Tong, K. I., Leinonen, H., Woodcock, S. R., Yamamoto, M., Carlberg, C., Yla, S., and Freeman, B. A. (2011) Electrophilic Nitro-fatty Acids Activate NRF2 by a KEAP1 Cysteine 151-independent Mechanism *. *J. Biol. Chem.* **286**, 14019–14027

126. Hsieh, F. L., Turner, L., Bolla, J. R., Robinson, C. V., Lavstsen, T., and Higgins, M. K. (2016) The structural basis for CD36 binding by the malaria parasite. *Nat. Commun.* **7**, 1–11
127. Sfeir, Z., Ibrahimi, A., Amri, E., Grimaldi, P., and Abumrad, N. (1997) Regulation of FAT/CD36 gene expression: Further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* **57**, 17–21
128. Yang, P., Su, C., Luo, X., Zeng, H., Zhao, L., Wei, L., Zhang, X., Varghese, Z., Moorhead, J. F., Chen, Y., and Ruan, X. Z. (2018) Dietary oleic acid-induced CD36 promotes cervical cancer cell growth and metastasis via up-regulation Src/ERK pathway. *Cancer Lett.* **438**, 76–85
129. Kim, D. H., Cho, Y. M., Lee, K. H., Jeong, S. W., and Kwon, O. J. (2017) Oleate protects macrophages from palmitate-induced apoptosis through the downregulation of CD36 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **488**, 477–482
130. Schlich, R., Lamers, D., Eckel, J., and Sell, H. (2015) Adipokines enhance oleic acid-induced proliferation of vascular smooth muscle cells by inducing CD36 expression. *Arch. Physiol. Biochem.* **121**, 81–87
131. Kuda, O., Abumrad, N. A., Pietka, T. A., Cvacka, J., Kopecky, J., Demianova, Z., and Kudova, E. (2013) Sulfo- N -succinimidyl Oleate (SSO) Inhibits Fatty Acid Uptake and Signaling for Intracellular Calcium via Binding CD36 Lysine 164 . *J. Biol. Chem.* **288**, 15547–15555
132. Mansor, L. S., Sousa Fialho, M. da L., Yea, G., Coumans, W. A., West, J. A., Kerr, M., Carr, C. A., Luiken, J. J. F. P., Glatz, J. F. C., Evans, R. D., Griffin, J. L., Tyler, D. J., Clarke, K., and Heather, L. C. (2017) Inhibition of sarcolemmal FAT/CD36 by sulfo-N-succinimidyl oleate rapidly corrects metabolism and restores function in the diabetic heart following hypoxia/reoxygenation. *Cardiovasc. Res.* **113**, 737–748
133. El-Yassimi, A., Hichami, A., Besnard, P., and Khan, N. A. (2008) Linoleic acid

- induces calcium signaling, Src kinase phosphorylation, and neurotransmitter release in mouse CD36-positive gustatory cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 12949–12959
134. Abumrad, N. A., and Goldberg, I. J. (2016) CD36 actions in the heart: Lipids, calcium, inflammation, repair and more? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* **1861**, 1442–1449
135. Coort, S. L. M., Willems, J., Coumans, W. A., van der Vusse, G. J., Bonen, A., Glatz, J. F. C., and Luiken, J. J. F. P. (2002) Sulfo-N-succinimidyl esters of long chain fatty acids specifically inhibit fatty acid translocase (FAT/CD36)-mediated cellular fatty acid uptake. *Mol. Cell. Biochem.* **239**, 213–219
136. Orekhov, A. N., Chistiakov, D. A., Grechko, A. V., Melnichenko, A. A., and Myasoedova, V. A. (2017) Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *J. Mol. Med.* **95**, 1153–1165
137. Rubbo, H. (2013) Nitro-fatty acids: Novel anti-inflammatory lipid mediators. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **46**, 728–734
138. Tamara A. Pagler, Mi Wang, Mousumi Mondal, Andrew J. Murphy, Marit Westerterp, Kathryn J. Moore, Frederick R. Maxfield, and A. R. T. (2011) Deletion of ABCA1 and ABCG1 impairs macrophage migration because of increased Rac1 signaling. *Circ. Res.* **108**, 194–200
139. Flynn, M. C., Pernes, G., Lee, M. K. S., Nagareddy, P. R., and Murphy, A. J. (2019) Monocytes, Macrophages, and Metabolic Disease in Atherosclerosis. *Front. Pharmacol.* **10**, 1–13
140. Ishwarlal Jialal and Devaraj, S. (2018) The Role of Oxidized Low Density Lipoprotein in Atherogenesis. *J. nut.*
141. Lara-guzmán, O. J., Gil-izquierdo, Á., Medina, S., and Osorio, E. (2018) Oxidized LDL triggers changes in oxidative stress and in inflammatory biomarkers in human macrophages. *Redox Biol.* **15**, 1–11

142. Bonacci, G., Schopfer, F. J., Koenitzer, J. R., Woodcock, S. R., Chen, C.-S., Kelley, E. E., and Cantu-Medellin, N. (2015) Fatty acid nitroalkenes induce resistance to ischemic cardiac injury by modulating mitochondrial respiration at complex II. *Redox Biol.* **8**, 1–10
143. Freeman, B. A., O'Donnell, V. B., and Schopfer, F. J. (2018) The discovery of nitro-fatty acids as products of metabolic and inflammatory reactions and mediators of adaptive cell signaling. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* **77**, 106–111
144. Rudolph, V., Rudolph, T. K., Schopfer, F. J., Bonacci, G., Woodcock, S. R., Cole, M. P., Baker, P. R. S., Ramani, R., and Freeman, B. a. (2010) Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* **85**, 155–166
145. Shiva, S., Chartoumpekis, D., Freeman, B. A., Arteel, G. E., Li, L., Fazzari, M., Khoo, N. K. H., and Guimaraes, D. A. (2019) Electrophilic nitro-oleic acid reverses obesity-induced hepatic steatosis. *Redox Biol.* **22**, 101132
146. Rudolph, T. K., Rudolph, V., Edreira, M. M., Cole, M. P., Bonacci, G., Schopfer, F. J., Woodcock, S. R., Franek, A., Pekarova, M., Khoo, N. K. H., Hastay, A. H., Baldus, S., and Freeman, B. a. (2010) Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 938–945
147. Villacorta, L., Chang, L., Salvatore, S. R., Ichikawa, T., Zhang, J., Petrovic-Djergovic, D., Jia, L., Carlsen, H., Schopfer, F. J., Freeman, B., 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
148. Schopfer, F. J., Lin, Y., Baker, P. R. S., Cui, T., Garcia-Barrio, M., Zhang, J., Chen, K., Chen, Y. E., and Freeman, B. a. (2005) Nitrolinoleic acid: An endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 2340–2345

149. Silverstein, R. L., Asch, A. S., and Nachman, R. L. (1989) Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion. *J. Clin. Invest.* **84**, 546–552
150. Nakata, A., Nakagawa, Y., Nishida, M., Nozaki, S., Miyagawa, J. I., Nakagawa, T., Tamura, R., Matsumoto, K., Kameda-Takemura, K., Yamashita, S., and Matsuzawa, Y. (1999) CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 1333–1339
151. Kar, N. S., Ashraf, M. Z., Valiyaveetil, M., and Podrez, E. A. (2008) Mapping and characterization of the binding site for specific oxidized phospholipids and oxidized low density lipoprotein of scavenger receptor CD36. *J. Biol. Chem.* **283**, 8765–8771
152. Hung, J. P., Paz, M. A., Hamilton, J. A., Jay, A. G., and Chen, A. N. (2015) CD36 Binds Oxidized Low Density Lipoprotein (LDL) in a Mechanism Dependent upon Fatty Acid Binding. *J. Biol. Chem.* **290**, 4590–4603
153. Jay, A. G., and Hamilton, J. A. (2018) The enigmatic membrane fatty acid transporter CD36: New insights into fatty acid binding and their effects on uptake of oxidized LDL. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* **138**, 64–70
154. Li, J., Yu, C., Wang, R., Xu, J., Chi, Y., Qin, J., and Liu, Q. (2017) The ω -carboxyl group of 7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate mediates the binding of oxLDL to CD36 receptor and enhances caveolin-1 expression in macrophages. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **90**, 121–135
155. Rodriguez-Duarte, J., Galliussi, G., Dapuelto, R., Rossello, J., Malacrida, L., Kamaid, A., Schopfer, F. J., Escande, C., López, G. V., and Batthyány, C. (2019) A novel nitroalkene- α -tocopherol analogue inhibits inflammation and ameliorates atherosclerosis in Apo E knockout mice. *Br. J. Pharmacol.* 10.1111/bph.14561