



**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**ESTUDIO DEL EFECTO DE MEDIADORES LIPÍDICOS ASOCIADOS A LA
INFLAMACIÓN SOBRE LOS RECEPTORES LXR EN NEUTRÓFILOS Y
MONOCITOS HUMANOS**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN BIOLOGÍA POR**

**MARÍA EDITH REYES QUIROZ
SEVILLA 2013**



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE MEDICINA

D. FRANCISCO SOBRINO BENEYTO, Doctor en Química, Catedrático del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla,

INFORMA

Que D^a MARÍA EDITH REYES QUIROZ, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, el trabajo de investigación titulado: **“ESTUDIO DEL EFECTO DE MEDIADORES LIPÍDICOS ASOCIADOS A LA INFLAMACIÓN Y LOS RECEPTORES LXR EN NEUTRÓFILOS Y MONOCITOS HUMANOS”**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctora.

Sevilla, 14 de Octubre de 2013

Vº Bº Director

El interesado:

Fdo.:

Dr. D. FRANCISCO SOBRINO BENEYTO

Fdo.:

MARÍA EDITH REYES QUIROZ



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE MEDICINA

D. GONZALO ALBA JIMÉNEZ, Doctor en Biología, Profesor del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla,

INFORMA

Que D^a MARÍA EDITH REYES QUIROZ, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su codirección en el Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, el trabajo de investigación titulado: **“ESTUDIO DEL EFECTO DE MEDIADORES LIPÍDICOS ASOCIADOS A LA INFLAMACIÓN Y LOS RECEPTORES LXR EN NEUTRÓFILOS Y MONOCITOS HUMANOS”**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctora.

Sevilla, 14 de Octubre de 2013

Vº Bº Codirector

El interesado:

Fdo.:

Dr. D. GONZALO ALBA JIMÉNEZ

Fdo.:

MARÍA EDITH REYES QUIROZ



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE MEDICINA

D^a. CONSUELO SANTA-MARÍA, Doctora en Farmacia, Profesora Titular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla,

INFORMA

Que D^a MARÍA EDITH REYES QUIROZ, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su codirección en el Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, el trabajo de investigación titulado: **“ESTUDIO DEL EFECTO DE MEDIADORES LIPÍDICOS ASOCIADOS A LA INFLAMACIÓN Y LOS RECEPTORES LXR EN NEUTRÓFILOS Y MONOCITOS HUMANOS”**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctora.

Sevilla, 14 de Octubre de 2013

V^o B^o Codirectora

El interesado:

Fdo.:

Dra. D^a. CONSUELO SANTA-MARÍA

Fdo.:

MARÍA EDITH REYES QUIROZ

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco al profesor Francisco Sobrino Beneyto, por haber respondido el primer mensaje que le envié; fue una motivación para tomar la decisión de iniciar el camino que ha llevado a esta tesis. Gracias por haberme aceptado, integrado en su equipo, por sus valiosas enseñanzas que me han guiado por el camino de la investigación, por su paciencia, ayuda, críticas constructivas y dedicación diaria en la realización de este trabajo. También por sus consejos a nivel personal.

Gracias a Gonzalo sobre todo por su paciencia infinita al enseñarme las técnicas y despejarme las dudas a nivel científico, y por su valiosa amistad y consejos por lo que también agradezco a Isabel.

Gracias a Consuelo, por la dedicación a este proyecto, por su amistad y buenos momentos que nos hace pasar en su compañía.

Gracias a Margarita, Javier y Evelio por su amistad y por ser tan buenos compañeros. A Moisés por su colaboración continua en esta investigación. A todos ellos mi agradecimiento infinito por los momentos compartidos en los que me he sentido muy bien acompañada.

A mis amigas Silvia, Connie, Alzenira, Raquel, Isabel Bravo, Isney, Denisse, Jenniffer, Marina, Leyde, Valentina, Nayibe, Karmen, Luz Dary, Alejandra, Vicky, Irene, Leticia, Carmen y Martina, por su valiosa amistad y apoyo. Con vuestros consejos y compañía he superado circunstancias difíciles y he conseguido seguir adelante sin perder la sonrisa. Todas ellas han hecho el camino más fácil.

GRACIAS a mis niños Jhonny Alejandro, Germán Alexis, Joan David, Santiago y Johan Ricardo, por ser lo mejor de mi vida y mi motivación en todo momento para seguir adelante; aunque mi Johan se nos ha adelantado, siempre está presente en nuestras vidas.

GRACIAS a mis padres Hermes y Lucy, y a mis hermanos Germán y William a quienes siempre he sentido a mi lado y me han apoyado incondicionalmente en todas las

caminos emprendidos. A mi madre por sus oraciones, consejos, por ser el centro de nuestras vidas y por aceptar nuestra ausencia, y a mi padre por seguir nuestros pasos y darnos cada día su dedicación y cuidados. Gracias por enseñarnos los verdaderos valores con los cuales guiar nuestro camino. Les debemos todo.

GRACIAS a las familias Reyes, Quiroz y Carrascal, tíos, y primos, de quienes siempre he recibido su cariño, consejos y apoyo a lo largo del camino, a pesar de la distancia.

Y por último, gracias a los que sin estar, están, porque me han dado su cariño y amistad, y me han aportado enseñanza con sus propias experiencias.

RESUMEN DE LA TESIS de la doctoranda MARIA EDITH REYES QUIROZ

TÍTULO DEL PROYECTO: “ESTUDIO DEL EFECTO DE MEDIADORES LIPÍDICOS ASOCIADOS A LA INFLAMACIÓN SOBRE LOS RECEPTORES LXR EN NEUTRÓFILOS Y MONOCITOS HUMANOS”

El papel de los LXRs en la inducción de los programas transcripcionales que facilitan el transporte de colesterol está bien establecido. Aunque se ha informado que la activación de los LXRs por oxisteroles resulta en la producción específica de citoquinas pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno (ROS), los LXRs también muestran efectos antiinflamatorios en los macrófagos y en otras células inmunes, lo que aumenta el interés sobre las funciones complejas que los LXRs ejercen en la inflamación con el objetivo de abrir nuevas estrategias para el tratamiento de diferentes enfermedades inflamatorias crónicas tales como la artritis y la aterosclerosis. Aunque la mayoría de los estudios sobre los LXRs se han dedicado a los macrófagos y las células endoteliales, los neutrófilos humanos también juegan un papel importante en la patogénesis de la aterosclerosis, dada su capacidad para responder a oxisteroles exógenos y moléculas circulantes, especialmente bajo condiciones pro-inflamatorias. El efecto del estado inflamatorio en la expresión del LXR α no se ha estudiado en las células humanas y constituye el objetivo principal del presente trabajo. Cuando estos tipos celulares se estimulan con ligandos sintéticos, se activa la síntesis de ARNm de LXR con la transcripción de los genes diana de LXR α , ABCA1, ABCG1 y SREBP1c. Aunque por sí mismos no ejercen ningún efecto positivo o negativo sobre la expresión de ARNm del LXR se describe que 15d-PGJ₂, y también PAF y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), a bajas concentraciones, fueron capaces de inhibir la transcripción del mRNA del LXR y de algunos de sus genes diana inducida por su ligando de una manera similar a otras moléculas pro-inflamatorias modelo, tales como la IL-8, TNF α e IL-1 β . La inhibición de la expresión de ARNm de LXR α se correlacionó con la disminución de los niveles de la proteína LXR α .

Por otra parte, en presencia de moléculas pro-oxidantes y antioxidantes se observó que las ROS intracelulares están involucradas en la inhibición de la

síntesis de ARNm del LXR α , y de sus genes diana, ejercida por 15d-PGJ₂ y PAF en los neutrófilos tratados con TO901317. Cualquiera que sea la acción ejercida por los oxisteroles (es decir, pro- o anti-inflamatoria), los experimentos en este trabajo indican claramente que la transcripción del LXR α se deprime bajo condiciones oxidantes. Además, los resultados de este trabajo revelaron que el efecto inhibitorio de 15dPGJ₂, PAF y H₂O₂ podría estar mediado por el estado de fosforilación del LXR α en forma dependiente de la activación de las MAPK quinasas ERK1/2. Así mismo se describe que el PAF y el H₂O₂, exógeno, causan una regulación dual sobre los mecanismos oxidativos que inducen la fosforilación de la MAPK ERK1/2 y la activación de NF- κ B, y finalmente, sobre la expresión del LXR α y sus genes diana.

También se muestra evidencia de que, bajo condiciones pro-oxidantes, el tratamiento por TO901317 fue capaz de inhibir la actividad de migración, la producción de ROS y la liberación de IL-8 en los neutrófilos inducida por 15d-PGJ₂, indicando que el estrés oxidativo podría cambiar una función celular mediada por LXR α importante para la resolución de los procesos de inflamación.



**Í
N
D
I
C
E**

INTRODUCCIÓN	12
I. Células de la respuesta inmune innata.....	13
I.1. Neutrófilos.....	13
I. 2. Macrófagos.....	14
I. 3. Función de las neutrófilos y macrófagos en la aterosclerosis	14
II. La producción de radicales libres de oxígeno.....	15
III. Sistemas de defensa antioxidante	18
III.1. Sistema del glutathion.....	19
III.2. El sistema hemoxigenasa	19
IV. Rutas de señalización	20
IV.1. Las vías dependientes de proteínas quinasas activadas por mitógenos	21
IV.1.A. Activación de ERK MAPK.....	21
IV.1.B. Activación de p38 MAPK	22
IV.1.C. Activación de JNK MAPK.....	22
V. La reacción inflamatoria	23
VI. La 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J ₂	24
VI.1. Biosíntesis de las prostaglandinas y generación in vivo de la 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ - prostaglandina J ₂	24
VI.2. Efectos de la 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J ₂ dependientes de los receptores activados por la proliferación de peroxisomas (PPARs).....	25
VI.3. Efectos de la 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J ₂ independientes de los PPARs.....	28
VII. Factor activador de plaquetas (PAF).....	30
VII.1. Biosíntesis de las prostaglandinas y generación in vivo del PAF	30
VII.2. Señalización del PAF a través de su receptor.....	30
VIII. Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	33
IX. Receptores nucleares	36
IX.1. Los receptores LXR.....	36
IX.2. Estructura de los receptores nucleares	37

IX.3. Mecanismos de unión de los receptores nucleares	38
IX.4. Isoformas, distribución y ligandos.....	39
IX.5. Principales funciones del LXR	41
IX.5.A. LXR y el metabolismo del colesterol.....	41
IX.5.B. LXR y aterosclerosis	44
IX.5.C. LXRs, inmunidad innata e inflamación.....	45
OBJETIVOS	55
MATERIALES Y MÉTODOS	57
I. Reactivos	57
II. Normas éticas.....	58
III. Aislamiento de neutrófilos humanos	59
IV. Obtención de macrófagos humanos.....	60
V. Cuantificación del número de células y determinación de la viabilidad celular.....	61
V.1. Test de exclusión del azul tripán y cuantificación celular.....	61
V.2. Medida de la actividad de la lactato deshidrogenada (LDH)	61
VI. Incubación de células	62
VII. Medida de la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS)	62
VII.1. Análisis de la producción de ROS (luminol).....	62
VII.2. Análisis de la producción de ROS (hidroetidina).....	63
VII.3. Análisis de ROS/H ₂ O ₂ intracelular (DCFDA)	63
VIII. Obtención de proteínas celulares	64
VIII.1. Aislamiento de proteínas totales	64
VIII.2. Aislamiento de proteínas de membrana	65
VIII.3. Aislamiento de proteínas citosólicas y de núcleo.....	66
IX. Cuantificación de la concentración de proteínas	67
X. Análisis de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	68
X.1. Preparación de muestras.....	68
X.2. Inmunoprecipitación	68

X.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)	69
XI. Transferencia de proteínas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF).....	70
XII. Análisis de proteínas por inmunodetección	71
XII.1. Incubación de las membranas de PVDF con anticuerpos.....	71
XII.2. Revelado de bandas inmunoreactivas mediante luminol.....	72
XII.3. Eliminación de anticuerpos de una membrana (“stripping”).....	73
XII.4. Cuantificación de los niveles de proteína detectados	73
XIII. Análisis de expresión de ARN mensajeros (ARNm) por RT-PCR	74
XIII.1. Obtención del ARN celular total.....	74
XIII.2. Cuantificación de la concentración de ARN	75
XIII.3. Eliminación de contaminación ADN con ADNasa I	75
XIII.4. Transcripción inversa del ARN a ADN complementario (ADNc)	76
XIII.5. Amplificación del ADNc por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real	76
XIII.6. Cuantificación de la expresión génica a partir de la PCR a tiempo real	77
XIV. Ensayo de migración celular.....	78
XV. Salida de colesterol	78
XVI. Cuantificación de la liberación de IL-8 por ELISA.....	78
XVII. Detección de apoptosis celular	79
XIII. Análisis de proteínas por inmunocitoquímica.....	79
XIX. Análisis estadístico	80
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	82
CAPÍTULO 1. 15-desoxi- Δ 12,14 -prostaglandina J ₂ (15d-PGJ ₂) regula la expresión del receptor hepático X (LXR) α a través del estrés oxidativo en neutrófilos humanos	82
CAPÍTULO 2. El factor activador de plaquetas (PAF) regula la transcripción del receptor hepático X (LXR) α a través del estrés oxidativo en neutrófilos humanos	97
CAPÍTULO 3. Doble efecto del peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) sobre la transcripción del LXR α y sus genes diana en los neutrófilos humanos.	126

CONCLUSIONES	128
BIBLIOGRAFÍA.....	130
ABREVIATURAS	147

INTRODUCCIÓN

El sistema inmune consta de la acción coordinada entre la respuesta inmune innata y la adaptativa. La respuesta inmune innata consiste de la barrera epitelial, las células efectoras circulantes como los neutrófilos, monocitos (macrófagos), las células “natural killer” (NK) y las células dendríticas (CDs), (1), las citoquinas y la respuesta de fase aguda (sistema del complemento); es inespecífica y de vida corta. La respuesta inmune adaptativa está mediada por los linfocitos B, productores de anticuerpos, y los linfocitos T citotóxicos y ayudadores (2).

I. Células de la respuesta inmune innata

I.1. Neutrófilos

Los neutrófilos derivan de la médula ósea y son las primeras células respondedoras en la defensa del huésped contra patógenos invasores a los cuales destruye por mecanismos oxidativos y no oxidativos (3). Son las células blancas más abundantes en la sangre periférica del adulto sano, (4000-10000/mm³). Constituyen entre un 65 y 75% del total de los leucocitos sanguíneos.

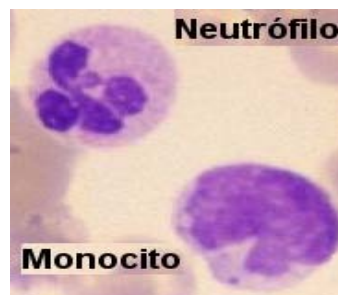


Figura 1. Visualización al microscopio óptico de un neutrófilo y un monocito.

En el torrente sanguíneo tienen una vida media de 8-20 horas (4) circulantes en la sangre; son capaces de migrar a los focos de inflamación en respuesta a factores atrayentes o quimiotácticos y allí llevan a cabo la fagocitosis de partículas extrañas. Morfológicamente, los neutrófilos tienen un diámetro de 10–20 μm y presentan un núcleo multilobulado, visible al microscopio óptico con tinción de Giemsa (Figura 1). Las funciones de los gránulos de los neutrófilos son importantes para potenciar la digestión y la actividad microbicida ya que interrumpen las superficies bacterianas aniónicas, haciendo a las bacterias más permeables y degradan a los factores de virulencia (5).

I.2. Macrófagos

Junto con los neutrófilos, los monocitos se encuentran circulando en el torrente circulatorio, y comparados con aquellos se encuentran en cifras muy inferiores, entre 500-1000/mm³ y tienen una vida mas larga, aproximadamente 24 horas. Por estímulos quimiotácticos y por medio de la interacción entre las moléculas de adhesión y los contraligandos en el endotelio vascular, comienzan a migrar entre las 24 y 48 horas del inicio de la inflamación aguda. Cuando los monocitos alcanzan el tejido extravascular se transforman en macrófagos, aumentan su tamaño, se alarga la vida media y tienen una capacidad mayor de fagocitosis y contenido de enzimas lisosomales que los monocitos (6). Los macrófagos se encuentran en la mayoría de los tejidos conjuntivos, en órganos como el hígado (células de Kupfer), bazo y ganglios linfáticos (histiocitos sinusoidales), sistema nervioso central (microglías) y pulmones (macrófagos alveolares) (6). Tienen un papel central en la homeostasis tisular por su capacidad microbiostática y microbicida actuando como filtros para microorganismos, células senescentes y células apoptóticas (7). También actúan como células presentadoras de antígeno y en respuesta a las citoquinas producidas de forma autocrina o por otros tipos celulares, secretan un amplio espectro de productos biológicamente activos como proteasas ácidas y neutras, citoquinas y quimoquinas, ROS y óxido nítrico (NO) y metabolitos del ácido araquidónico. El interferón estimula a los lisosomas de los macrófagos para que secreten hidrolasas ácidas (colesterol esterasa) y proteasa neutras (elastasas y colagenasas) que ayudan a proteger contra la entrada de virus, bacterias y parásitos (8).

I.3. Función de los neutrófilos y macrófagos en la aterosclerosis

Inicialmente, las células presentadoras de antígeno activan a los linfocitos. Estos proliferan y secretan IL-2, IL-4, IFN- γ y diversos factores quimiotácticos que inducen el reclutamiento y activación de neutrófilos en las fases tempranas y monocitos-macrófagos y linfocitos en las fases tardías. El endotelio alterado permite la entrada de células inflamatorias en la pared vascular y de lipoproteínas que se depositan en la íntima (9). En estas zonas, los neutrófilos y macrófagos, además de su función fagocítica, liberan al medio extracelular derivados de oxígeno altamente reactivos, enzimas almacenados en sus gránulos, prostaglandinas, leucotrienos y varias citoquinas que amplifican la respuesta inflamatoria y poseen un enorme potencial lesivo de los tejidos circundantes (10). La entrada de lipoproteínas LDL es un factor clave de la

aterogénesis. Cuando se oxidan, las LDL estimulan la expresión de las moléculas de adhesión y las proteínas quimioatrayentes, dañan las células endoteliales y son mitogénicas para los macrófagos. Estos captan las LDL oxidadas, se sobrecargan de lípidos (células espumosas) y cuando mueren los liberan formando depósitos dentro de la íntima que se transforman en los centros de las placas ateroscleróticas maduras (11).

II. Producción de radicales libres de oxígeno

El conjunto de ROS presente en la célula, qué especies están presentes y a qué concentración, es lo que se conoce como “estado rédox”, y el denominado “estrés oxidativo” ocurre cuando se produce una variación en dicho sistema rédox (12). Las especies reactivas del oxígeno o ROS (reactive oxygen species) sintetizadas por el neutrófilo y el macrófago son formas químicas derivadas del oxígeno molecular con gran capacidad para reaccionar con otras moléculas y estructuras de la célula y de naturaleza orgánica o inorgánica; incluyen iones de oxígeno, radicales libres, como superóxido (O_2^\bullet), Hidroxilo (HO^\bullet), Hidroperoxilo (HOO^\bullet), Alcoxilo (RO^\bullet) y Peroxilo (ROO^\bullet) y no radicales, como Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), Ácido hipocloroso ($HOCl$) y Singlete de oxígeno (1O_2). La naturaleza radical o no de la especie reside en si posee o no algún electrón desapareado independientemente de la carga, aunque en caso de poseer carga, se habla de radical iónico; este sería el caso del radical aniónico superóxido (O_2^\bullet) (13). Hay fuertes evidencias que nos sugieren que las ROS también juegan un importante papel en la regulación de señalización celular involucrados en la homeostasis, proliferación celular, diferenciación celular, inflamación y respuesta inmune (14). Si analizamos las características de los ROS, estos tienen importantes prerequisites para ser una molécula mensajera intracelular: son moléculas ubicuas, pequeñas, de fácil difusión y que pueden sintetizarse rápidamente y ser rápidamente eliminadas por varios sistemas enzimáticos, tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, y el sistema de la glutatión peroxidasa, permitiendo con ello, un control riguroso de sus concentraciones. Esto le confiere una especificidad espacial y temporal ideal para eventos de señalización (15). El radical hidroxilo es el más reactivo de las ROS y pueden reaccionar con moléculas dianas en las más inmediatas proximidades, esto puede iniciar una cadena de reacciones conduciendo a la peroxidación de lípidos y de proteínas. El O_2^\bullet es menos reactivo que el anterior y esto le permitiría difundir a mayor distancia en la célula antes de encontrarse y reaccionar con su apropiada diana. Pero el peróxido de hidrógeno, que no es propiamente un radical libre, es incluso menos

reactivo y por tanto con mayor vida media, además es totalmente permeable en las membranas plasmáticas, por lo que podría ser difundido al espacio extracelular de las células fagocíticas y difundir hacia otras células, por lo que la convierte en la especie reactiva de oxígeno ideal para los mecanismos de señalización paracrinos (16). Otra molécula muy importante para el endotelio es el peroxinitrito (OONO^-), un potente oxidante formado a partir del NO y el O_2^\bullet y que se ha relacionado con trastornos vasculares, enfermedades cardíacas, neurodegenerativas, diabetes y cáncer (17). El oxígeno molecular (O_2) a través de sucesivas ganancias de electrones y protones puede transformarse en radical aniónico superóxido (O_2^\bullet), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (HO^\bullet).

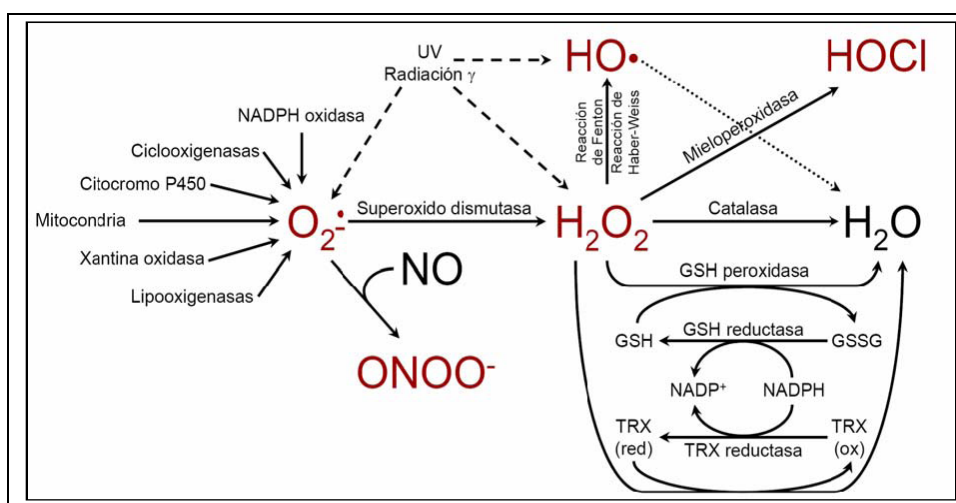


Figura 2. Reacciones químicas y enzimáticas generadoras de ROS y principales sistemas antioxidantes presentes en neutrófilos.

La formación de ROS (Figura 2) puede deberse a la propia actividad enzimática de la célula, a reacciones químicas o a efectos de la radiación. La superóxido dismutasa transforma el O_2^\bullet en O_2 y H_2O_2 y la catalasa desdobla el H_2O_2 en O_2 y H_2O . El ácido hipocloroso (HOCl) es producido por la mieloperoxidasa en neutrófilos activados. El O_2^\bullet puede interactuar con el óxido nítrico (NO) y formar peroxinitrito (OONO^-).

En los neutrófilos, la principal fuente de producción de ROS y concretamente de O_2^\bullet corresponde a los complejos enzimáticos NADPH oxidasa localizados en las membranas celulares (18). El complejo enzimático de la NADPH oxidasa está formado por dos proteínas de membrana, gp91phox o Nox2 y p22phox, y las subunidades citoplasmáticas reguladoras; p67phox, p47phox, p40phox y una GTPasa; Rac, una proteína G de las denominadas “pequeñas”, y que puede ser Rac1 o Rac2 (19). La

p47phox, funciona como proteína adaptadora-reguladora y aumenta unas 100 veces la unión de la p67phox a la oxidasa (20). El mecanismo de la subunidad p47phox consiste en acoplar la p67phox a la subunidad de p22phox del flavocitocromo b558 (21). La p47phox y la p67phox se encuentran en el citosol de células en reposo, formando un complejo con un tercer componente, la p40phox (22), el cual funciona como una proteína inhibidora. La p47phox y la p67phox pueden trasladarse a la membrana plasmática (23) y esto se correlaciona con la activación de la célula. En un sistema libre de células, la p47phox y la p67phox forman un complejo con el flavocitocromo b558 en una proporción 1:1:1 (24). Cuando se produce la señal de activación del complejo, las subunidades citoplasmáticas se unen a gp91phox/p22phox constituyendo una cadena de transporte electrónico capaz de transferir un electrón desde una molécula de NADPH a otra de O₂; como resultado se forma una molécula de O₂-• (25).

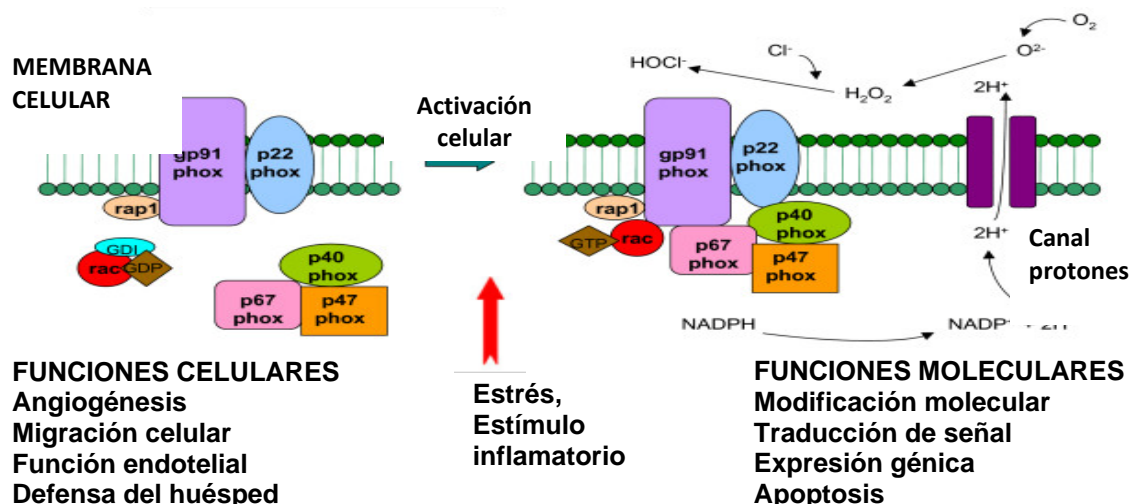


Figura 3. Principales componentes del complejo multienzimático de la NADPH oxidasa y funciones.

Además, también se producen especies reactivas de oxígeno en la mitocondria aproximadamente en un 1-2% del consumo total de oxígeno mitocondrial en condiciones normales (26). La cadena de transporte de electrones mitocondrial está formada por una serie de complejos: Complejo I o NADH-coenzima Q, Complejo II o succinato-coenzima Q, Complejo III o coenzima QH₂-citocromo c reductasa. Este sistema reduce el oxígeno molecular generando O₂^{-•}, el cual es transformado por la SOD mitocondrial en H₂O₂. El H₂O₂ generado puede difundir al citoplasma a través de la membrana mitocondrial (26). La xantina oxidasa es un enzima soluble que a partir de la

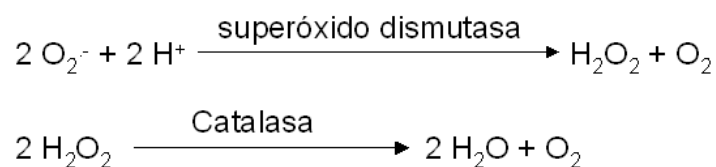
xantina produce ácido úrico, $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 . El sistema xantina/xantina oxidasa es utilizado para la producción de especies reactivas *in vitro* en estudios sobre el efecto de estos radicales en las células. Sin embargo, los conocimientos sobre la participación de este sistema y las especies reactivas de oxígeno que genera en la fisiopatología celular son escasos (27). Es interesante, que la actividad enzimática de esta proteína tiene la capacidad de inhibir la actividad de la óxido nítrico sintasa (28), y está relacionada con la regulación de la HO-1 en linfocitos humanos (29).

III. Sistemas de defensa antioxidante

En los organismos aeróbicos la generación continua de los ROS ocurre durante todos los procesos fisiológicos. Los ROS pueden oxidar ciertas biomoléculas, lo que puede llevar a una modificación en el funcionamiento de la célula y producir el daño implicado en la fisiopatología de una variedad de enfermedades (30). Las células, y especialmente las células fagocíticas, para protegerse de estos daños, disponen de diversos sistemas de defensa antioxidantes (31). Las moléculas antioxidantes (o más propiamente, reductoras) neutralizan el radical libre por medio de la donación de un electrón, y la cadena de reacciones termina porque los productos resultantes de la reacción redox son moléculas estables (32).



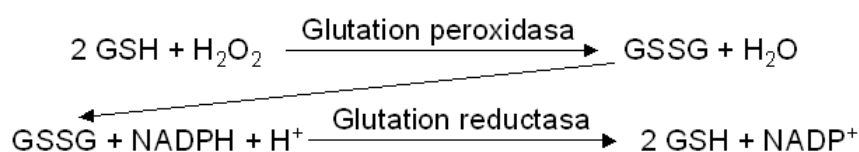
Este esquema muestra la reacción general de un antioxidante (AH) con un radical libre (ROO^{\cdot}) produciendo dos moléculas estables. En la naturaleza hay muchas moléculas con propiedades antioxidantes: vitamina E, vitamina C, N-Acetilcisteína. Otros sistemas enzimáticos con esa función antioxidante son: La superóxido dismutasa (SOD) que elimina el $O_2^{\cdot-}$, generando H_2O_2 ; la catalasa que dismuta la H_2O_2 ; el sistema del glutatión; y la hemoxigenasa (HO)-1.



Estos sistemas de defensa antioxidantes (o reductores) son activados en respuesta a los incrementos de la producción de ROS, y la expresión génica de alguno de los enzimas implicados es regulada a nivel transcripcional por el estrés oxidativo (31).

III.1. Sistema del glutation

El glutation (γ -Glu-Cys-Gly) es un tiol que está presente en casi todas las células del cuerpo a concentraciones del rango de milimolar (30). Es una molécula fundamental en el mantenimiento del balance redox a nivel intracelular. El sistema del glutation está compuesto por dos enzimas que controlan sus concentraciones. Estas enzimas son la glutation peroxidasa (Gpx) y la glutation reductasa (GR) (33). La Gpx es una enzima que cataliza la formación de glutation oxidado (GSSG) a partir del glutation reducido (GSH) durante la reducción del H_2O_2 . La GR puede regenerar la GSH a partir de la GSSG (Figura 2).



El GSH tiene múltiples papeles como un agente antioxidante. Funciona como un limpiador de los ROS, tales como el radical hidroxilo, el O_2^- , el óxido nítrico o los peroxinitritos. También el GSH es un co-sustrato de la detoxificación de los peróxidos por la Gpx, y de metabolitos tóxicos por la glutation-S-transferasa (34). Es muy conocida la importancia que tiene este sistema en la regulación del estado redox de la célula y niveles disminuidos de este sistema antioxidante son indicadores de algunas enfermedades como es el caso de la artritis reumatoide (35).

III.2. El sistema hemoxigenasa

La HO es un enzima antioxidante que añade una molécula de oxígeno en el anillo de la porfirina del grupo hemo produciendo la degradación de este grupo. El resultado es la liberación de cantidades equimolares de monóxido de carbono (CO), biliverdina y hierro libre (36) (Figura 3). La biliverdina es rápidamente metabolizada a bilirrubina por la biliverdina reductasa y el hierro es rápidamente secuestrado por la ferritina (Figura 4). Por la formación de CO, bilirrubina y ferritina, la HO juega un papel crucial en la defensa contra una gran variedad de situaciones que conllevan al aumento del estrés oxidativo (37). Hasta la fecha, se han identificado tres isoformas de la HO reguladas por distintos genes: HO-1, HO-2 y HO-3. Estas isoformas se diferencian por su distribución tisular y por presentar algunas características específicas en su expresión y/o actividad.

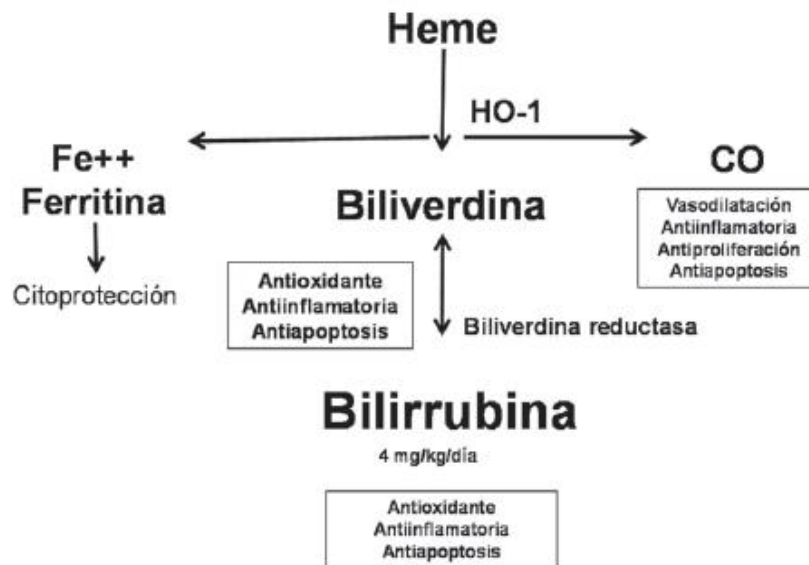


Figura: 4. Metabolismo del grupo hemo por la hemoxigenasa (HO).

La HO-1 es una proteína inducible de 32-kDa que está distribuida ubicuamente. En condiciones fisiológicas las células presentan niveles indetectables de HO-1 pero la presencia de su sustrato (grupo hemo) o de numerosos estímulos de estrés (ej. shock térmico, luz ultravioleta, metales pesados, lipopolisacárido, NO, H₂O₂) inducen fuertemente su expresión (38). En contraste, la HO-2 tiene un peso molecular de 36-kDa, se expresa de forma constitutiva, y está presente en altas concentraciones en el cerebro y los testículos. Recientemente se ha descubierto otra isoforma denominada HO-3. Ésta es una proteína de 33-kDa semejante a la HO-2 pero con una actividad catalítica inferior. Los genes humanos de la HO-1 y la HO-2 han sido aislados e identificados en los cromosomas 22q12 y 16p13.3, respectivamente (39). La HO-3 no está presente en humanos y solo ha sido aislada en ratas. Parece ser que es una versión que procede de una maduración diferente a partir del gen de la HO-2 (40).

IV. Rutas de señalización

El desequilibrio en la homeostasis del sistema rédox puede deberse a una sobreproducción de ROS o por una deficiencia en los sistemas antioxidantes. Si este desequilibrio es importante, las ROS pueden inducir la muerte celular por activación de la apoptosis (41) o incluso, si se trata de un desajuste masivo, por necrosis (42). Sin embargo, si el desequilibrio no alcanza un nivel potencialmente letal, el estrés oxidativo produce variaciones en la fisiología celular al actuar sobre las vías de traducción de señales (43). En estos casos, las ROS llegan a comportarse como auténticos segundos

mensajeros intracelulares (27). JNK y nuevamente p38 MAPK son activadas por el H₂O₂ producido en el tejido cardiaco tras sufrir isquemia/reperfusión (12).

IV.1. Las vías dependientes de proteínas quinasas activadas por mitógenos.

En mamíferos, el término general MAPK (del inglés *mitogen-activated protein kinase*) comprende a una superfamilia de proteínas quinasas con especificidad dual serina/treonina-quinasa que pueden ser activadas por una gran variedad de estímulos. Su activación depende de la señal iniciada por receptores de factores de crecimiento fosforilados en tirosina, de receptores de hormonas, de receptores asociados a proteínas G o receptores de citoquinas inflamatorias. Además pueden ser activadas por condiciones de estrés del entorno, como choque osmótico, irradiación o lesiones en el ADN. La activación de las MAPKs en respuesta a estos estímulos controla la expresión de genes, el metabolismo celular y funciones del citoesqueleto, contribuyendo a la regulación de procesos celulares tan complejos como la migración, mitogénesis, la diferenciación o la supervivencia celular. Estas MAPKs han sido divididas en tres grandes grupos en función de los estímulos que inducen su activación. Así por ejemplo, los factores de crecimiento o estímulos mitogénicos promueven principalmente la activación de las quinasas ERK (del inglés, *extracellular signal-regulated kinase*); mientras que, estímulos de estrés celular inducen la activación de otras dos subfamilias, las p38 MAPK y las JNK/SAPK (*c-jun NH2-terminal kinase o stress-activated MAP Kinase*) (44).

La activación de cada familia de MAPK se produce en forma de cascada (45). Dicha cascada está formada por tres módulos con actividad quinasa, donde los miembros del módulo superior fosforilan y activan a los miembros del módulo inferior. La especificidad de la respuesta de la MAPK viene dada por la activación específica de determinados miembros de cada uno de estos módulos. De esta manera, el tercer módulo, correspondiente a las familias ERK, p38 y JNK serán fosforiladas y activadas por un segundo módulo de MAPK quinasas (MAPKKs) (46).

IV.1. A. Activación de ERK MAPK.

La cascada de activación de ERK es la que ha sido más extensamente estudiada, ya que se activa bajo el estímulo de numerosos agentes mitogénicos. ERK-1 y ERK-2, conocidas también como p-44/p-42 MAPK, son los primeros miembros que se conocieron de esta subfamilia. Actualmente se sabe que existen al menos 5 miembros más (ERK3-ERK-8) (47). Una vez activas, las ERK 1/2 son capaces de fosforilar y regular numerosas proteínas, entre las que se encuentran las quinasas RsK, MNK 1/2,

MAPKAP-K2 y-3, proteínas citosólicas como la PLA₂ (fosfolipasa A₂), el coactivador SRC-1 o los factores de transcripción C-Fos, C-Jun, ATF-2 o ELK-1 (48). El H₂O₂ y el O₂-• promueven el crecimiento de células musculares lisas vasculares activando las MAPKs p42/44 ERK (49) (Figura 5).

IV.1. B. Activación de p38 MAPK.

Este subgrupo de las MAPK comprende a cuatro miembros de Ser/Thr quinasas de 38 KDa, de ahí su nombre. Estas isoformas son conocidas como p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ . Se activan fuertemente por condiciones de estrés en el entorno celular y/o citoquinas inflamatorias, aunque también se ha descrito su activación por insulina o factores de crecimiento. Por último, los principales sustratos de las p38 MAPK son las quinasas MAPKAP-K2 y-3, PRAK, MNK 1/2 y MSK y los factores de transcripción ELK-1, NFAT2 y ATF-2 (48). También, el H₂O₂ y el O₂-• promueven el crecimiento de células musculares lisas vasculares activando las MAPKs p38 (49) (figura 5).

IV.1. C. Activación de JNK MAPK.

Las quinasas JNK, también conocidas como SAPK, representan el tercer grupo de MAPKs que han sido identificadas en mamíferos. Existen unas diez isoformas diferentes de JNK, de entre 46-54 KDa. Entre los sustratos de JNK se encuentran proteínas que regulan los procesos de apoptosis y muerte celular, como p53 y Bcl-2 y factores de transcripción como ATF-2, ELK-1 y C-Jun (Figura 5) (50).

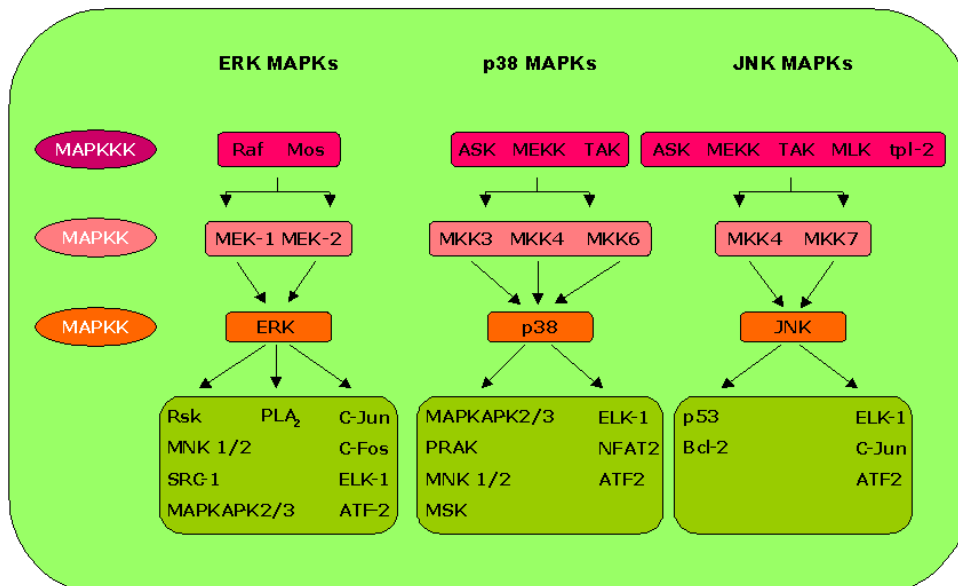


Figura: 5. Cascada de activación de las MAPK.

V. La reacción inflamatoria

La respuesta inmunitaria integrada frente a elementos ajenos o propios (antígenos) consta de diversos componentes. Algunos de estos componentes muestran una especificidad única para el antígeno estimulador particular, y representan la respuesta inmunitaria específica o adaptativa, mientras que otros reconocen características de patógenos y comprenden la respuesta inmunitaria no específica o innata. Esta representa la primera línea de respuesta, y cuando está activada se asume como una respuesta inflamatoria cuyo objetivo es limitar y después reparar el daño causado al tejido por cualquier agente lesivo. Esto involucra la interacción de la microvasculatura, las células sanguíneas circulantes, otras células hísticas y sus productos de secreción (51). En estas zonas, los neutrófilos y macrófagos activados, además de su función fagocítica, liberan al medio extracelular derivados de oxígeno altamente reactivos, enzimas almacenados en sus gránulos (lisozima), mediadores lipídicos como las prostaglandinas y el factor activador de plaquetas (PAF), leucotrienos y varias citoquinas (TNF- α , IL-1, IL-12), que amplifican la respuesta inflamatoria, pero poseen un enorme potencial lesivo de los tejidos circundantes (51). Las células endoteliales también participan en la respuesta inflamatoria mediante la expresión en su superficie de moléculas reconocidas por los leucocitos que facilitan su extravasación del torrente sanguíneo a las zonas de inflamación (9). El estrés oxidativo, la inflamación y la hipertensión participan en un círculo interactivo, por el cual, cada uno de los tres factores puede reclutar y amplificar al otro (figura 6). Este ciclo tiene un crucial papel en la patogénesis y el mantenimiento de la hipertensión y sus complicaciones renales y cardiovasculares (52). Normalmente una respuesta se inicia por la presencia de un antígeno y aunque hasta la fecha no se ha identificado ningún antígeno específico capaz de iniciar la aterogénesis, podría existir una similitud entre éste y patógenos exógenos o moléculas modificadas generadas por especies de oxígeno reactivo (10).

Por su potencial efecto lesivo la inflamación es un proceso cuya regulación es fundamental. Uno de los puntos más importantes de esta regulación es la inactivación de los macrófagos y de los neutrófilos a través de la producción de citoquinas anti-inflamatorias tales como la IL-10, y la inhibición de la transcripción de algunos genes pro-inflamatorios como, NOS2, cicloxigenasa (COX2) y el TNF (53).

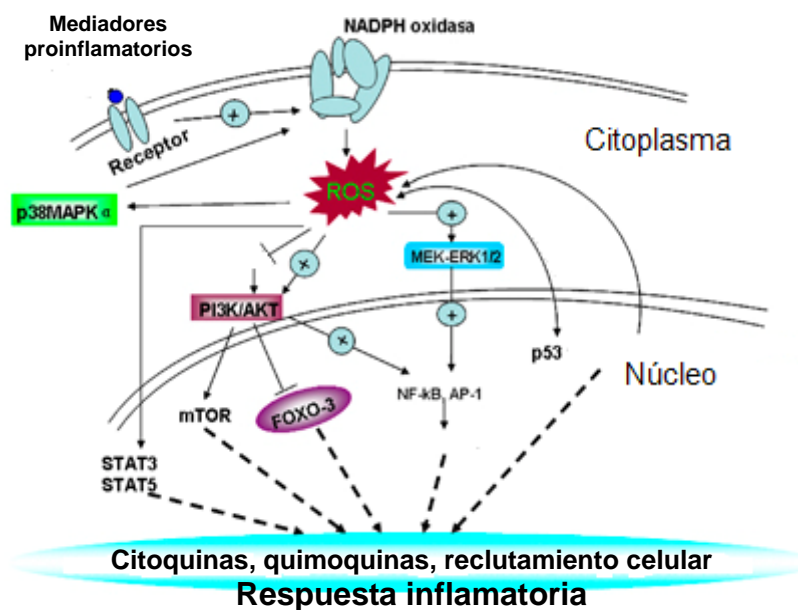


Figura: 6. Estrés oxidativo en la inflamación.

Dado su potencial destructivo, la protección no es absoluta, y en ocasiones se producen, bien por agentes infecciosos o bien por otros mecanismos, algunos fenómenos inflamatorios que son el origen de numerosas patologías (54).

VI. La 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂)

Las prostaglandinas (PGs) son una familia de moléculas biológicamente activas que realizan diversas funciones específicas dependiendo del tipo y de la célula diana. Dentro de esta familia, las PGs de la serie A y de la serie J, denominadas ciclopentenonas, poseen un grupo carbonílico α , β -insaturado en la estructura de su anillo ciclopentano. Debido a este 15d-PGJ₂ puede interactuar fácilmente con nucleófilos celulares críticos, tales como grupos tiol de las cisteínas en las proteínas. A diferencia de otras PGs cuyo mecanismo de acción está basado en la interacción con receptores de PGs unidos a proteínas G, las ciclopentenonas pueden actuar sobre otras dianas celulares específicas, como moléculas de señalización y factores de transcripción, para inducir sus respuestas biológicas (55).

VI.1. Biosíntesis de las prostaglandinas y generación in vivo de la 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂

La síntesis de la 15d-PGJ₂ comienza con la secuencial acción de tres clases de enzimas (Figura 7). La generación del ácido araquidónico (AA) (ácido 5, 8, 11, 14-

eicosatetraenoico) por fosfolipasas A₂ regula inicialmente la síntesis de todos los PGs (56). Sin embargo, los niveles netos de producción de PG son determinadas por la expresión y la actividad de las ciclooxigenasas (COX). COX-1 y COX-2 (también conocidas como PGH sintasa 1 y 2) son proteínas de membrana relacionadas localizadas en la cara interna de la envoltura nuclear y las bicapas del retículo endoplásmico. Estas enzimas bifuncionales primero convierten el AA en el PGG₂ intermedio (ciclooxigenación), a continuación, reducen la PGG₂ por peroxidación para generar PGH₂ (57). PGH₂ se convierte en prostanoïdes estables por una variedad de sintasas terminales específicas. Los genes que codifican las enzimas que convierten PGH₂ a cada uno de las diversas PG se han clonado y caracterizado (58). Sin embargo, ninguna sintasa específica de 15d-PGJ₂ ha sido identificada. Más bien, 15d-PGJ₂ es un derivado de PGD₂, y su síntesis depende inicialmente de la maquinaria enzimática para la generación de PGD₂ (59). PGD₂ se forma en abundancia en varios tejidos después de un sencillo reordenamiento no oxidativo, principalmente en los mastocitos y en el cerebro. Dos PGD₂ sintasas (PGDS) distintas son expresadas selectivamente en diferentes tipos de células. PGDS hematopoyética (H-PGDS) es una proteína citosólica encontrada abundantemente en mastocitos (60). IgE y otros estímulos inducen la producción de PGD₂ junto con histamina y otros mediadores (61). Una teoría inicial para la síntesis de la PGJ₂ humana sugirió que es catalizada por la albúmina sérica en la transformación in vitro de PGD₂ en sus productos de deshidratación (62). Sin embargo, Shibata et al. (63) han cuestionado este modelo. En su lugar, sugieren que la PGD₂ se convierte inicialmente a los productos de la deshidratación PGJ₂ y 15d-PGJ₂ en una manera dependiente de albumina. Posteriormente, 15d-PGJ₂ y D12-PGJ₂ se generan a partir de PGJ₂ a través de reacciones dependientes e independientes de albúmina respectivamente (Figura 7).

VI.2. Efectos de la 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂ dependientes de los receptores activados por la proliferación de peroxisomas (PPARs)

Los PPARs pertenecen a una superfamilia de receptores de hormonas nucleares. Actualmente se han descrito tres isoformas diferentes PPAR α (NR1C1), PPAR δ (NR1C2) y PPAR γ (NR1C3). El PPAR α es principalmente expresado en tejidos con alto nivel de metabolismo de ácidos grasos como hígado, corazón, riñón, y músculo esquelético. PPAR δ es expresado de forma ubicua y el PPAR γ tiene dos variantes:

PPAR γ 1, expresado en varios tipos celulares, entre los que se encuentran ~~los~~ células vasculares y células de la sangre, como los macrófagos, los neutrófilos y los linfocitos.

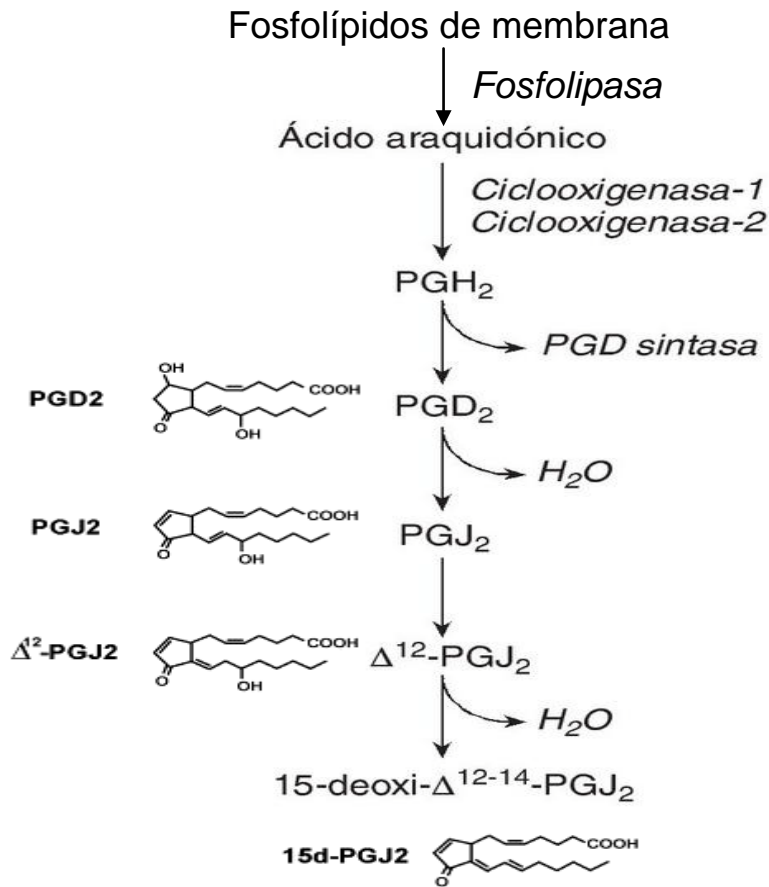


Figura 7. Síntesis de la 15d-Prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂)

Mientras que PPAR γ 2 es exclusivamente expresado en adipocitos (64). La activación de los PPARs es dependiente de la presencia de co-activadores y co-represores (Figura 8). El co-represor se une a los PPARs en su estado no unido al ligando y evitan su unión con el co-activador. Los co-activadores poseen actividad acetilasa de histonas para iniciar la transcripción (Figura 8) (65). Los PPARs son activados por ligandos naturales, ácidos grasos de cadena larga y eicosanoides entre otros, los cuales muestran una ligera especificidad hacia las diferentes isoformas. Uno de los agonistas más potentes de los PPAR es la 15dPGJ₂ (Figura 8). La mayoría de sus efectos los hace a través de este receptor nuclear. Cuando la 15dPGJ₂ se une a los PPARs se produce un cambio conformacional en el receptor reduciendo su afinidad por el co-represor y permitiendo que se una el co-activador (66). Los PPARs forman un heterodímero con el receptor del ácido 9-*cis* retinoico (RXR) el cual se une a los elementos de respuesta de los proliferadores de peroxisoma (PPREs) que se encuentran

en la región del promotor de sus genes diana, y por consiguiente, incrementan la transcripción de genes de manera dependiente de ligando (65). La mayoría de los genes cuya expresión es inhibida por los PPARs son genes involucrados en la inflamación por lo que esta vía le otorga a los PPARs propiedades anti-inflamatorias (Figura 8) (65). Muchos de los efectos biológicos inducidos por 15d-PGJ₂ implican factores de transcripción redox. PPAR γ es capaz de interferir en la vía del SMAD a través de una interacción directa (67). Otras acciones anti-inflamatorias de la 15d-PGJ₂ es la atenuación de la vía IKK-NF- κ B por una modificación de los residuos de serina (68), y la inhibición de la activación de la COX-2 y NOS2, o la producción de las PGE2 (69). Por co-inmunoprecipitación se mostró que PPAR α interacciona directamente con la subunidad p65 de la NF- κ B en H9c2 (70), con la consiguiente disminución de la expresión de los genes pro-inflamatorios. Además, se ha comprobado que el PPAR α es capaz de incrementar la expresión de I κ B α , el inhibidor natural del NF- κ B (71). PPAR α y PPAR γ son también capaces de suprimir la actividad transcripcional de AP -1 en diferentes tipos celulares (67). Sin embargo, la propiedad anti-inflamatoria de la 15d-PGJ₂ sigue siendo motivo de controversia, dado a que hay evidencia experimental de que 15d-PGJ₂ también puede inducir la síntesis de mediadores pro-inflamatorios como la fosfolipasa A tipo II (72) y las células epiteliales mamarias (73).

Por otra parte, se ha demostrado que en los linfocitos T humanos estimulados, 15d-PGJ₂ promueve un aumento significativo de la producción de la interleucina-8 (IL-8) a través de la activación de las vías de señalización dependientes de las MAP quinasas y de NF- κ B (74) y que 15d-PGJ₂ también induce la expresión de IL-8 en células endoteliales humanas (75). También se ha informado que 15d-PGJ₂ inhibe la vía del STAT inhibiendo de esta forma la producción de IL6 e IL10 (76). Además, se ha demostrado que esta prostaglandina, en contraste con los informes en macrófagos y otros tipos de células, actúa como un potente activador de eosinófilos por inducción de la movilización Ca²⁺, la polimerización de actina y la expresión de CD11b (77). Además, los datos similares han sido informados por nuestro grupo en linfocitos humanos (29) que están también en línea con las recientes observaciones que en los neutrófilos humanos y células leucémicas Jurkat la producción de ROS se potencia en respuesta al tratamiento con 15d-PGJ₂ (78).

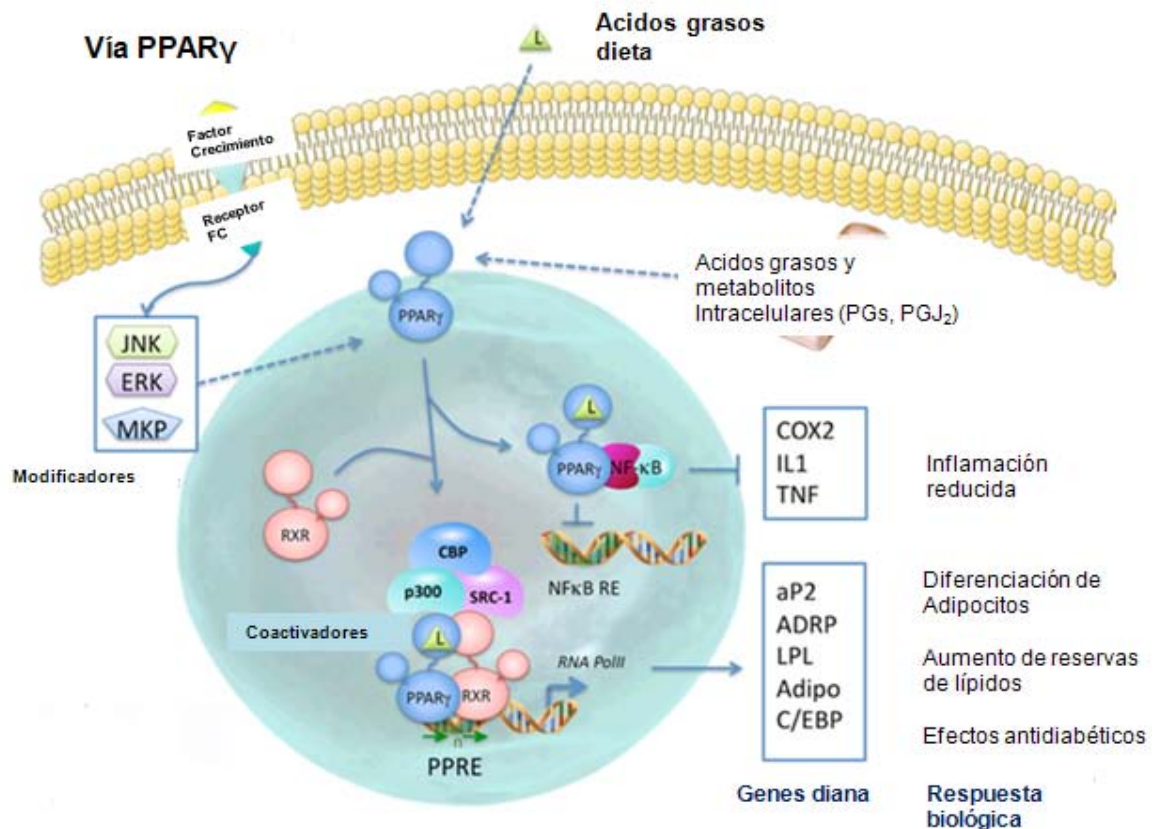


Figura 8. 15d-PGJ₂ es un ligando endógeno del receptor activado proliferador de peroxisomas (PPAR)- γ .

VI.3. Efectos de la 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂ independientes de los PPARs

Como se ha descrito anteriormente algunos efectos producidos por la 15dPGJ₂ son independientes de los PPARs (79). Así por ejemplo, se ha demostrado que la 15dPGJ₂, entre otros efectos produce la disminución de la producción de citoquinas y de la expresión de genes proinflamatorios en macrófagos (80), la inhibición de la adhesión celular y el estrés oxidativo en neutrófilos, la inhibición de la expresión de NO-sintetasa inducible en células de la microglía (79) e induce la apoptosis en neutrófilos, eosinófilos, células endoteliales y células dendríticas (81). Asimismo, algunas investigaciones han demostrado que la 15dPGJ₂ induce respuestas funcionales en células que no expresan el PPAR- γ (82). Estos resultados sugieren que la 15dPGJ₂ ejerce muchos de sus efectos a través de otros mecanismos de acción adicionales, que son independientes de la activación de los PPARs. Diversos autores han aportado evidencias de que el grupo carbonílico α , β -insaturado de su anillo ciclopentano está implicado en esos efectos. Así, demuestran que otras PGs ciclopentenonas, que no actúan a través de ninguno de los PPARs, imitan algunos efectos de la 15dPGJ₂ (83). Mediadores intracelulares tan diversos como los ROS, las MAPKs y el factor de transcripción NF- κ B, han sido relacionados de algún modo con estos nuevos mecanismos de acción (84). Sin embargo,

las dianas intracelulares precisas y los sistemas de señalización intracelular que regulan los efectos de la 15dPGJ₂ independientes de PPARs aún son desconocidos.

VII. Factor activador de plaquetas (PAF)

Platelet activating factor (PAF) (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) (85) es un fosfolípido proinflamatorio que media procesos fisiológicos y patológicos tan diversos como la activación celular, reorganización citoesquelética, activación intracelular, apoptosis, angiogénesis y reproducción (86).

VII.1. Biosíntesis del PAF y generación in vivo

En general, PAF es producido por una variedad de células, incluyendo neutrófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos y células endoteliales vasculares (87). Hay dos vías metabólicas incluidas en la biosíntesis del PAF, la vía de remodelación (A) y la síntesis de novo (B).

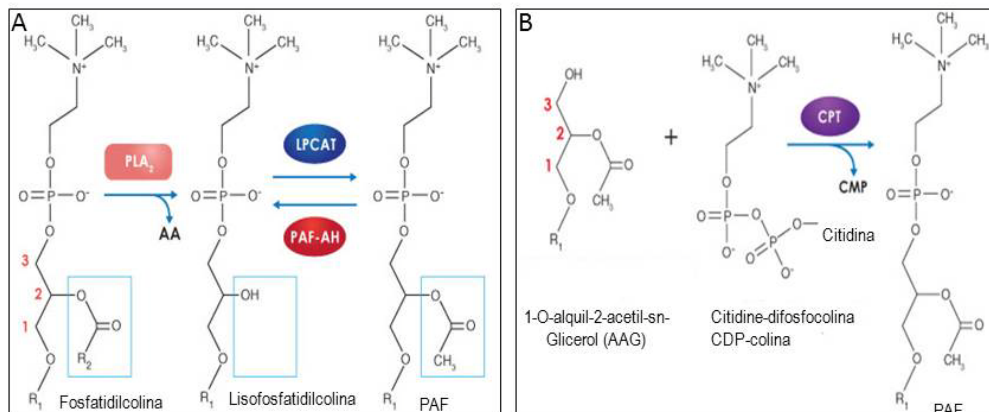


Figura 9. Síntesis enzimática del PAF.

En la vía de remodelación, el ácido graso es removido de la posición sn-2 del esqueleto tricarbonado (números en rojo, Figura 9A) de un fosfolípido, generalmente fosfatidilcolina (PC) por la fosfolipasa A2 (PLA₂), para producir el intermediario lisofosfatidilcolina (LPC). Luego, un grupo acetil se une por la acción de una acetiltransferasa (LPCAT) para producir PAF. PAF también se sintetiza de *novo* a partir de 1-O-alkil-2-acetil-sn-glicerol (AAG) (Figura 9B). Fosfocolina, del citidinefosfocolina (CDP-colina), se adiciona al sitio sn-3 sobre AAG por la enzima colinofosfotransferasa (CPT) para producir PAF (88).

VII.2. Señalización del PAF a través de su receptor (PAFR)

Después de la activación de los receptores del PAF por PAF y lípidos similares al PAF (Ox-PL), se inducen diversos efectos bioquímicos incluyendo las respuesta

trombóticas, y en neutrófilos y monocitos la polarización, el aumento de la movilidad, la liberación de enzimas granulares y la distribución de los ligandos de superficie que son importantes para la inflamación aguda. Específicamente, PAF induce la activación de las fosfolipasas C (PLC) y fosfolipasa A2 (PLA2), lo que lleva a la hidrólisis del fosfoinositol y a la liberación del ácido araquidónico, respectivamente; el aumento de la concentración del calcio citosólico; la producción de diacilglicerol que activa a la proteína quinasa C (PKC) (89); la fosforilación de la proteína tirosina de numerosas proteínas celulares en neutrófilos (90) y la expresión de proto-oncogenes (91).

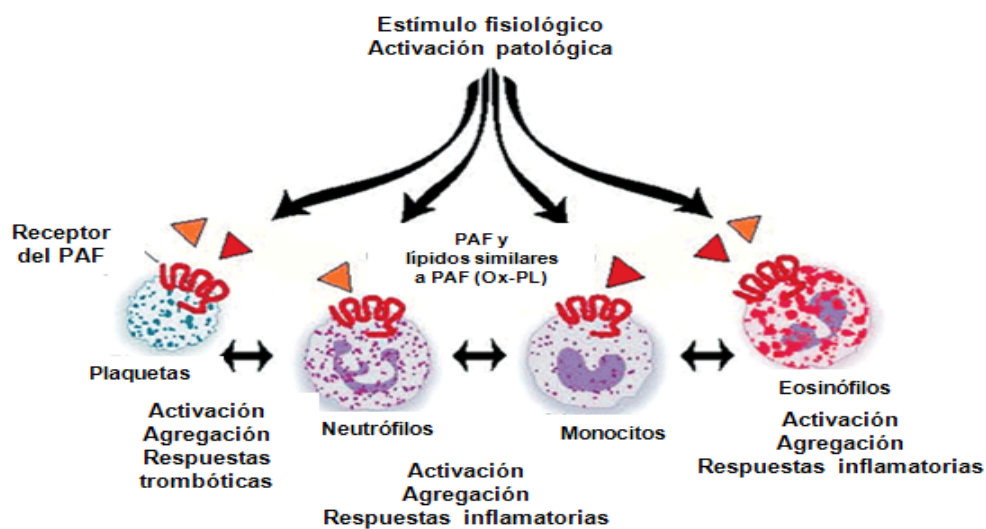


Figura 10. El sistema de señalización del PAF media las respuestas de activación en inflamación y trombosis.

PAF induce reacciones inflamatorias a través de la activación del factor nuclear kappaB (NF-kappaB) (92) y también media la síntesis y liberación de otros mediadores que agravan el grado de inflamación. Sin embargo, sus mecanismos para inducir la respuesta inflamatoria no se ha aclarado completamente (93). El sistema de señalización del PAF relaciona las respuestas de activación en inflamación y trombosis (Figura 10) y es un mediador inflamatorio que juega un papel crucial en la iniciación de las lesiones ateroscleróticas (94).

Bajo condiciones fisiológicas normales, PAF se expresa mínimamente, pero en condiciones particulares, tales como estrés oxidativo, varios tipos celulares entre ellos neutrófilos y monocitos, liberan cantidades significantes de PAF (95). PAF contribuye a aumentar la permeabilidad del endotelio, induce la liberación de especies activas de oxígeno, contribuye a la oxidación de LDL (Ox-LDL) y éstos a su vez, también inducen la producción de PAF. Además, se ha demostrado que PAF puede activar proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) (96) e inducir la fosforilación inicial de la

tirosina de la quinasa de adhesión focal en células endoteliales (97). En neutrófilos humanos, PAF activa la MAPK-3 (activador de la MAPK p38) (98).

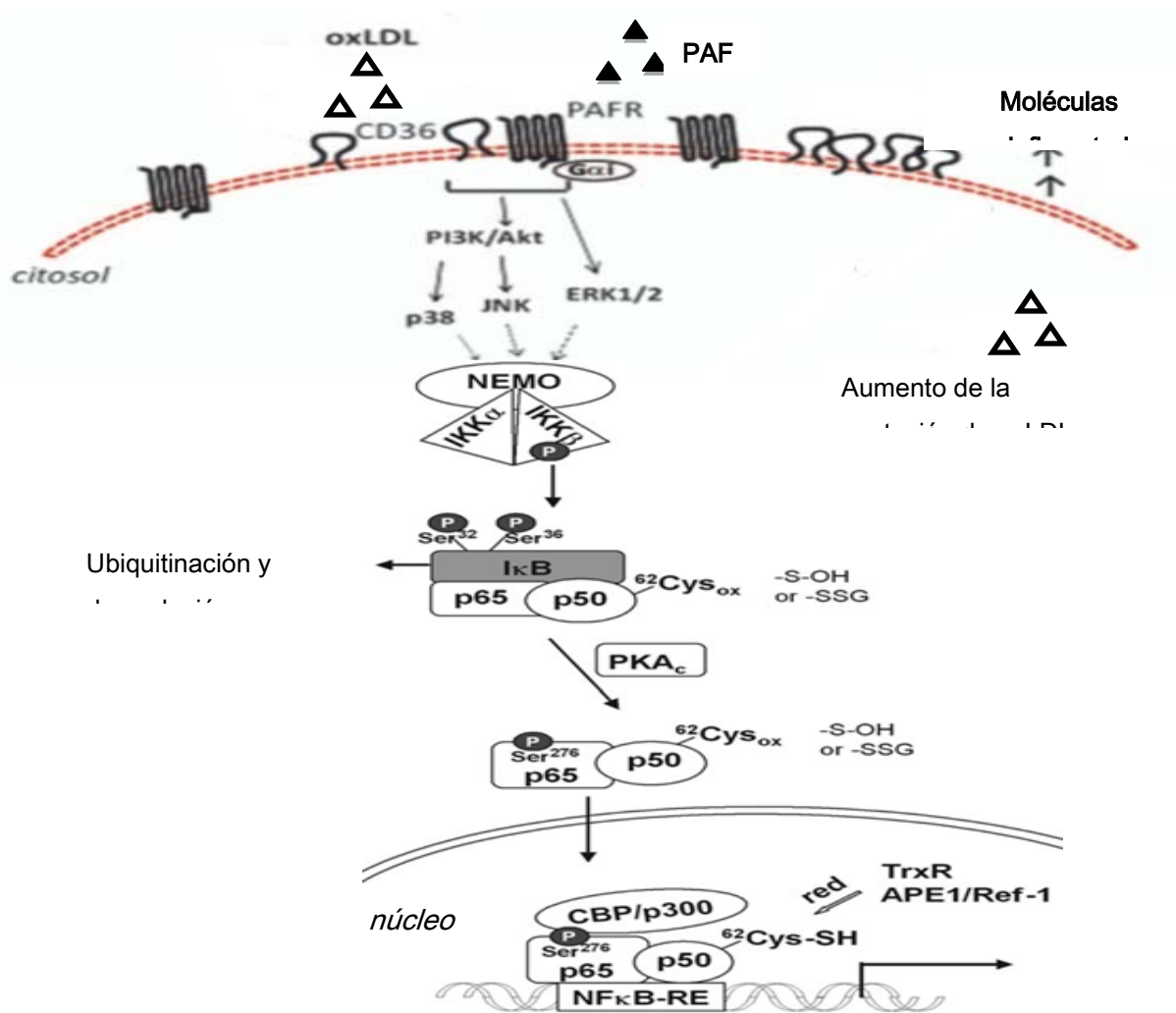


Figura 11. PAF activa la vía de señalización de las quinasas activadas por mitógeno (MAPKs).

La mayoría de las señales fisiológicas y patológicas para la activación de NFκB depende de la fosforilación de las proteínas kB controlada por la IκB quinasa (IKK) lo que produce su degradación mediada por ubiquitinación y la subsecuente liberación de NFκB que entra al núcleo y regula la transcripción de genes diana como las citoquinas pro-inflamatorias (99). IKKb fosforila a IKB en las serinas (Ser) 32 y 36 llevando a la ubiquitinación y degradación de IKB. p65/p50 se fosforilan por la subunidad catalítica de la proteína quinasa A (PKAc) en la Ser276 en p65 y es traslocada al núcleo. Allí se une junto con los coactivadores CBP y p300 al elemento de respuesta de NFκB en los promotores de los genes diana. Para la unión al ADN, la cysteína 62 en p50, la cual se

puede oxidar a ácido sulfénico formando un disulfuro mezclado con GSH en el citosol, ha de ser reducido en el núcleo por el sistema Trx/TrxR o Grx o por la enzima de reparación de excisión de bases Factor 1 redox endonucleasa apirimidínica (APE1/Ref-1) (Figura 11). La oxidación y reducción de las proteínas tiol es uno de los principales mecanismos por los cuales los oxidantes reactivos se integran en las vías celulares de la traducción de señal (100). PAF induce la reducción tanto de los niveles de tiol totales como del ratio GSH/GSSG. Esto indica que el PAF regula el estado redox en una vía que lleva a las condiciones de estrés oxidativo a corto plazo. Los tioles intracelulares (u oxidantes) pueden regular la activación de **NF- κ B** en uno o más puntos en la vía de transducción de señal (101).

La activación celular causada por el sistema de señalización del PAF es regulada por varios mecanismos que incluyen una vía sintética controlada, la regulación de la expresión del receptor del PAF sobre las células diana específicas y la activación yuxtacrina de las células diana por el PAF asociado a la membrana (regulación espacial de señalización). Además, la síntesis del PAF es fuertemente regulado por una familia de fosfolipasas A2 extracelulares denominadas PAF acetil hidrolasas (PAF-AH), presentes constitutivamente en la sangre bajo condiciones basales. PAF-AH controlan y terminan la señalización por degradación del PAF y de lípidos similares a PAF (Ox-PL), con lo cual determinan sus concentraciones y su vida media, y regulan la unión al receptor del PAF (88). En los neutrófilos, el receptor del PAF también es regulado por la proteína quinasa C (102). Las características moleculares y bioquímicas de la cascada de señalización del PAF y sus papeles conocidos en la salud y la enfermedad se han revisado ampliamente (103).

VIII. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

El peróxido de hidrógeno se puede generar en respuesta a varios estímulos, incluyendo citoquinas y factores de crecimiento y está incluido en los procesos biológicos de regulación tan diversos como la activación celular inmune y la remodelación vascular en mamíferos (104). H₂O₂ es un oxidante que puede, si está presente en concentraciones suficientemente altas, oxidar el suficiente glutatión celular, ya sea directamente o indirectamente, para alterar el potencial redox global de la célula. Tales concentraciones altas de H₂O₂ también podrían dañar las proteínas, los lípidos, y los componentes de ácido nucleico de las células. Esta primera situación se denomina estrés oxidativo y es claramente importante durante eventos raros en la vida de las

células, como la muerte celular secundaria a la lesión por isquemia-reperfusión (105). Además, es posible, que el H_2O_2 a bajas concentraciones, se difunda en las células y reaccionen rápida y específicamente, con un número limitado de objetivos, antes de ser reducido por los mecanismos de defensa antioxidantes de las células. Estos objetivos específicos pueden entonces transmitir la información relativa a la presencia de H_2O_2 a otras proteínas en la célula. Esta segunda situación requiere que los objetivos reaccionen con H_2O_2 a tasas muy superiores a aquella con la que glutatión celular reacciona con el H_2O_2 . Dado que las cantidades de H_2O_2 requeridas para este segundo tipo de interacción son bajas, no habría ninguna alteración significativa del potencial redox general de la célula, y por lo tanto no hay un verdadero estrés oxidativo. Esta situación se describe mejor como señalización por H_2O_2 (106).

Para la señalización de rutina, los niveles intracelulares de H_2O_2 parecen variar desde 1 nM hasta un máximo de 700 nM (106). Algunos autores informan que los niveles intracelulares por encima de 1 M son tóxicos para las células, e inician la respuesta de muerte celular (106). Aunque H_2O_2 se difunde libremente, cuando se aplica H_2O_2 a células cultivadas, se establece rápidamente un gradiente a través de la membrana plasmática que resulta en una concentración intracelular de 7 a 10 veces inferior a la de la concentración extracelular (106). La aplicación de H_2O_2 a concentraciones inferiores a 10 μM a las células en cultivo, aumenta la supervivencia celular y estimula la proliferación, mientras que la aplicación de concentraciones superiores a 10 μM causa estrés a las células, detienen el crecimiento y estimulan la muerte celular (107). En tejidos de mamíferos, la mayoría de H_2O_2 estimulado por agonistas parece ser generada en el espacio extracelular (108) coherente con la bioquímica conocida del complejo NADPH oxidasa para el transporte de electrones a través de una bicapa lipídica (109). Recientemente, la utilización de un microsensor amperimétrico ha indicado que en los tejidos de los mamíferos, la concentración extracelular máxima de H_2O_2 generada durante la señalización se encuentra en el rango de 2 a 4 μM (106), lo que sería coherente con los niveles intracelulares máximos por debajo de 700 nM. Además, se ha demostrado que en células de mamíferos, el H_2O_2 puede inducir la fosforilación de proteínas específicas con una respuesta máxima que se presenta a una concentración extracelular de 5 a 8 μM (106). De esta manera, un sensor de H_2O_2 que funcione para detectar y responder a las fluctuaciones del H_2O_2 estimuladas por el receptor, debe ser capaz de detectar este agente sobre un rango de concentración intracelular de 1 a 700 nM. Peroxidasas y catalasas interactúan con estos bajos niveles

de H_2O_2 (106). Aunque, como una molécula no polar, el H_2O_2 es capaz de difundir a través de membranas, añadido exógenamente ha demostrado ser menos eficaz en inducir una respuesta de señalización que el H_2O_2 producido de forma endógena (110). En efecto, NADPH oxidasas se ensamblan y se localizan de manera altamente regulada, lo que sugiere que las señales del H_2O_2 sólo se transmiten a una distancia relativamente corta (111). Consistente con esto Bossis y Melchior han informado efectos compartimentalizados del H_2O_2 sobre enzimas conjugadas por SUMO. Las enzimas localizadas en el citoplasma son más susceptibles a la inactivación por H_2O_2 que las del núcleo (112). Parece que la especificidad del H_2O_2 , a pesar de la amplia gama de objetivos y la reactividad general, puede deberse a la colocación de la fuente de producción del oxidante cerca al objetivo previsto. Generalmente se cree que para los propósitos de señalización, el anión superóxido dismuta espontáneamente a H_2O_2 . Aunque se ha asumido que una vez generado, el H_2O_2 podría simplemente difundir al otro lado de la membrana plasmática, la reciente evidencia sugiere que el H_2O_2 podría preferentemente entrar en la célula a través de canales de acuaporinas específicos en la membrana plasmática (113) y así ser canalizada a un objetivo previsto (Figura 12).

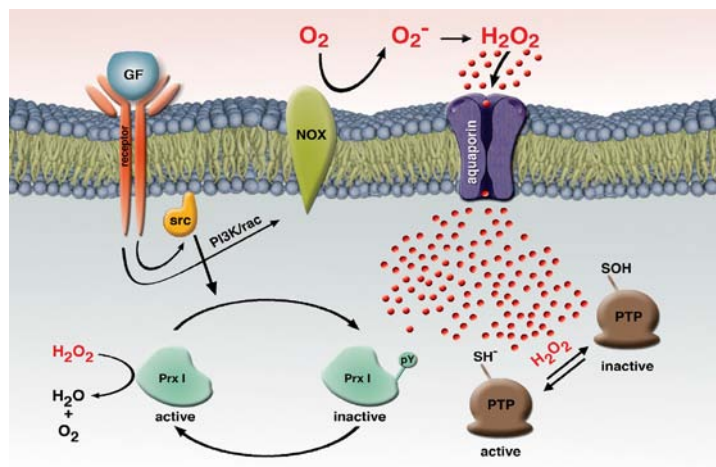


Figura 12. Localización de la señal oxidante.

El uso de H_2O_2 como molécula de señalización tiene sus riesgos potenciales así que debe estar fuertemente regulado (111). La presencia de abundantes antioxidantes celulares enzimáticos y no enzimáticos también limita los efectos del H_2O_2 cerca de su lugar de generación. Además de los antioxidantes no enzimáticos tales como vitaminas C y E, y los carotenoides, las células contienen un portafolio de enzimas antioxidantes, cuyas actividades están dirigidas a la reducción de H_2O_2 . Estas enzimas se pueden distinguir por sus metabolismos catalíticos, localización y regulación celular. Las

enzimas antioxidantes principales involucradas en la descomposición catalítica de H_2O_2 son catalasa, glutatión peroxidasa (114) y tioredoxina peroxidasa (peroxirredoxinas) (115).

IX. Receptores nucleares

Los receptores nucleares (NR) pertenecen a una superfamilia de factores de transcripción dependientes de ligandos que regulan la expresión de genes relacionados con el desarrollo, metabolismo, crecimiento celular y reproducción, (116) y numerosas condiciones patológicas tales como aterosclerosis, hiperlipidemia, obesidad, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 (117). Los NR comprenden 48 miembros en humanos (118). Los receptores nucleares se pueden clasificar en tres grupos con base en sus ligandos endógenos: 1) El grupo de los “receptores clásicos de hormonas esteroideas”(receptores de estrógenos, andrógenos, progesterona, glucocorticoides y mineralocorticoides; 2) los “receptores huérfanos”, que conservan las características del resto de los miembros de la familia pero carecen de ligandos fisiológicos descritos e, incluso en algunos casos, pueden actuar de forma independiente de ligando (SHP: small heterodimeric partner; LRH-1: Liver receptor homolog-1); y 3) “receptores huérfanos adoptados”, los receptores X de farnesoide o FXR (farnesoid X receptor), los receptores activados por proliferadores peroxisomales PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) α , β , γ ; los receptores X de ácido retinoico o LXRs (liver x receptors) α , β y los receptores RXR (retinoid X receptor) α , β , γ (119). La superfamilia NR se divide en seis subfamilias de acuerdo a las homologías funcionales y a la secuencia. La más grande subfamilia (NR1) incluye los receptores LXR (del inglés “liver X receptor”) y receptores de ácido retinoico (RAR), entre otros (120). Muchos de los receptores huérfanos adoptados están regulados por metabolitos lipídicos producidos en las células y que actúan de forma paracrina o autocrina, desencadenando cambios transcripcionales en respuesta a alteraciones de la homeostasis lipídica de la propia célula (82).

IX.1. Los receptores LXR

Los receptores LXRs (“Liver X receptors”), receptores nucleares de oxisteroles, se definieron inicialmente como reguladores del metabolismo y transporte de lípidos (121). LXRs actúan como sensores de los niveles del colesterol que disparan varios mecanismos adaptativos en respuesta a la sobrecarga del colesterol y regulan positivamente la expresión de un grupo de genes incluidos en todos los aspectos del transporte y el metabolismo del colesterol tales como los transportadores ATP-binding

cassette (ABC) y la proteína de unión del elemento de respuesta a esteroides (SREBP) (122, 123) (Figura 13). Además, se han relacionado con otras funciones tales como la síntesis y metabolismo de ácidos grasos, la homeostasis de la glucosa, la esteroidogénesis y la homeostasis neurológica (124). A mediados de los 90's, se identificaron dos isoformas de LXR de forma independiente por varios grupos diferentes. LXR α (NR1H3) fue clonado por primera vez por Apfel et al. (originalmente denominado RLD-1) (125) y en el laboratorio de David Mangelsdorf (126). LXR β (NR1H2, also known as NER, UR, RIP15, and OR-1) (126) fueron inicialmente definidos como receptores nucleares huérfanos debido a que sus ligandos naturales eran desconocidos (127).

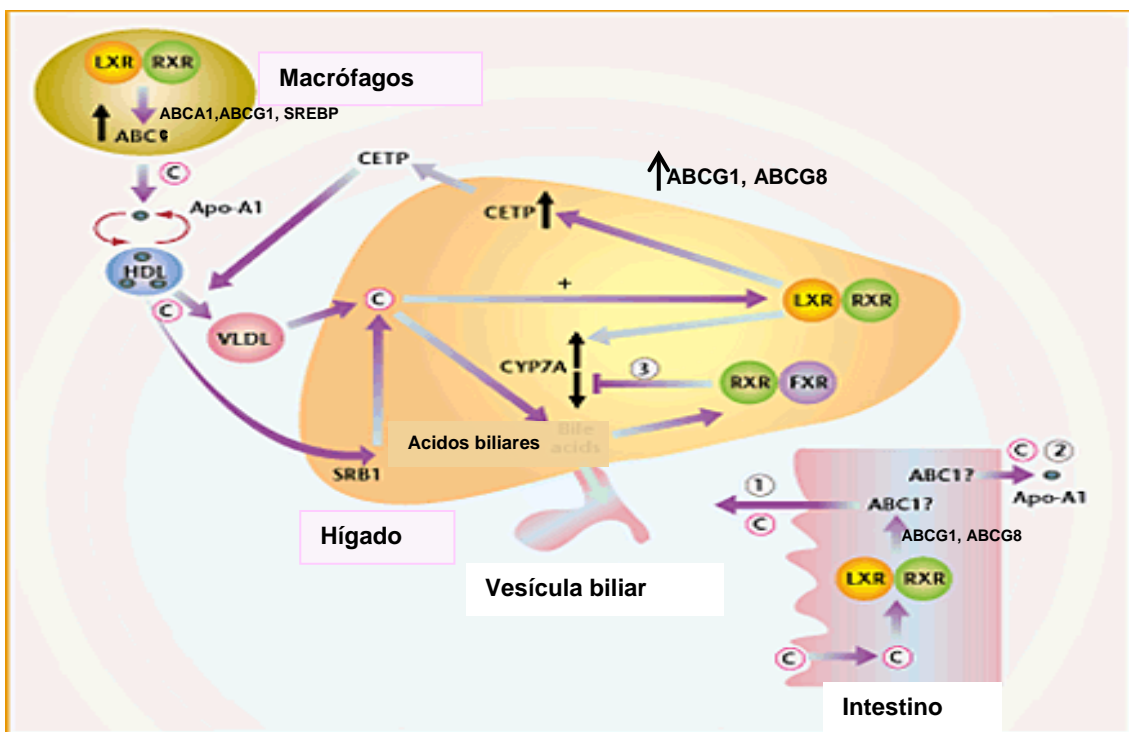


Figura 13. Los LXR son sensores y reguladores del colesterol. (128).

IX.2. Estructura de los receptores nucleares

Un receptor nuclear típico consiste de una región N-terminal con un dominio AF (activation function)-1, poco conservado entre receptores, un dominio altamente conservado de unión a DNA (DNA Binding Domain, DBD), importante en el reconocimiento específico de secuencia de genes diana, una región ligadora, y un dominio C terminal que determina la especificidad de unión al ligando de cada receptor (Ligand Binding Domain, LBD) (Figura 14A) y media las interacciones de activación y/o represión transcripcionales mediadas por el ligando (Figura 14B) (123).

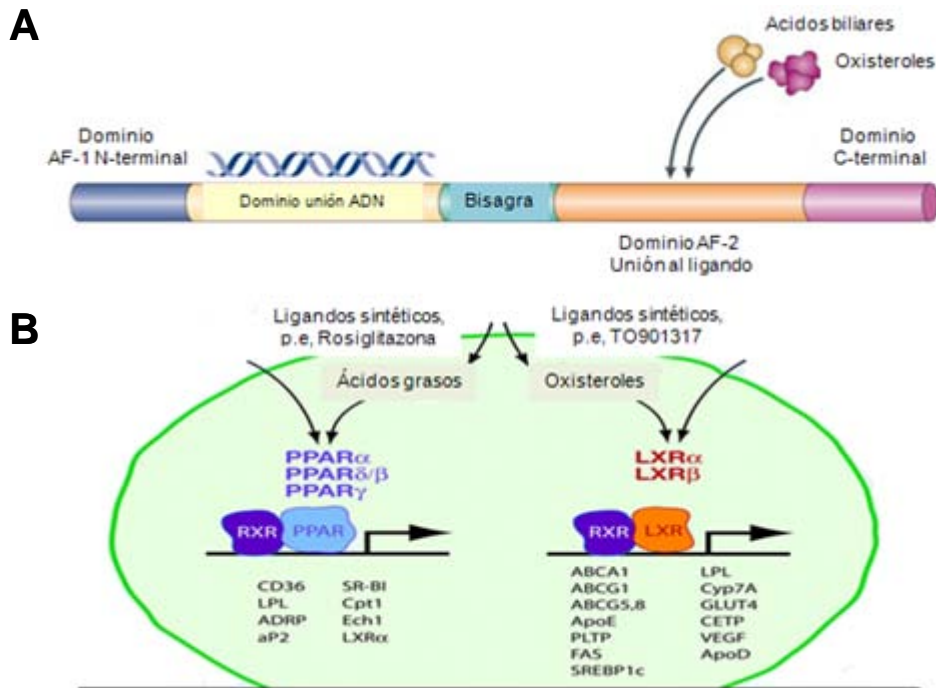


Figura 14. Los receptores huérfanos adoptados.

IX.3. Mecanismos de unión de los receptores nucleares al ADN

Las características de los receptores nucleares más importantes son su capacidad de 1) unirse a moldes de cromatina condensada, lo que los hace importantes iniciadores de la transcripción génica y 2) reclutar secuencialmente una variedad de factores de transcripción y co-reguladores a promotores diana y orquestar el proceso completo de la transcripción génica (129). Los receptores nucleares (RN) se pueden clasificar con base en dos criterios distintos: según su mecanismo de acción o según su localización subcelular en ausencia de ligando. Las sustancias pequeñas lipofílicas tales como hormonas naturales, difunden a través de la membrana celular y se unen a los receptores nucleares localizados en el citoplasma (RN tipo I) o en el núcleo (RN tipo II) de la célula (Figura 15).

Mecanismo de acción clase II de los receptores nucleares

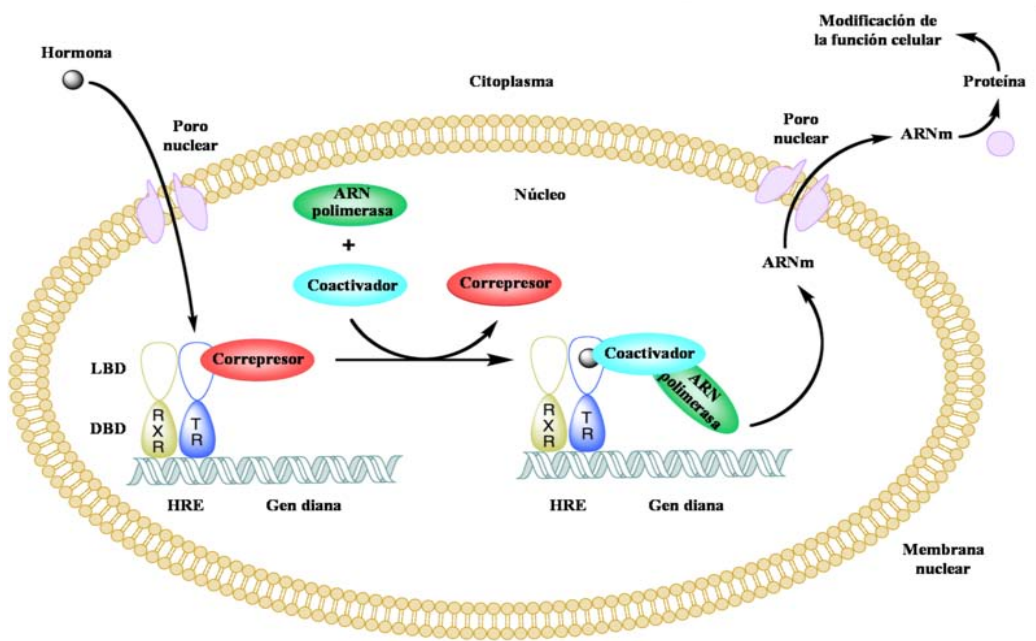


Figura 15. Mecanismo de acción de los LXRs.

LXRs pertenecen al grupo de receptores semejantes a los receptores de hormonas tiroideas (130). Son RNs de tipo II, se mantienen en el núcleo independientemente de si su correspondiente ligando está o no unido, y se unen al ADN formando un complejo con el receptor X retinoide. En ausencia de ligando forman un complejo con proteínas correpresoras. La unión de los ligandos a los receptores nucleares induce un cambio conformacional del receptor que lleva a un incremento de la afinidad de unión por proteínas coactivadoras. Estas proteínas suelen poseer actividad histona acetiltransferasa (HAT), que debilita la asociación de las histonas al ADN, y de este modo, facilita la transcripción de los genes diana. LXR se une a sus genes diana formando heterodímeros con RXR. Los HRE (HRE, hormone response element) para estos receptores normalmente constan de dos secuencias de reconocimiento dispuestas en el mismo sentido, y se denominan repeticiones directas (DR) (116). La secuencia y el número de bases que separan los dos motivos determinan la especificidad de la unión de distintos heterodímeros y homodímeros (131). Los heterodímeros LXR-RXR se unen a repeticiones separadas por cuatro bases (DR-4) (116).

IX.4. Isoformas, distribución y ligandos

LXR α y LXR β , codificados en humanos por genes independientes localizados en diferentes locus sobre el cromosoma 11p11.2 y 19q13.3 respectivamente, pertenecen

a la superfamilia de receptores nucleares y se han subclasificado por grado de similitud dentro de la subfamilia similares a receptores nucleares (nuclear receptor-like) (121, 126). Los patrones de expresión difieren entre las dos isoformas. Mientras que LXR α se expresa mayoritariamente en hígado, y en menor concentración en intestino, tejido adiposo, macrófagos, bazo, pulmón, riñones, testículos, tejido adiposo y piel (126, 132) y macrófagos y neutrófilos (133), LXR β se expresa de forma ubicua en la mayoría de los tejidos (134). Ambas isoformas tienen alrededor del 77% de homología en su secuencia de aminoácidos (126) y contienen los dominios funcionales comunes a la mayoría de los receptores nucleares (126). Los LXRs forman heterodímeros con RXR, de manera que el complejo puede ser activado por ligandos de ambos componentes. El complejo LXR/RXR se une a los elementos de respuesta a LXR (LXREs, LXR response elements), que consisten en repeticiones de la secuencia consenso “AGGTCA” separado por cuatro nucleótidos (DR-4) (135).

Los ligandos naturales de estos receptores nucleares incluyen diversos derivados del colesterol (oxisteroles), retinoides, esteroides, hormonas, prostaglandinas, benzoatos y varios ácidos grasos (119). La especificidad de ligando se determina por el dominio LBD, pero algunos son inespecíficos, lo que permite que moléculas con la estereoquímica correcta pueda unirse al bolsillo de unión del ligando e imitar o bloquear la unión del ligando natural. Los primeros ligandos de LXR los derivados oxidados de colesterol, los oxisteroles, que incluyen 20 (S)-, 22 (R)-, 24 (S)-, 25 -, y 27 hidroxicolesterol, 24 (S)-, 25-epoxicolesterol, (11, 136). Los ligandos sintéticos no esteroideos TO901317 (N-(2,2,2-tri-fluoroetil)-N-(4-(2,2,2-tri-fluoro-1-hidroxi-1-tri-fluoro-metil-etil)-fenil)-benzenosulfonamida) (Tularik Inc.) (137) y GW3965 (ácido 3-(3-(2-cloro-3-trifluorometil-benzil-2,2-difenil-etilamino) propoxi) fenilacético, Glaxo Smith Kline Pharmaceuticals (138), son estructuralmente diferentes, no discriminan entre las dos isoformas de LXR (139) y presentan algunas diferencias en su actividad biológica. GW3965 es un activador débil comparado con TO901317. En hepatocitos, TO901317 induce ABCA1 significativamente mientras que GW3965 tiene efectos limitados (140). TO901317 puede también activar el receptor X farnesoide (FXR) (141) y receptor X pregnado (PXR) (Figura 16) (142).

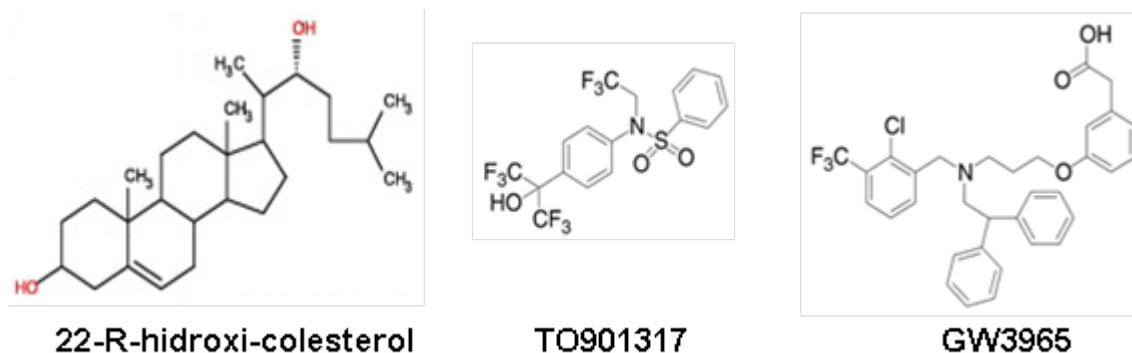


Figura 16. Los ligandos natural y sintéticos mejor caracterizados y más usados.

IX.5. Principales funciones del LXR

IX.5.A. LXR y el metabolismo del colesterol

La identificación inicial de los oxisteroles como ligandos fisiológicos de LXR supuso una primera aproximación del papel de estos receptores en el metabolismo de colesterol (143, 144). Esta hipótesis fue confirmada tras los resultados obtenidos en estudios realizados en ratones LXR α -/-, donde se observó una marcada acumulación de ésteres del colesterol en el hígado de estos ratones tras ser sometidos a una dieta rica en colesterol (145). El análisis de la expresión de genes en ratones deficientes en LXR y en células tratadas con los ligandos sintéticos del LXR ha revelado que este receptor nuclear juega un importante papel en el control del metabolismo lipídico (137, 145). Estos estudios han permitido identificar una serie de genes diana de LXR que participan en el metabolismo del colesterol y de los ácidos grasos. Muchos genes diana de LXR están involucrados en el mecanismo de transporte reverso de colesterol, en el que el exceso de colesterol es transferido en partículas HDL desde las células periféricas hacia el hígado para su excreción en la bilis. Numerosos estudios relacionan a varios miembros de la familia de transportadores de membrana ABC (ATP binding cassette) con esta capacidad de los ligandos de LXR para elevar los niveles plasmáticos de HDL e inhibir la absorción intestinal de colesterol. Un miembro de esta familia particularmente bien caracterizado es ABCA1. Los niveles elevados de colesterol celular son acompañados por el aumento de la producción de los agonistas oxisteroles de LXR. En respuesta a la activación, LXR actúa de forma coordinada para mantener la homeostasis del colesterol aumentando la expresión específica de tejido de genes implicados en el transporte y metabolismo de esteroides como ABCA1, ABCG1, y apolipoproteína E. (146). Repa y colaboradores (147) establecieron que los

heterodímeros LXR/RXR son reguladores clave de la expresión de ABCA1 in vivo, y mostraron que la activación dependiente de ligando de LXR inhibe la absorción intestinal de colesterol. Costet et al. (148) identificaron un elemento de respuesta a LXR en el promotor del gen de ABCA1. Schwartz y colaboradores (149) demostraron que la expresión de ARNm de ABCA1 es inducida en macrófagos en respuesta a la carga lipídica, y que la expresión y activación de LXR estimula la eliminación de colesterol mediada por ApoA-1. La capacidad de los ligandos de LXR de aumentar los niveles de colesterol-HDL en ratones coincide con la conocida función de ABCA1 en el transporte reverso de colesterol (137). Además, los ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ desarrollan esplenomegalia y acumulan células espumosas en múltiples tejidos periféricos, un fenotipo muy similar al de los ratones $ABCA1^{-/-}$ (150). Las lipoproteínas de alta densidad (HDLs) expresan propiedades anti-aterogénicas y presumiblemente funciones anti-inflamatorias a través de varios mecanismos complejos (151). La principal función de los HDLs es transportar lípidos en la sangre. La formación de HDL se inicia a través de la síntesis de ApoA-I en el hígado y el intestino. A Apo A-I se adiciona colesterol y fosfolípidos, a través de la molécula transportadora ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) (146) expresada en los enterocitos y hepatocitos, formando las partículas HDL pobres de lípidos. Desde los tejidos periféricos, estas partículas promueven la salida del colesterol libre a través de ABCA1 y subsecuentemente la partícula HDL madura se forma vía ABCG1.

La maduración de HDL requiere la esterificación del colesterol a través de la enzima lecitina: colesterol aciltransferasa (LCAT). La partícula madura regresa al hígado y la captura del colesterol es mediada a través del receptor scavenger clase BI (SR-BI). Alternativamente, el colesterol es transferido a partículas LDL a través de la proteína de transferencia de colesterol ester (CETP) y capturado por el hígado a través de la unión de las partículas LDL al receptor LDL hepático (LDLR). En el hígado, el colesterol es hidrolizado a colesterol libre, el cual es convertido a ácidos biliares o secretado al ducto biliar (128, 151).

Los LXRs son sensores y reguladores importantes de la homeostasis del colesterol en varios tejidos metabólicos incluyendo el hígado, intestino y macrófagos y regulan una variedad de genes diana que codifican diversas enzimas relacionadas con la síntesis, el metabolismo, la absorción y el transporte del colesterol (135). LXR tiene potencial anti-aterogénico porque inhiben la progresión e incluso promueven la regresión de la aterosclerosis (122, 150, 152). La proteína de transferencia del

colesterol ester (CETP), facilita la transferencia del colesterol ester desde las HDLs maduras a lipoproteínas que contienen ApoB y la eliminación a través del hígado es regulada positivamente por LXR tanto in vitro como in vivo en ratones transgénicos que expresan CETP humano (153, 154).

LXREs se han localizado y caracterizado en el promotor proximal de la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP) y demuestra ser funcional usando TO901317 en cultivos de macrófagos (155). También, PLTP y apolipoproteína E (apoE) son regulados por la activación de LXR en macrófagos peritoneales (156). Además de regular la expresión de ABCA1 en el intestino, LXR también regula la expresión de ABCG5 y ABCG8 en el intestino y el hígado. La activación de LXR en ratones y similarmente en humanos (157), regula la expresión de ABCG5/8 y NPC1L1, aumentando por ello la secreción del esteroles desde el hígado y disminuyendo la absorción del colesterol en el intestino, regulando de esta manera la salida del colesterol (121, 158, 159). En ausencia de ligandos, se mantiene la interacción con los co-represores y se reprime la actividad transcripcional de genes diana. La unión de los ligandos a LXR produce un cambio conformacional que facilita el reemplazo del co-represor por otro co-activador, activando así la transcripción de genes diana (160). El transporte del colesterol al hígado (transporte reverso) a través de ABCA1 y ABCG1 es regulada por el LXR y constituye un mecanismo de protección contra la aterosclerosis (126, 146, 149, 161). La activación de LXR in vivo, usando ratones ha demostrado el aumento de la salida del colesterol desde los macrófagos a través de ABCG1 y ABCA1 (162, 163, 164).

Además de su capacidad para regular el metabolismo del colesterol, LXR también está implicado en la lipogénesis hepática. El tratamiento de ratones con agonistas sintéticos de LXR eleva los niveles de triglicéridos en el hígado así como en el plasma, un efecto que supone un gran obstáculo para el desarrollo de estos compuestos como fármacos humanos (137, 152). La actividad lipogénica de LXR se traduce en un aumento de la expresión del principal regulador de la lipogénesis hepática SREBP-c (sterol regulatory element binding protein) (126, 165), así como la inducción de la sintetasa de ácidos grasos (FAS, fatty acid synthase) (152), carboxilasa acil-CoA, y la desaturasa esteroles-CoA 1 (166). LXR regula también positivamente diversos enzimas relacionados con la remodelación de lipoproteínas, incluyendo la lipoproteína lipasa (LPL), la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP), y la proteína

transportadora de fosfolípidos (PLTP). Es probable que algunas de las acciones de los agonistas de LXR sobre los niveles de HDL y VLDL estén implicadas en el control de estas enzimas remodelantes de lipoproteínas (126, 166).

IX.5.B. LXR y aterosclerosis

La aterosclerosis se caracteriza por el desarrollo de un estado inflamatorio crónico dentro de la pared arterial relacionado con un desorden del metabolismo lipídico. El fenómeno inicial fundamental de la aterosclerosis es la alteración del endotelio causada por exceso de lipoproteínas, hipertensión o diabetes. El endotelio alterado permite la entrada de células inflamatorias como macrófagos y neutrófilos en la pared vascular y de lipoproteínas que se depositan en la íntima (10). Los monocitos se transforman en macrófagos, producen citocinas, especies oxígeno reactivas que oxidan las LDL y estas moléculas son captadas por los macrófagos que se sobrecargan de lípidos y se convierten en células espumosas. Una vez que mueren, las células espumosas liberan los lípidos acumulados formando depósitos dentro de la íntima que se transforman en los centros de las placas ateroscleróticas maduras (10). Estudios previos realizados con ganancia o pérdida de función han llevado a sugerir que los agonistas de LXR podrían ejercer efectos antiaterogénicos promoviendo la eliminación de colesterol y limitando la producción de mediadores inflamatorios en la pared arterial (152). En estos estudios, el tratamiento de ratones propensos a aterosclerosis *ApoE*^{-/-} y *Ldlr*^{-/-} con un ligando sintético de LXR indujo un descenso del tamaño de la lesión de aproximadamente el 50% (152). Estos estudios confirman que LXR supone un importante mecanismo homeostático en el macrófago, que ayuda a proteger contra el exceso de colesterol, y apuntan a que LXR supone un objetivo atractivo para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular (167). En estudios con aortas de ratones tratados con el ligando del LXR, la expresión de ABCA1 y ABCG1 fue inducida, mientras que la expresión de genes inflamatorios se vio inhibida, lo cual revela la existencia de un mecanismo beneficioso. Por el contrario, la pérdida de la expresión de LXRs de forma específica en macrófagos llevada a cabo mediante el trasplante de médula ósea de ratones *LXRab*^{-/-} en ratones *ApoE*^{-/-} o *Ldlr*^{-/-} se tradujo en un marcado incremento del tamaño de la lesión (150). Además, los neutrófilos liberan al medio extracelular derivados de oxígeno altamente reactivos, enzimas almacenados en sus gránulos (lisozima), prostaglandinas, leucotrienos y varias citoquinas (TNF- α , IL-1, IL-12), que amplifican la respuesta inflamatoria (51). La activación del LXR reduce la

producción de ROS y citoquinas y la inflamación pudiendo contribuir de esta forma con la reducción de la aterosclerosis (133)

IX.5.C. LXR, inmunidad innata e inflamación

Los macrófagos juegan un papel esencial en la infección y la resolución de la inflamación. Los LXRs se han relacionado principalmente a los macrófagos debido a su relación directa a la aterosclerosis pero actualmente se reconoce el papel que los neutrófilos, el más abundante tipo celular circulante en sangre (168) juegan en la patogénesis de las enfermedades vasculares (169). Los agonistas que activan la vía LXR pueden ser utilizados para mejorar la inmunidad innata contra patógenos altamente virulentos que de otro modo inducen la apoptosis de los macrófagos como un medio para subvertir la defensa inmune del huésped (170). Los ratones que carecen de LXRs son altamente susceptibles a patógenos intracelulares (171). De forma similar, Valledor y colaboradores (172) mostraron que la activación de los heterodímeros LXR/RXR por los ligandos sintéticos y naturales inhibe la apoptosis de macrófagos en respuesta a estímulos apoptóticos (como cicloheximida) y a la infección con *Bacillus anthracis*, *E. coli*, y *Salmonella typhimurium*. Los estudios sobre los perfiles de expresión demostraron que los agonistas de LXR y RXR indujeron la expresión de reguladores anti-apoptóticos incluyendo AIM, Bcl-XL y Birc1a. Además, los agonistas de LXR y RXR inhibieron la expresión de reguladores y efectores pro-apoptóticos incluyendo caspasas 1, 4/11, 7, y 12; ligando Fas y Dnase113 (172). Las actividades anti-inflamatorias de los receptores LXR se describieron por primera vez en 2003 usando un modelo inflamatorio cutáneo en ratón en el cual la activación del LXR por GW3965 o 22-R-OH-colesterol inhibieron la expresión de TNF- α e IL-1 α (173). Independientemente, Castrillo A y Joseph SB (2003), usando macrófagos estimulados con LPS, demostraron que la activación de los LXR por sus ligandos inhibió la expresión de varios factores inflamatorios tales como interleucina (IL)-6, ciclooxigenasa (COX)-2, y óxido nítrico sintasa inducible (NOS2) (134, 174). El tratamiento con agonistas de LXR sintéticos redujeron la expresión de mediadores proinflamatorios en células de islotes humanos estimuladas con LPS (175) y células Kupffer de rata (176). Además, estos autores también demostraron que la activación de la señalización de TLR (TLR3/4) comprometieron varios genes diana del LXR tales como ABCA1 y ABCG1, así como la salida del colesterol a través de el factor regulatorio de interferón (IRF)-3, relacionando las dos vías (134, 174). Existen resultados que han demostrado

que diferentes patógenos microbianos podrían contribuir a la formación de células espumosas y acelerar el desarrollo de la lesión, debido a la interferencia con el metabolismo del colesterol dependiente de LXR (174). Los receptores tipo Toll (TLRs) funcionan como iniciadores de la inflamación a través de su capacidad de detectar patrones moleculares asociados a patógenos y productos del daño tisular (177). La activación de TLRs durante la infección vírica o bacteriana de macrófagos compromete seriamente la expresión de ABCA1, ABCG1 y ApoE, así como de otros genes diana de LXR, tanto *in vitro* como *in vivo*. Junto con estos efectos en la expresión de genes dependientes de LXR, la activación de TLRs inhibe potencialmente la eliminación de colesterol en los macrófagos. De forma similar en neutrófilos distintas moléculas proinflamatorias reducen los niveles de expresión de LXR y sus genes diana afectando de esta manera el contenido lipídico de estas células (133). Estos estudios destacan la capacidad de los receptores LXR para integrar señalización inflamatoria y metabólica (Figura 17). LXR también inhibe la migración de las células dendríticas a los ganglios linfáticos a través de la regulación de la vía de CCR7, reducen la expresión de CCR7 y atenúan la infección de partículas de VIH, Mediante el aumento de la expresión de los transportadores ABC de colesterol y ApoE. La disminución en los niveles de colesterol intracelulares lleva a la disminución de la proliferación de muchos

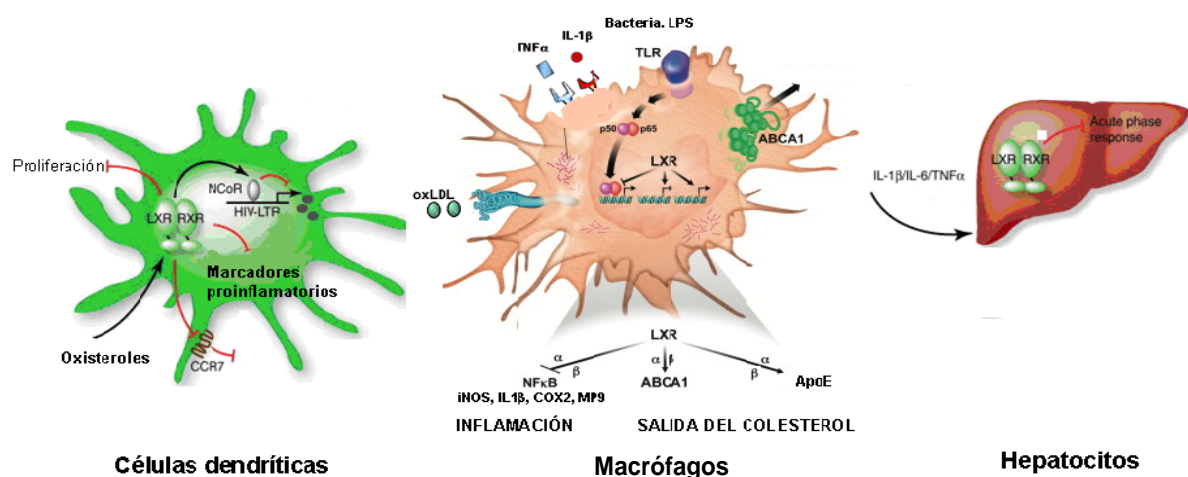


Figura 17. Funciones biológicas de LXR en el sistema inmune innato. (Modificada de (178).

tipos de células, así como a la menor producción de placas de amiloide (178). Se ha sugerido que la activación de LXR en células dendríticas inhibe la respuesta inmune

antitumoral a través de una reducción de la migración a los órganos linfoides y reducción de la activación de la respuesta adaptativa (179).

Utilizando ratones LXRab^{-/-}, se ha observado que la inyección intraperitoneal de LPS, desencadena una respuesta sistémica exagerada que se mide a través de los niveles de citoquinas en el suero como Interleuquina (IL)-1 β , IL-6, y Factor de Necrosis Tumoral (TNF)- α (134, 180) y la expresión de genes inflamatorios en el hígado (134). Se ha observado además que los agonistas de LXR reducen de manera significativa la respuesta inflamatoria en modelos de inflamación cutánea inducida por TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate). Además, la administración del agonistas sintéticos de LXR reducen la expresión de genes inflamatorios, como MMP-9, en el contexto de la inflamación crónica ateromatosa en ratones hipercolesterolémicos apoE^{-/-} y Ldlr^{-/-} (134, 180). La activación de LXRs redujo la inflamación cerebral en un modelo experimental (181). La artritis reumatoidea es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta las articulaciones (182). En esta entidad, los macrófagos activados liberan Factor de Necrosis Tumoral (TNF)- α , interleuquina (IL)-1 β , IL-6 y metaloproteinasas de la matrix (MMPs) y producen ciclo-oxigenasa (COX)-2 y quimoquinas (183). Estudios usando el agonista sintético del LXR, GW3965 han revelado que el tratamiento con GW3965 inhibe significativamente la artritis inducida por colágeno en ratones (184).

Aunque los mecanismos de la propiedad anti-inflamatoria de la activación de LXR no se ha esclarecido completamente, hay amplia evidencia en la literatura que indica que la acción antiinflamatoria se desarrolla a través de mecanismos de trans-represión que se ejercen sobre los factores clave de regulación de la respuesta inflamatoria, tales como NF- κ B, Stat1, IRF-1 y en menor grado AP-1 (185).

Sin embargo, otros autores indican que la relación entre LXRs y la respuesta inflamatoria aún no está establecida y han relacionado la activación de los LXRs con una regulación positiva de la inflamación mediada por macrófagos en humanos (186, 186) y por neutrófilos en ratones (187). Recientemente se ha descrito un papel novedoso de los LXRs en estrés oxidativo (188). En estudios realizados en el pulmón se ha descrito una regulación positiva de las enzimas antioxidantes por estos receptores. El estrés oxidativo limita la salida del colesterol a través de una cascada molecular incluyendo la inhibición de la expresión génica de LXR, la cual a su vez reduce la expresión de ABCA1 y baja la salida del colesterol (189).

En la Figura 18 se observan los mecanismos moleculares de la transactivación ejercida por LXR una vez activado por su ligando. LXR se une a una secuencia específica de ADN, llamada el elemento de respuesta de LXR (LXRE). En esta configuración, LXR forma un heterodímero con los receptores de retinoides X (RXRs). Después de la activación por el ligando se produce la disociación del complejo corepresor y el reclutamiento del complejo coactivador (Figura 18A). Otro modelo molecular de transactivación definida para la unidad transcripcional ABCG1 implica también la modificación de las histona H3 (Figura 18B). La secuencia de eventos es compatible con el carácter mutuamente excluyente de metilación y acetilación en restos de lisina específicos.

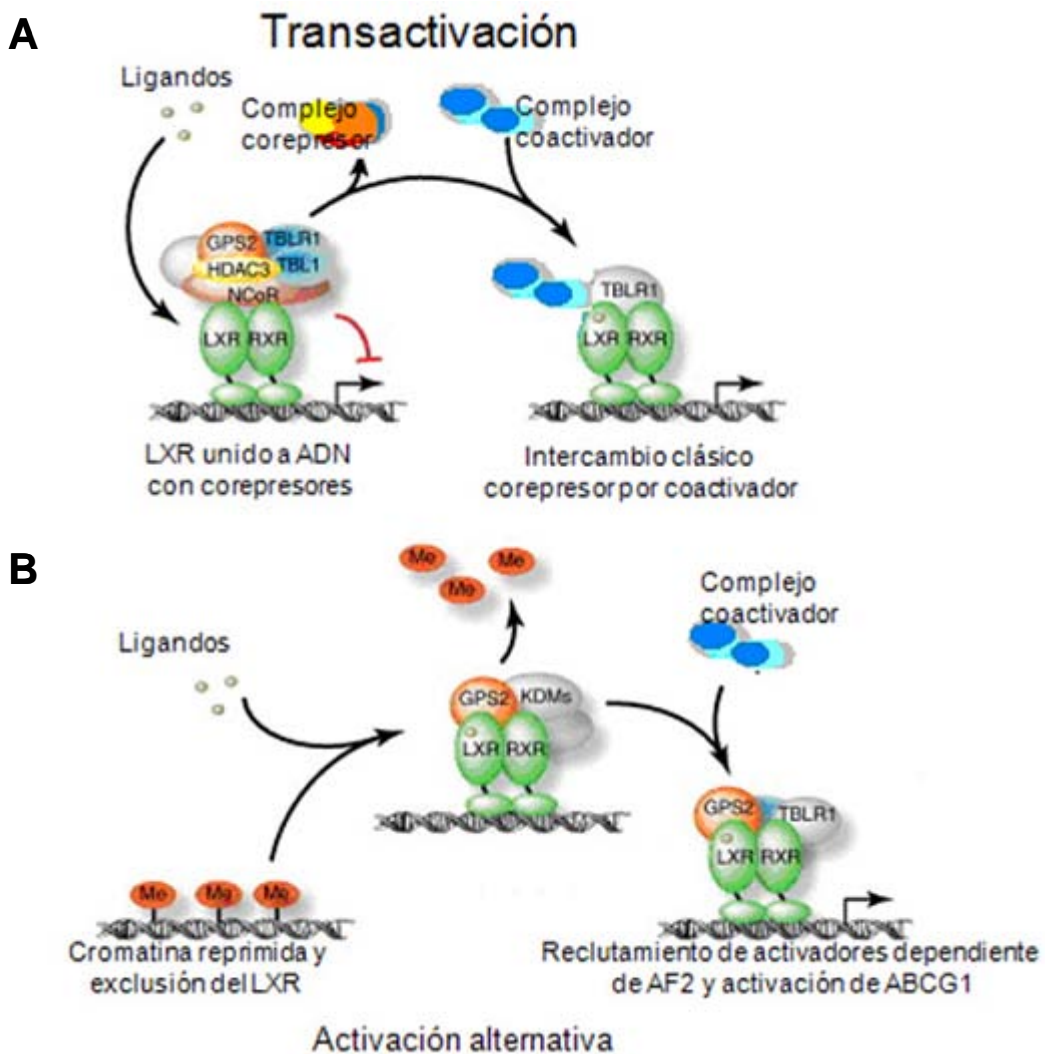


Figura 18. Mecanismos moleculares de la activación de LXR. Modificada de (178, 178).

En ausencia del estímulo pro-inflamatorio, varios genes inflamatorios son reprimidos por un complejo co-represor formado por NCoR y SMRT (190). La

expresión de NCoR funcional es necesaria para casi todos los efectos represivos de LXR sobre los genes diana de LPS (191). Para una subpoblación de estos genes, SMRT también fue necesario para establecer un complejo co-represor estable (191, 192). La inhibición de la respuesta de fase aguda en el hígado mediada por LXR, se basa en la prevención de la separación del complejo co-represor de promotores de genes inflamatorios (185).

La inhibición de la transcripción de determinados genes proinflamatorios por parte de LXR sobre promotores que no contienen LXREs (trans-represión) es un proceso SUMO-dependiente (Figura 19A). La sumoilación es una modificación postraducciona reversible por la cual algunas de las proteínas celulares son covalentemente modificadas mediante la adición de otra pequeña proteína (de peso molecular 11 kDa) llamada SUMO (small ubiquitin-related modifier) (193, 194). En mamíferos, hay tres miembros en la familia SUMO, denominadas SUMO-1, -2 y -3, las cuales se pueden conjugar a proteínas diana. En primer lugar, la sumoilación requiere de la activación de una SUMO por una enzima de activación SUMO-1 heterodimérica (Enzima E1), la cual rompe un péptido C-terminal de una SUMO de manera dependiente de ATP. Luego, la SUMO activada es transferida temporalmente a una enzima de conjugación (Enzima E2), generalmente proteína 9 ubiquitina transportadora, la cual subsecuentemente media la conjugación de la proteína diana en cooperación con las ligasas SUMO E3 (195). La mayoría ligasas SUMO E3 son miembros del inhibidor proteico de la familia STAT (PIAS) (196), aunque otras proteínas incluyendo las histonas deacetilasas (HDAC)2 y HDAC4/5 también pueden actuar como ligasas E3. En general, la sumoilación del receptor nuclear está asociada con la represión transcripcional. Sin embargo, la sumoilación del receptor huérfano retinoide-alfa (retinoid-related orphan receptor-alpha) potencia la activación transcripcional (197).

En macrófagos de ratón, LXRs activados por GW3965 sufren sumoilación, lo cual evita la separación de los complejos co-represores del promotor de genes inflamatorios específicos (191). Las proteínas implicadas en la sumoilación parecen variar entre tipos celulares y quizás por el medio ambiente inflamatorio (191).

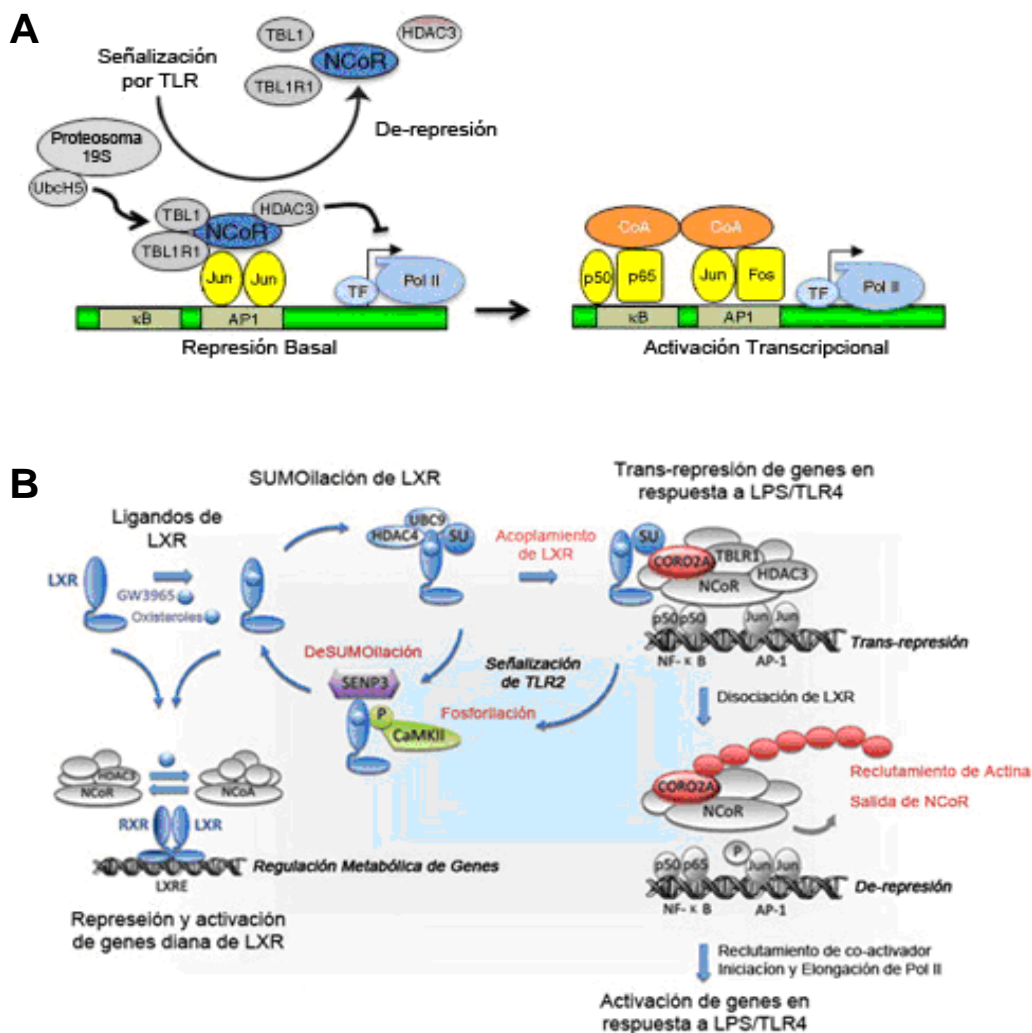


Figura 19. Mecanismos moleculares de de-represión y transrepresión. Modificada de (195).

Los genes proinflamatorios están asociados con la vía NF-κB, AP1 o factores de transcripción STAT1, La activación transcripcional de genes proinflamatorios TLR-sensibles requiere un paso de de-represión inicial en la que complejos correpresores NCoR se eliminan activamente de los promotores de genes diana para eliminar la represión basal (190, 198). Mediante el reclutamiento de los proteasomas ubiquitina 19S/conjugado dependiente de TBLR1/TBL1, se produce el intercambio de correpresores y el reclutamiento de coactivadores para activar la transcripción de genes inflamatorios (Figura 19B). En esta vía, la activación de los LXR en los macrófagos y los hepatocitos promueve la conjugación específica de SUMO-2/3 en el dominio LBD de los LXR y estos LXRs sumoilados se acoplan al complejo co-represor que contiene en el núcleo las subunidades NCoR o SMRT, TBL1 o TBLR1 (proteínas similares a transducinas-β), GPS2 y HDAC3 / 4 (histona desacetilasas 3 o 4) en los promotores de

los genes inflamatorios. El reclutamiento de LXR β sumoiledo a promotores hepáticos implica la subunidad complejo corepressor GPS2 mientras que un mecanismo de acoplamiento alternativo a través de la proteína de unión a actina CORO2A fue identificado en macrófagos de ratón (178). La sumoilacion dependiente de ligando de los LXR suprime potentemente la transcripción inducida por TLR4 al inhibir la eliminación de NCoR, pero los mecanismos subyacentes aún no se conocen. Si se conoce que la Coronin 2A (Coro2A), un componente del complejo NCoR (199) media la eliminación del NCoR inducida por TLR a través de un mecanismo que incluye la interacción con la actina nuclear oligomérica (200). Curiosamente, la vía de transrepresión LXR en sí puede ser inactivado por señales inflamatorias que inducen a la fosforilación de LXR dependiente de CaMKII γ , que conduce a su desumoilacion por la proteasa SUMO SENP3 y la liberación de Coro2A (Figura 19B). Estos resultados revelan un mecanismo de de-represión dependiente de Coro2A/actin- de genes de la respuesta inflamatoria que pueden ser regulados diferencialmente por la fosforilación y vías de señalización de receptores nucleares que controlan la inmunidad y la homeostasis (200). Coro2A funciona como un factor de intercambio de NCoR que se requiere para la eliminación de la represión de los genes diana de TLR en los macrófagos (201, 202). La capacidad de otras Coroninas para mediar el desmontaje de polímeros de actina en el citoplasma (203, 204) sugiere que Coro2A puede funcionar para liberar genes de respuesta inflamatoria de las redes de actina localizadas dedicadas a las funciones de la represión. Las funciones integradas de Coro2A primero, como un sitio de anclaje para LXRs sumoiledos y luego, como factor de intercambio NCoR dependiente de actina, sugieren un modelo de transrepresión en el cual los LXRs sumoiledos impiden la separación del NCoR del promotor de genes proinflamatorios y reprimen las respuestas a LPS mediante el bloqueo del reclutamiento de la actina. La capacidad de CaMKII γ para inactivar la vía de transrepresión por LXR mediante la creación de un sitio de anclaje para SENP3 identifica además una nueva función transcripcional de proteasas SUMO y revela un punto de entrada para la regulación negativa de la vía de la represión LXR que podría ser utilizado por otras vías de señalización que movilizan calcio intracelular (197).

Los cristales de colesterol pueden ser un iniciador de una respuesta de señalización proinflamatoria en el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas (205, 206) y está bien documentado que la inflamación y la señalización inflamatoria juega un

papel importante en la patología de la aterosclerosis (207). El colesterol cristalino también puede aumentar a NLRP3 y la activación de caspasa-1 dependiente del inflammasoma (Figura 20). La caspasa-1 convierte entonces pro-interleuquina-1 β y pro-interleuquina-18 en sus formas activas de citoquinas y estimula una cascada proinflamatoria dependiente de NF- κ B. Estas observaciones sugieren que el exceso de colesterol intracelular también puede contribuir a la gravedad de la aterosclerosis mediante la promoción de la inflamación directamente (208). Los agonistas de LXR probablemente amplifican una respuesta inhibitoria natural para el colesterol intracelular. En este papel inusual, LXR no es reclutado para elementos de respuesta LXR dentro de los promotores de genes proinflamatorios, sino que es reclutado a través de un mecanismo de "transrepresión" donde LXR sumo-modificado y el agonista forman un complejo con corepresores transcripcionales N-CoR (receptor nuclear corepresor) y/o SMRT (mediador silenciador retinoides y los receptores de la hormona tiroidea) (191, 192). El complejo de la proteína interactúa con NF- κ B, que se ubica sobre el complejo de promotores a través de sitios de unión de NF- κ B. Como resultado, se amortigua la respuesta de la activación de NF- κ B en los promotores de genes inflamatorios (Figura 20).

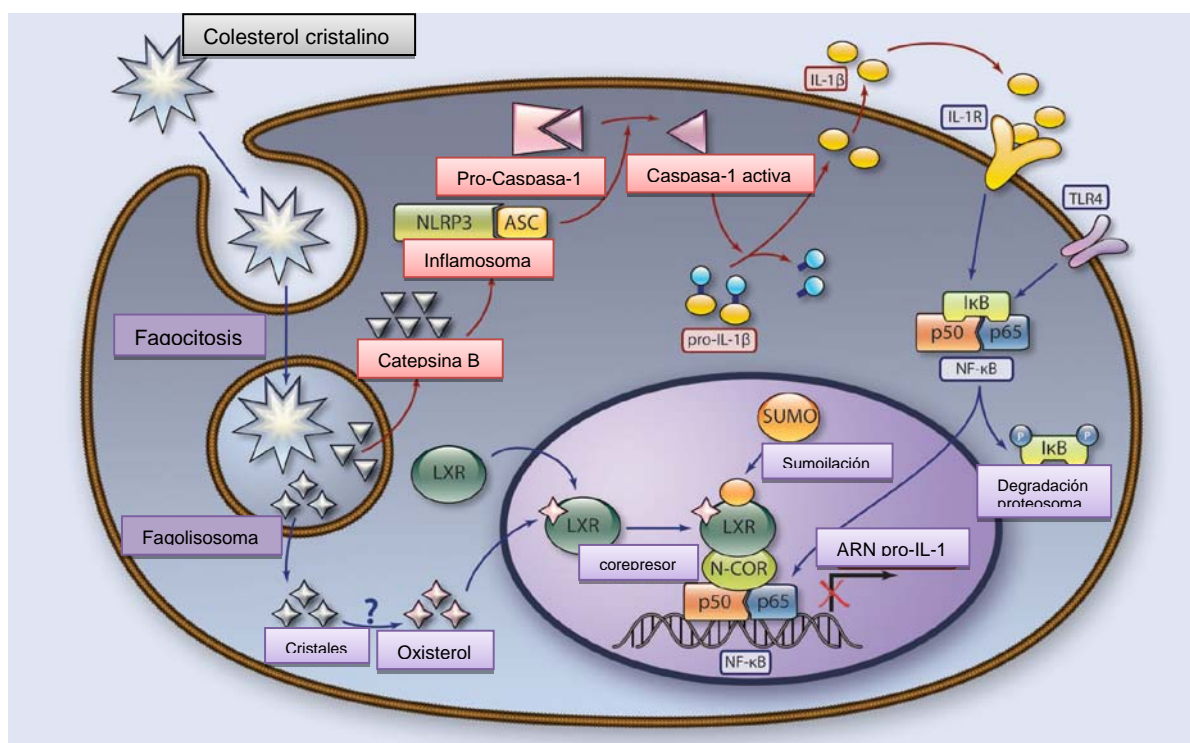



Figura 20. Acción del colesterol intracelular en mecanismos de transrepresión. Modificada de (208).

En resumen, los receptores LXR están implicados en el metabolismo del colesterol, ácidos grasos y glucosa y se han situado como integradores del metabolismo y la señalización inflamatoria y la proliferación celular, cobrando en los últimos años un interés especial en la respuesta inmune innata (135, 209).



**O
B
J
E
T
I
V
O
S**

Los LXRs son miembros de la superfamilia de receptores nucleares activados por ligandos y están involucrados principalmente en la regulación del metabolismo del colesterol y síntesis y metabolismo de ácidos grasos, la homeostasis de la glucosa, la esteroideogénesis y la homeostasis neurológica. Se han relacionado estos receptores con propiedades anti-inflamatorias, aunque también se han reportado efectos pro-inflamatorias inducidos por los complejos LXR/oxisteroles. Sin embargo, el estudio de la relación entre un estado inflamatorio y la expresión del LXR α y sus genes diana es escaso en células humanas y éste es el principal objetivo de este trabajo, ampliar el conocimiento sobre la regulación que ejercen los mecanismos inflamatorios y prooxidantes sobre la expresión de la vía del LXR.

Objetivos

- Analizar los niveles de mRNA del LXR α y de sus genes dianas ABCA1, ABCG1 y SREBP1c, y la fosforilación en serina del LXR α en neutrófilos humanos estimulados con TO901317.
- Detectar los niveles de producción de ROS inducidos por 15d-PGJ₂, PAF y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en los neutrófilos humanos.
- Estudiar el efecto de la 15d-PGJ₂, PAF y H₂O₂ sobre la expresión del LXR α y de sus genes dianas ABCA1, ABCG1 y SREBP1c.
- Estudiar la influencia del entorno oxidativo sobre la regulación que 15d-PGJ₂ y PAF ejercen sobre la expresión de LXR α , ABCA1, ABCG1 y SREBP1c.
- Analizar la vía de señalización por la cual 15d-PGJ₂, PAF y H₂O₂ regulan la expresión de LXR α en neutrófilos humanos.

**M
A
T
E
R
I
A
L
E
S

Y

M
É
T
O
D
O
S**

MATERIALES Y MÉTODOS:

I. Reactivos:

ADNasa I (Invitrogen, Barcelona, España).

3-amino-1,2,4-triazol (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Anti-ERK 1/2 (New England Biolabs, Beverly, MA, EEUU).

Anti-GAPDH (Chemicon International, Inc, Temecula, CA, EEUU).

Anti-IgG de conejo, ratón o cabra conjugados a peroxidasa (anti-IgG-HRP) (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Anti-JNK 1/2 (Santa Cruz, CA, EEUU).

Anti-p-ERK 1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴)(New England Biolabs, Beverly, MA, EEUU).

Anti-p-JNK 1/2 (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵) (Santa Cruz, CA, EEUU).

Anti-p-p38MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²) (New England Biolabs, Beverly, MA, EEUU).

A-Sepharosa (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Azul de bromofenol (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Cloroformo:isoamilalcohol (dilución 49:1) (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Coomassie Brilliant Blue G-250 (Merck, Darmstadt, Alemania).

Dextrano (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia).

2,7-diclorohidrofluoresceína diacetato (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

dNTPs (Promega, Madison, WI, EEUU).

Etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemania).

Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia).

Fijador (Kodak Co., Paris, Francia).

Fenol (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Glicerol (Química de Montcada SA, Madrid, España).

H₂O₂ (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Isopropanol (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Inhibidor de ribonucleasa Rnasin (Promega, Madison, WI, EEUU).

Luminol (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Marcador de peso molecular (PCR Markers) (Promega, Madison, WI, EEUU).

Marcador de peso molecular (BIO-RAD, Ritchmond, EEUU).

2-β-mercaptoetanol (Fluka, Sigma-Aldrich, Madrid, España).

MG132 (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Metanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemania).

NADH (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

NADPH (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
NaN₃ (Merck, Dannstadt, Alemania).
NaOH 1M (Panreac, Madrid, España).
N-ethyimaleimide (NEM) (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
Nonidet p40 (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
o-phthalaldehyde (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
Papel de filtro reforzado (BIO-RAD, Ritchmond, EEUU).
Partenolide (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
Películas fotográficas (Kodak-X-Omat, Rochester, EEUU).
Peroxidasa (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
Piruvato sódico (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Madrid, España).
Probenecid (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
Revelador (Kodak Co., Paris, Francia).
Rojo fenol (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
Tampón de carga (Blue/orange 6x Loading Dye) (Promega, Madison, WI, EEUU).
Transcriptasa inversa M-MLV-RT (Promega, Madison, WI, EEUU).
Tubos de sangre heparinizados (Becton-Dickinson, Plymouth, Reino Unido).
Tween-20 (Merck, Darmstadt, Alemania).
Xantina (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
Xantina oxidasa (Boehringer Mannheim, Alemania).

II. Normas éticas.

La sangre venosa periférica se extrae de voluntarios sanos siguiendo los protocolos estandarizados aprobados por el Comité de Ética en Investigación del Hospital Virgen Macarena, Universidad de Sevilla. El presente estudio cumple con los requisitos para la experimentación en seres humanos, que se refiere específicamente a la extracción de sangre anónima muestras de voluntarios sanos, cuyo consentimiento fue verbal, y, además, cumple con la legislación española y europea en general en vigor, según el informe de ética correspondiente emitida por la Universidad de Sevilla. El Comité de Ética de la Universidad aprobó el uso de un protocolo de consentimiento verbal con el objetivo de facilitar el procedimiento de obtención de la muestra y la gestión, tan pronto como sus proveedores se mantuvieron anónimo en todo momento. Blood retirar siguió un protocolo hospitalario rutinario, y por el momento se solicitó el consentimiento verbal simple de pacientes en nuestro hospital. La sangre obtenida no

fue utilizada únicamente para fines de investigación. Las medidas adoptadas para documentar el proceso que incluye la manipulación de datos fue estrictamente mantenido en el anonimato y que nuestro grupo no tienen acceso a los datos de los pacientes no relacionados con nuestro estudio. La investigación se diseñó y llevó a cabo de acuerdo con los principios éticos para las investigaciones médicas se indica en la Declaración de Helsinki.

III. Aislamiento de neutrófilos humanos

Los neutrófilos se obtuvieron de sangre de sujetos sanos del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla. El criterio para la elección de sujetos fueron no estar bajo algún proceso infeccioso. Tal extracción de sangre fue aprobada por el comité ético del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla. Antes de la misma, cada sujeto dio su consentimiento informado.

Soluciones:

- Solución de dextrano al 10%, disuelto en ClNa al 0.9% (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia).
- ClNa al 0.9% y al 1.8% (Merck, Dannstadt, Alemania)
- Tampón fosfato salino (PBS): 10 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ a pH 7.4 y 150 mM de ClNa.

Procedimiento:

La sangre de los pacientes fue obtenida por venipuntura al vacío en tubos heparinizados. En los tubos, la sangre se mezcla con una solución de dextrano (0.7% de concentración final) y se deja reposar durante 45-60 min en posición vertical. Pasado este tiempo, se extrae la suspensión formada en la fase superior con pipeta “Pasteur” y se vierte en tubos que contienen una solución de Ficoll-Paque, en una proporción 1:2 de Ficoll: sangre. La suspensión debe añadirse cuidadosamente para evitar que se mezcle con el Ficoll-Paque. Después, las muestras se centrifugan a $1,200 \times g$ durante 20 min a 4°C , con freno suave para permitir la correcta formación del gradiente, obteniéndose las fracciones mostradas en la Figura 21: Se extraen de los tubos las fases superiores, (de arriba a abajo: suero, anillo linfocitario y Ficoll) accediendo así al precipitado, compuesto por neutrófilos y eritrocitos. Éste se somete a un choque hipotónico para eliminar los eritrocitos: los precipitados se resuspenden en 5 ml de agua destilada y

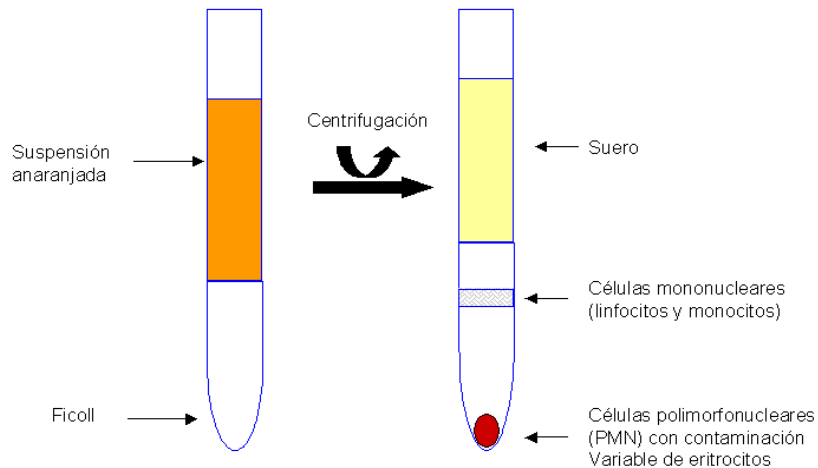


Figura: 21. Obtención de neutrófilos humanos de sangre periférica

desionizada (H_2O dd). Pasados unos 20 seg, se añaden otros 5 ml de ClNa al 1.8% que devuelven la solución a una concentración isotónica (210). Las suspensiones celulares obtenidas se centrifugan a $400 \times g$ durante 5 min a $4^\circ C$. Después, los precipitados resultantes se someten a dos procesos de lavado por resuspensión en 10 ml de PBS y centrifugación a $400 \times g$ durante 5 min a $4^\circ C$. Finalmente, los precipitados conseguidos, que corresponden a neutrófilos humanos, se resuspenden en el medio de cultivo apropiado. En otros trabajos de nuestro grupo se ha verificado por técnicas de citometría de flujo que el 90-95 % de las células obtenidas corresponden a neutrófilos

IV. Obtención de macrófagos humanos

Los monocitos fueron obtenidos de preparaciones buffy-coat obtenidos del Centro Regional de Transfusiones sanguíneas de Sevilla- Huelva y Banco de Tejidos.

Soluciones:

- Tampón fosfato salino (PBS): 10 mM de Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 a pH 7.4 y 150 mM de ClNa.
- Solución BSA 4 mg/mL en PBS.

Procedimiento:

La sangre diluida se distribuye, con pipeta “pasteur”, en tubos de fondo cónico de 50 ml sobre una solución de Ficoll-Hypaque a una proporción 1:2 (15 ml de ficoll y 30 ml de sangre). La dilución debe añadirse cuidadosamente para evitar que se mezcle con el Ficoll-Hypaque. Las muestras se centrifugan a $1,600 \times g$, durante 20 min, a $4^\circ C$, obteniéndose las fracciones que se muestran en la Figura 21. El anillo formado en la interfase del gradiente, que contiene las células mononucleares (linfocitos y monocitos)

se recoge con pipeta “pasteur” de vidrio y se coloca en un tubo cónico. Seguidamente se adiciona BSA/PBS hasta completar un volumen de 50 ml y se centrifugan a 400 x g, a 4°C, durante 10 min. El precipitado se lava otra vez con BSA/PBS como el procedimiento anterior. Las células mononucleares obtenidas se resuspenden en medio de cultivo y se incuban a 37°C durante 1 h en cajas de petri Falcon pequeña (5 mL/placa) a 37°C. Tras este periodo, se aspira el medio de cultivo con las células en suspensión y se descarta. Los monocitos, que permanecen adheridos, se lavan 2 veces con PBS atemperado, y se les adiciona medio de cultivo para realizar los tratamientos.

V. Cuantificación del número de células y análisis de la viabilidad celular

V.1. Test de exclusión del Azul Tripán y cuantificación celular

La viabilidad de las células obtenidas se analiza mediante el test de exclusión con Azul Tripán. El Azul Tripán es un colorante que penetra en células rotas, con pérdida de la integridad de su membrana, apareciendo éstas teñidas de azul al microscopio. (211).

Procedimiento:

La solución de Azul Tripán se prepara al 0.4% en NaCl al 0.9%. Para la cuantificación celular, se toma una alícuota de la suspensión celular, y se diluye 1:10 en tampón PBS. Después, en un tubo “Eppendorf” se mezclan 80 µl de PBS, 10 µl de solución de Azul Tripán y 10 µl de la dilución de células, y se incuba durante 1 min. A continuación se toman 10 µl de esta mezcla y se depositan sobre una cámara de Neubauer 0.00025mm² (Superior, Alemania). En el microscopio óptico (a 40 aumentos) se cuentan las células localizadas en las zonas de 4x4 cuadrículas. Para calcular el número de células y el porcentaje de viabilidad celular se aplican las siguientes fórmulas:

n° células/ml = media de células contadas x 10⁴ x dilución (10 en nuestro caso).

% viabilidad = (células no teñidas/células totales) x 100.

V.2. Medida de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH)

Las células no viables incrementan la permeabilidad de su membrana plasmática a enzimas intracelulares, que son liberadas al medio extracelular. El cociente entre la actividad de estas enzimas en el medio extracelular y la actividad total de las mismas (actividad en intra y extracelular) es un índice de la viabilidad celular. En esta técnica de medida de la lactato deshidrogenada (LDH) lo que mediremos será la oxidación de la NADH por la LDH (212).



Soluciones:

- Tampón de análisis: Tris-HCl 1 M pH 8 con EDTA 5 mM

Procedimiento:

En una cubeta de espectrofotómetro añadimos 100 µl de tampón de análisis, 20µl de NADH 10 mM, 20 µl del sobrenadante celular y 760 µl de H₂O_{dd}. Se atemperó a 37°C, y se inicia la reacción con 100µl de piruvato ódico 10 mM. Se mide la absorbancia durante 10 minutos en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer Hispania, Barcelona, España) a 37°C a una longitud de onda de 340nm. En todos los experimentos de la presente tesis la viabilidad celular osciló entre el 95-98%.

VI. Incubación de células

Medios de cultivo:

– Medio de cultivo completo: RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 2.5 µg/ml de anfotericina B (Bio Media, Boussens, Francia).

– Medio Krebs-Ringer-HEPES (KR-HEPES): 25 mM de HEPES a pH 7.4, 118 mM de ClNa, 4.75 mM de KCl, 1.25 mM de CaCl₂, 1.18 mM de KH₂PO₄, 1.18 mM de MgSO₄ y 10 mM de glucosa.

Procedimiento:

En todos los experimentos, salvo donde se indica, las células fueron incubadas a 37°C en medio de cultivo completo a una concentración de 1x10⁷ células/ml.

VII. Medida de la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Los niveles del anión superóxido (O₂⁻), de los ROS y del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se han analizado por cinco métodos diferentes. Cada uno con su especificidad particular para localizar y analizar el tipo de ROS producido.

VII.1. Análisis de la producción de ROS (luminol)

Los niveles de O₂⁻ se analizan mediante el método basado en el luminol. Esta molécula difunde libremente a través de las membranas celulares y reacciona con los ROS produciendo luminiscencia (213).

Soluciones:

- Medio KR-HEPES.

Procedimiento:

Las células se resuspenden en medio KR-HEPES a una concentración de 1x10⁶ células/ml, y se preincuban a 37°C durante 5 min. Después, se añade 15 µM de luminol y 2 µg/ml de peroxidasa. Se realiza una lectura basal de luminiscencia durante 5 min,

usando un luminómetro BioOrbit 1250 (BioOrbit, Turku, Finlandia). Posteriormente, se añaden los distintos agentes a estudiar y se mide la producción de ROS en base a los incrementos de luminiscencia a 37°C.

VII.2. Análisis de la producción de ROS (Hidroetidina)

La hidroetidina es un reactivo oxidado intracelularmente por radicales de oxígeno para producir bromuro de etidio, el cual se une fuertemente al ADN emitiendo una fluorescencia roja fuerte.

Soluciones:

- Medio KR-HEPES.

Procedimiento:

Las células se resuspenden en medio KR-HEPES a una concentración de 1×10^6 células/ml y 2 mM de hidroetidina. Se preincuban a 37°C durante 5 min. Después, se adicionan los tratamientos y se mide la producción de ROS usando longitudes de onda de excitación/emisión de 550 nm/615 nm en el equipo Victor Wallac 1420 (Perkin-Elmer).

VII.3. Análisis de ROS/H₂O₂ intracelular (DCFDA)

El nivel de peróxidos intracelulares, como un indicador del estado redox intracelular, se determinó con el método basado en la fluorescencia del 2,7-diclorohidrofluoresceína diacetato (DCFDA). DCFH-DA es un compuesto no polar que es convertido en un derivado polar no fluorescente impermeable a la membrana (DCFH) por esterasas celulares después de la incorporación a las células. La DCFH es oxidada rápidamente a 2',7' diclorofluoresceína (DCF) fluorescente por el peróxido de hidrógeno intracelular.

Soluciones:

- Tampón de análisis: medio KR-HEPES completado con 2.5 mM probenecid.

Procedimiento:

Las células se resuspenden, a una concentración de 1×10^6 células/ml, en un tampón de análisis que contiene probenecid (inhibidor del transporte de aniones a través de membrana) y 2.5 mM de 3-amino-1,2,4-triazol para inhibir las potentes catalasas intracelulares (214). A continuación se añade 2 μ M de DCFDA y las células se incuban a 37°C durante 1 h en oscuridad. Tras este periodo, las células se lavan dos veces con tampón de análisis y se resuspenden nuevamente en 1 ml de este tampón. La emisión de la DCF oxidada atrapada en las células pretratadas con o sin estímulos se midió usando un citómetro de flujo (FACS; Bencton-Dickinson, Mountain View, CA,

USA). Los datos se analizaron usando el programa FlowJo. Los histogramas sombreados

VIII. Obtención de proteínas celulares

VIII.1. Aislamiento de proteínas totales

Soluciones de lisis:

- Tampón de lisis en experimentos sobre fosforilación de p38MAPK y niveles de GAPDH: 20 mM de Tris-HCl a pH 7.4, 2 mM de EDTA, 50 mM de DTT, 50 mM de NaF, 1% de Nonidet-P40, 1% de Triton X-100, 3 mM de diisopropil fluorofosfato, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de inhibidor de tripsina, 10 µg/ml de TPCK, 10 µg/ml de captopril, 1mM de benzimidina, 1 mM de PMSF, 10 mM de iodoacetamida, 2 mM de ortovanadato sódico y 100 µM de óxido de fenilarsina (PAO).

- Tampón de lisis en experimentos sobre fosforilación de ERK 1/2 y JNK 1/2: 20 mM de Tris-HCl pH 7.4, 50 mM de β-mercaptoethanol, 2 mM de EDTA, 25 mM de NaF, 1% de Nonidet p-40, 1% de Triton X-100, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de inhibidor de tripsina, 10 µg/ml de TPCK, 10 µg/ml de captopril, 1mM de benzimidina, 1 mM de PMSF, 10 mM de iodoacetamida, 2 mM de ortovanadato sódico y 100 µM de óxido de fenilarsina (PAO).

- Tampón de lisis en experimentos sobre expresión de HO-1: 50 mM de Tris-HCl a pH 7.4, 10 mM de EDTA, 50 mM de NaF, 10% de glicerol, 1% de Triton X-100, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de inhibidor de tripsina, 10 µg/ml de TPCK, 10 µg/ml de captopril, 1mM de benzimidina, 1 mM de PMSF, 10 mM de iodoacetamida, 2 mM de ortovanadato sódico y 100 µM de óxido de fenilarsina (PAO).

- Tampón de lisis en experimentos sobre expresión de la calcineurina CN: 50 mM de Tris-HCl a pH 7.5, 0.1 mM de EGTA, 1 mM EDTA, 0.5 mM de DTT, 0.2% de Triton X-100, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de inhibidor de tripsina, 10 µg/ml de TPCK, 10 µg/ml de captopril, 1mM de benzimidina, 1 mM de PMSF, 10 mM de iodoacetamida, 2 mM de ortovanadato sódico y 100µM de óxi do de fenilarsina (PAO).

Procedimiento:

Las células se centrifugan a 400 x g durante 5 min a 4°C. Los precipitados celulares se lavan dos veces por resuspensión en 1 ml de PBS frío, seguido de una centrifugación a 400 x g durante 5 min a 4°C. Seguidamente, los precipitados celulares obtenidos se resuspenden en la solución de lisis apropiada (10⁶ células) y se mantienen en hielo durante 30 min, agitando cada 5 min. Después, las muestras se sonicen, en hielo, tres veces a 12 microns durante 2 seg. Las suspensiones resultantes se centrifugan a 12,000 x g durante 5 min a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos, que corresponden a las proteínas celulares totales, se dividen en dos fracciones: una alícuota se utiliza para cuantificar la concentración de proteínas, y el resto se usa en las técnicas de análisis de proteínas (ver sección XIII).

VIII.2. Aislamiento de proteínas de membrana

Soluciones de lisis:

– Tampón de lisis sin detergente: 100 mM de HEPES a pH 7.3, 100 mM de KCl, 3 mM de ClNa, 3 mM de MgCl₂, 1.25 mM de EGTA, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de inhibidor de tripsina, 10 µg/ml de TPCK, 10 µg/ml de captopril, 1mM de benzimidina, 1 mM de PMSF, 10 mM de iodoacetamida, 2 mM de ortovanadato sódico y 100 µM de óxido de fenilarsina (PAO).

– Tampón de lisis con detergente: 120 mM de NaH₂PO₄ pH 7.4, 1 mM de MgCl₂, 1 mM de EGTA; 20% de glicerol, 1 mM de ditioneitol, 40 mM de n-octilglucósido, 600 mM KCl, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de inhibidor de tripsina, 10 µg/ml de TPCK, 10 µg/ml de captopril, 1mM de benzimidina, 1 mM de PMSF, 10 mM de iodoacetamida, 2 mM de ortovanadato sódico y 100µM de óxido de fenilarsina (PAO).

Procedimiento:

Las células se centrifugan a 400 x g durante 5 min a 4°C. Los precipitados se lavan dos veces por resuspensión en 1 ml de PBS frío, seguido de una centrifugación a 400 x g durante 5 min a 4°C. Seguidamente, los precipitados celulares obtenidos se resuspenden en tampón de lisis sin detergente (10µl por cada 10⁶ células) y se mantienen en hielo durante 30 min, agitando cada cierto tiempo. Después, las muestras se sonicen, en hielo, tres veces a 12 microns durante 2 seg. Las suspensiones resultantes se centrifugan a 12,000 x g durante 30 seg a 4°C, para eliminar restos y células no lisadas. Los sobrenadantes obtenidos se ultracentrifugan a 100,000 x g durante 30 min a 4°C. Tras este proceso, el sobrenadante representa la fracción citosólica y los precipitados

resultantes corresponden a la fracción de membranas. Los precipitados se lavan dos veces con 100 µl de tampón de lisis sin detergente. Seguidamente, los precipitados se resuspenden en 50 µl de tampón de lisis con detergente y se mantienen en hielo durante 30 min, agitando cada cierto tiempo. Las muestras se sonicen, en hielo, tres veces a 12 microns durante 2 seg. Después, las muestras se centrifugan a 12,000 x g durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos, que corresponden a las proteínas de membranas solubilizadas, se dividen en dos fracciones: una alícuota se utiliza para cuantificar la concentración de proteínas, y el resto se usa en las distintas técnicas de análisis de proteínas (ver sección XIII).

VIII.3. Aislamiento de proteínas citosólicas y de núcleo

Soluciones:

- Tampón de lisis hipotónico: 20 mM HEPES pH 7.9, 10 mM de KCl, 3 mM ortovanadato sódico, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 mM NaF, 10% glicerol, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de inhibidor de tripsina, 10 µg/ml de TPCK, 10 µg/ml de captopril, 1mM de benzimidina, 1 mM de PMSF, 10 mM de iodoacetamida, y 100 µM de óxido de fenilarsina (PAO).

- Tampón de lisis hipertónico: 20 mM HEPES pH 7.9, 10 mM de KCl, 3 mM ortovanadato sódico, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 mM NaF, 20% glicerol, 420 mM NaCl, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de inhibidor de tripsina, 10 µg/ml de TPCK, 10 µg/ml de captopril, 1mM de benzimidina, 1 mM de PMSF, 10 mM de iodoacetamida, y 100 µM de óxido de fenilarsina (PAO).

Procedimiento:

Las células se recogen y centrifugan a 400 x g durante 5 min a 4°C. Los precipitados se lavan dos veces por resuspensión en 1 ml de PBS frío y centrifugación a 400 x g durante 5 min a 4°C. Seguidamente, los precipitados celulares obtenidos se resuspenden en tampón de lisis hipotónico (10µl por cada 10⁶ células) y se mantienen en hielo durante 30 min, agitando cada cierto tiempo. Al término de este tiempo se añade a cada muestra 0.6% de Nonidet P-40 y se agitan durante 10 seg. A continuación se centrifuga a 12,000 x g durante 10 min. a 4°C. El sobrenadante resultante es el extracto citosólico y se puede usar en las distintas técnicas de análisis de proteínas (ver sección XIII), mientras que el precipitado corresponde a los núcleos. Este precipitado se lava dos veces con tampón de lisis hipotónico con 0.6% de Nonidet P-40, y se centrifuga a 12,000 x g durante 1 min a 4°C. El precipitado se resuspende en tampón de lisis hipertónico y se mantienen en hielo durante 30 min, agitando cada cierto tiempo. Las muestras se sonicen en hielo tres

veces a 12 microns durante 2 seg. Después, las muestras se centrifugan a 12,000 x g durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos, que corresponden a las proteínas solubilizadas de núcleos, se dividen en dos fracciones: una alícuota se utiliza para cuantificar la concentración de proteínas, y el resto se usa en las distintas técnicas de análisis de proteínas (ver sección XIII).

IX. Cuantificación de la concentración de proteínas

Se basa en el método diseñado por Bradford (215). Este método se fundamenta en el desplazamiento de la longitud de onda máxima de absorción, de 465 a 595 nm, que experimenta el azul de Coomassie G-250 cuando se une a proteínas. La cuantificación de la medida colorimétrica necesariamente debe referirse a una recta de calibrado, obtenida a partir de unas concentraciones conocidas de proteínas. El contenido proteico del extracto problema se calcula por interpolación en dicha recta.

Soluciones:

– Reactivo Bradford: 10 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Merck) disueltos en 5 ml de etanol al 95%, 10 ml de ácido ortofosfórico al 85% y H₂O_{dd} hasta completar un volumen de 100 ml.

Procedimiento:

El único reactivo que se emplea para esa técnica es el reactivo de Bradford. El calibrado se realiza a partir de una disolución de albúmina de suero bovino (BSA) de 0.1 µg/ml de BSA, mediante el siguiente protocolo. En pocillos rotulados como B, 1, 2, 3, 4, y 5, de una microplaca de 96 pocillos, se añaden por duplicado las cantidades indicadas a continuación:

	B	1	2	3	4	5
BSA (0.1 µg/ml)	-	5 µl	10 µl	15 µl	20 µl	25 µl
R. Bradford	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
H ₂ O dd	50 µl	45 µl	40 µl	35 µl	30 µl	25 µl
[prot] µg/250 µl		0.5	1.0	1.5	2.0	2.5

Tabla: 1. Condiciones para la realización de la curva de calibrado

Se agita suavemente y se espera el desarrollo del color, durante 5-10 min a temperatura ambiente. Se mide la absorbancia a 595 nm frente al blanco, y se representa gráficamente la absorbancia (media de los duplicados) a 595 nm frente a la

concentración final de proteína. Se representa la ecuación de la recta y se calcula la pendiente “a” de la misma.

Para cuantificar el contenido proteico del extracto celular se toman 2 µl del mismo y se diluyen en un tubo “ependorf” hasta 20 µl con H₂Odd (dilución 1:10). En esta dilución se cuantifica el contenido de proteínas, como sigue: en pocillos de una microplaca de 96 pocillos se añade (por duplicado) 198 µl de reactivo de Bradford, 50 µl de H₂Odd y 2 µl de extracto celular diluido. Se agita suavemente y se espera el desarrollo del color durante 5-10 minutos. Se mide la absorbancia a 595 nm. Se interpolan los datos obtenidos en la recta de calibrado, obteniéndose los resultados a partir de la siguiente fórmula:

$$\frac{\bar{X} \text{ absorbancia}_{595} \text{ muestra diluida} - \bar{X} \text{ absorbancia}_{595} \text{ blanco}}{\text{pendiente recta "a"}}$$

Por último, sólo falta multiplicar los resultados por el factor de dilución del extracto (10 en nuestro caso) y dividirlo entre el número de µl añadidos en el pocillo (2 en nuestro caso). De esta forma obtenemos la concentración de proteínas expresada en µg/ µl.

X. Análisis de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

X.1. Preparación de muestras

Soluciones:

– Tampón de carga “Laemmli (x4)”: 62.5 mM de Tris-HCl a pH 6.8, 10% de glicerol, 2% de SDS, 0.001% de azul de bromofenol y 5% de 2-β-mercaptoetanol.

Procedimiento:

Las muestras se mezclan con tampón de carga Laemmli de la siguiente forma: al volumen de la muestra se le añade 1/3 de ese volumen en tampón de carga Laemmli (x4). Después, las muestras se incuban a 95°C durante 5 min para reducir los enlaces disulfuros entre las subunidades. Las muestras se centrifugan a 12,000 x g durante 5 min a 4°C, precipitando así los restos no disueltos (ADN, membranas, etc..). Finalmente, las muestras se conservan a –80°C hasta su uso.

X.2. Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación de proteínas está realizada tal como se describe en (210).

Soluciones:

- Tampón de lisis: 50mM Tris-HCl a pH 7.4, 300 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 1 % de tritón X-100, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de inhibidor de tripsina, 10 µg/ml de TPCK, 10 µg/ml de captopril, 1mM de benzimidina, 1 mM de PMSF, 10 mM de iodoacetamida, y 100 µM de óxido de fenilarsina (PAO).

- Tampón de unión al anticuerpo: 80 mM de Tris-HCl a pH 7.5, 200 mM de KCl, 4 mM de EDTA, 4 mM de DTT, 0.4 % de NP-40, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de inhibidor de tripsina, 10 µg/ml de TPCK, 10 µg/ml de captopril, 1mM de benzimidina, 1 mM de PMSF, 10 mM de iodoacetamida, y 100 µM óxido de fenilarsina (PAO).

Procedimiento:

Después del tratamiento, las células fueron recogidas por un pulso de centrifugación y lisadas en 250 µl de tampón de lisis, dejándolas en hielo durante 30 min, agitando cada 5 min. Las muestras se sonicán, en hielo, tres veces a 12 microns durante 2 seg. Después, las muestras se centrifugan a 10,000 x g durante 5 min a 4°C. A 200µl de sobrenadante se le añade 200 µl de tampón de unión al anticuerpo, y 2 µg de anticuerpo y se deja en incubación a 4°C en agitación durante toda la noche. Después, se añade 40 µl de A-Sepharosa y se deja en agitación otras 4 h a 4°C. Se centrifuga a 10,000 x g durante 5 min y se lavan los precipitados con tampón de lisis 2 o 3 veces. Finalmente, se le añade al precipitado 30µl de tampón de carga Laemmli (x1) y se continúa con la electroforesis de forma habitual, en el punto de electroforesis. Los complejos inmunes se lavaron cinco veces con tampón de lisis frío y las proteínas se extrajeron calentando hasta ebullición en tampón Laemmli 1x. Después de la electroforesis y la transferencia, las membranas se incubaron con los anticuerpos para fosfoserina o para LXR como se indica.

X.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

El sistema empleado es una electroforesis discontinua, que utiliza dos tipos de geles: un gel concentrador (de poros grandes) en la zona superior, y un gel separador (de poros pequeños) en la zona inferior. La concentración de acrilamida del gel separador depende del peso molecular de la proteína a analizar: Así, gel separador al 7.5%, en los experimentos con proteínas con mayor peso molecular; gel separador al 10%, en los experimentos con proteínas de peso medio, como en la fosforilación de MAPKs y gel separador al 12.5%, en los experimentos con proteínas de menor peso.

Soluciones:

– Gel separador de acrilamida al 7.5%: 2.5 ml de acrilamida:bis-acrilamida (29.2:0.8), 4.4 ml de H₂O, 2.5 ml de Tris-HCl 1.5 M a pH 8.8, 100 µl de SDS al 10%, 50 µl de persulfato amónico al 10%, 5 µl de TEMED.

- Gel separador de acrilamida al 10%: 3.3 ml de acrilamida:bis-acrilamida (29.2:0.8), 3.5 ml de H₂O_{dd}, 2.5 ml de Tris-HCl 1.5 M a pH 8.8, 100 µl de SDS al 10%, 50 µl de persulfato amónico al 10%, 5 µl de TEMED.
- Gel separador de acrilamida al 12.5%: 4.16 ml de acrilamida:bis-acrilamida (29.2:0.8), 2.73 ml de H₂O_{dd}, 2.5 ml de Tris-HCl 1.5 M a pH 8.8, 100 µl de SDS al 10%, 50 µl de persulfato amónico al 10%, 5 µl de TEMED.
- Gel concentrador: 430 µl de acrilamida:bis-acrilamida (29.2:0.8), 1.88 ml de H₂O_{dd}, 830 µl de Tris-HCl 0.5 M a pH 6.8, 33 µl de SDS al 10%, 16 µl de persulfato amónico al 10%, 3.3 µl de TEMED.
- Tampón de electroforesis: 25 mM de Tris-HCl a pH 8.3, 192 mM de glicina y SDS al 0.1%.

Procedimiento:

Los geles se prepararon utilizando el Miniprotean II de Bio-Rad. Para ello, primero es preparado la solución separadora dejándola polimerizar en el sistema. Para evitar el efecto inhibitorio del oxígeno atmosférico sobre la polimerización se añade 1 o 2 ml de mezcla 1:1 de agua-isobutanol sobre la solución. Una vez polimerizado, se elimina el agua-isobutanol, se lavaba varias veces con agua y se añade sobre el gel la solución del gel concentrador, en el cual se construían los pocillos para las muestras con un peine que se colocaba antes de la polimerización y que se retiraba tras esta. Una vez preparados, los geles se introducen en una cubeta llena de tampón de electroforesis. Después, las muestras se depositan en cada pocillos del gel concentrador, cargando la misma cantidad de proteínas (50-80 µg). También en uno de los pocillos se carga una solución comercial con una mezcla de proteínas conocidas (como marcador de peso molecular). Seguidamente, los geles se someten una corriente eléctrica con voltaje constante de 100-150V durante 1 ó 2 h. La electroforesis se detiene cuando el frente de desplazamiento se sitúa aproximadamente a 5 mm del límite inferior del gel.

XI. Transferencia de proteínas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF)

Las transferencias se realiza por el método conocido como “semi-seco”. El voltaje y la duración de la transferencia depende del peso molecular de la proteína a analizar: 10-15V durante 35-45 min.

Soluciones:

- Tampón de transferencia: 25 mM de Tris base, 192 mM de glicina y metanol al 20%.

Procedimiento:

En primer lugar, las membranas de PVDF se activan por incubación en metanol absoluto durante 30 seg. Después, las membranas junto con los otros elementos necesarios para la transferencia (gel de electroforesis y papeles de filtro) se incuban en tampón de transferencia durante 5-10 min. Siguiendo las instrucciones del fabricante, los distintos elementos se ensamblan en el dispositivo de transferencia, evitando la formación de burbujas de aire. La transferencia se inicia con la aplicación de una corriente eléctrica con voltaje constante. Una vez completada y siguiendo el protocolo de detección rápida de proteínas descrito por Mansfield, las membranas se lavan dos veces en H₂Odd durante 5 min para eliminar el exceso de sales. A continuación, las membranas se incuban en metanol absoluto durante 30 seg y se secan a temperatura ambiente durante 1-2 h o bien a 37°C durante 30 min.

XII. Análisis de proteínas por inmunodetección

XII.1. Incubación de las membranas de PVDF con anticuerpos

Soluciones:

- Solución para anticuerpos específicos o primarios: PBS suplementado con 0.5% de BSA y 0.02% de Tween-20.
- Solución para anticuerpos secundarios: PBS suplementado con 0.5% de caseína.

Anticuerpo	Origen	Dilución	Incubación	Dilución 2º	Incubación 2º
p-ERK 1/2	conejo	1:1000	toda la noche 4°C	1:3000	1 h
ERK 1/2	conejo	1:1000	toda la noche 4°C	1:3000	1 h
p-p38MAPK	conejo	1:2000	5 h	1:10000	1 h
p-JNK 1/2	ratón	1:1000	2 h	1:5000	1 h
p47 ^{phox}	cabra	1:3000	3 h	1:10000	30 min
p67 ^{phox}	cabra	1:2000	2 h	1:10000	30 min
p-AMPK	conejo	1:1000	toda la noche 4°C	1:2000	1 h
HO-1	conejo	1:1000	toda la noche 4°C	1:10000	30 min
calcineurina	conejo	1:5000	1 h	1:10000	30 min
GAPDH	ratón	1:5000	30 min	1:20000	30 min
Nrf2	conejo	1:5000	2 h	1:10000	30 min
β-actina	conejo	1:1000	2 h	1:10000	1 h

Tabla: 2. Condiciones de incubación con los anticuerpos.

Procedimiento:

Las membranas se incuban a 4°C durante toda una noche o a temperatura ambiente durante 1 o varias horas (según tabla) con el anticuerpo específico, o primario, a la dilución apropiada. Tras este periodo se lavan tres veces en PBS durante 5 min. Después, las membranas se incuban a temperatura ambiente durante el tiempo correspondiente (según la Tabla 2) con el anticuerpo secundario correspondiente (conejo, ratón o cabra). A continuación se repiten los lavados en PBS.

XII.2. Revelado de bandas inmunoreactivas mediante luminol.

Esta técnica es similar a la usada por el método ECL de Amersham. La técnica se basa en la formación de un producto quimioluminiscente, derivado del luminol, cuando este reacciona con el H₂O₂, en una reacción catalizada por la peroxidasa. Se usa el 4-iodofenol (4-IP) como amplificador de la reacción. Como muestra la Figura 22, en presencia de 4-IP las cpm son del orden de 100.000 veces mayores que en ausencia de 4-IP.

Soluciones:

- Solución sustrato: 10 mM de Tris-HCl a pH 8.5, 2.25 mM de luminol, 0.45 mM de 4-iodofenol y H₂O₂ al 0.015%.
- Solución de ácido acético al 1%.

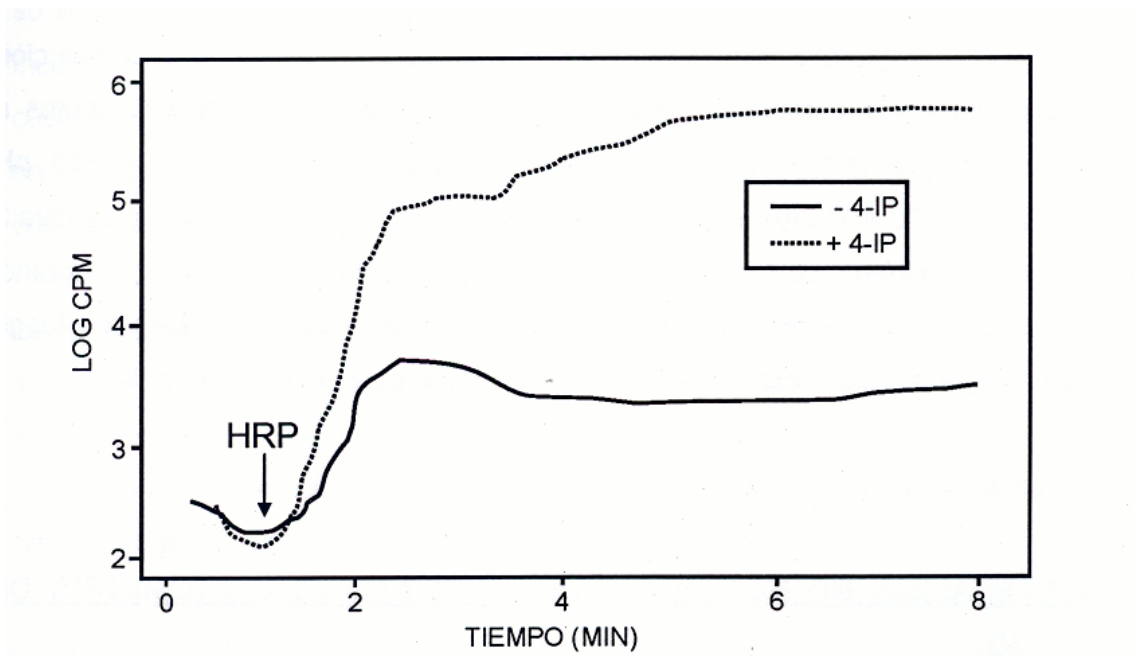


Figura: 22. Incremento de luminiscencia en presencia de iodofenol (4-IP)

El 4-iodofenol se disuelve en 5 ml de 10 mM Tris-HCl, pH 8.3. Para ello hay que agitarlo de 15 a 30 minutos hasta la disolución completa. El luminol (4 mg) se disuelve en 50 µl de NaOH 1N y luego se completa hasta 5 ml con 10 mM Tris-HCl, pH 8.3. Como precaución hay que evitar la exposición del luminol a la luz. Se mezclan 5 ml del 4-IP, con 5 ml de luminol y 5 µl de H₂O₂ al 30%. La membrana se incuba en la solución preparada, durante 1 min a temperatura ambiente. Se escurre la membrana del exceso de la solución, se coloca entre un papel de filtro y plástico y se expone a una película de rayos X. Tras un periodo de exposición de 1 a 5 min, se extraen las películas y se revelan por incubación en solución de revelado, ácido acético al 1%, H₂O₂ y solución fijadora, consecutivamente.

XII.3. Eliminación de anticuerpos de una membrana (“stripping”).

En algunos experimentos una misma membrana se utiliza consecutivamente para detectar dos proteínas distintas. Por ejemplo, usando un anticuerpo que reconoce a una proteína que no varía su expresión con los tratamientos usados, y que por tanto sirve como control de carga (GAPDH), o una misma proteína en dos formas distintas. En este caso, cuando los anticuerpos primarios que reconocen nuestras proteínas dianas tienen en común la misma fuente, es decir, los dos proceden de ratón o de conejo, es necesario que antes de la incubación con el nuevo anticuerpo se realice la eliminación del primer anticuerpo utilizado.

Soluciones:

– Tampón de limpieza (“stripping”): 62.5 mM de Tris-HCl a pH 6.8, SDS al 2% y 100 mM de 2-β-mercaptoetanol.

Procedimiento:

Las membranas se lavan tres veces en PBS durante 10 min. Después, se incuban a 37°C durante 30-45 min en tampón de limpieza (“stripping”) (62.5 mM de Tris-HCl a pH 6.8, 2 mM de EDTA, 100 mM de 2-β-mercaptoetanol). Tras este periodo, las membranas se vuelven a lavar en PBS, se incuban en metanol absoluto durante 30 seg, y se secan a temperatura ambiente durante 1-2 h o a 37°C durante 30 min. A continuación, las membranas se incuban con los anticuerpos apropiados y se realiza el análisis de quimioluminiscencia para detectar las bandas específicas (como se ha indicado anteriormente).

XII.4. Cuantificación de los niveles de proteína detectados

Los niveles relativos de proteína, obtenidos por inmunodetección, se cuantificaron por densitometría. Para ello, las películas fotográficas se someten a un “scanner”, y las

densidades relativas de cada una de las bandas se analizaban utilizando el programa Scion Image. Los valores, expresados en unidades relativas, representan la media \pm E.S.M. de los niveles de la proteína en cuestión normalizados a valores control (GAPDH) de al menos tres experimentos independientes.

XIII. Análisis de expresión de ARN mensajeros (ARNm) por RT-PCR

XIII.1. Obtención del ARN celular total

La extracción del ARN debe hacerse en las máximas condiciones de esterilidad y ausencia de ARNasas. El H₂Odd utilizada en todo el proceso de ARN debe ser tratada con dietilpircarbonato (DEPC) y autoclavada. El DEPC es utilizado como potente inhibidor de ARNasas. Se prepara diluyéndolo al 0.1% en H₂Odd durante 12 h y en agitación, para permitir una incorporación completa del producto. A continuación se autoclava la solución con el fin de destruir el DEPC, que a la temperatura y presión de la autoclave se degrada a dióxido de carbono y etanol, ambos productos muy volátiles. Todas las soluciones que estén en contacto con el ARN se preparan en H₂Odd-DEPC. También todo el material que se utilice será exclusivo para el aislamiento del ARN y lavado con H₂Odd-DEPC y los reactivos deberán ser grado “biología molecular” y estar libre de ARNasas.

El ARN total de las células se extraía utilizando el método descrito por Chomczynski y cols. (216).

Soluciones:

- Tampón fosfato salino (PBS).
- Solución de extracción: 4 M de isotiocianato de guanidinio a pH 7.0, 25 mM de citrato sódico, 0.5% de N-lauril-sarcosil y 100 mM de 2- β -mercaptoetanol.
- Acetato sódico 2 M a pH 4.0.
- Solución de cloroformo:isoamilalcohol (dilución 49:1)
- Etanol al 75%.

Procedimiento:

Las células se recogen y centrifugan a 400 x g durante 5 min a 4°C. Los precipitados se lavan dos veces por resuspensión en 1 ml de PBS frío y centrifugación a 400 x g durante 5 min a 4°C. Seguidamente, los precipitados celulares obtenidos se resuspenden en 500 μ l de solución de extracción y se añaden, consecutivamente, 50 μ l de 2 M de acetato sódico, 500 μ l de fenol y 100 μ l de solución de cloroformo:isoamilalcohol. Entonces, las muestras se agitan vigorosamente durante 1 min y se mantienen a 4°C durante 20 min. Tras este periodo, las muestras se centrifugan a 13,000 x g durante 20 min a 4°C.

Después, las fases superiores de los gradientes formados se extraen y colocan en tubos limpios, donde se diluyen con isopropanol a -20°C (en una relación 1:1). A continuación, las muestras se incuban a -20°C durante 30 min. Tras este periodo, se centrifugan a $13,000 \times g$ durante 10 min a 4°C . Los precipitados obtenidos nuevamente se resuspenden en $300 \mu\text{l}$ de solución de extracción, se diluyen con isopropanol a -20°C (1:1), y se incuban a -20°C durante 30 min. Después, se centrifugan a $13,000 \times g$ durante 10 min a 4°C . Seguidamente, los precipitados se disuelven con $500 \mu\text{l}$ de etanol al 75% a -20°C , se agitan y se dejan a temperatura ambiente durante 10 min. Y se centrifugan a $13,000 \times g$ durante 10 min a 4°C . Posteriormente, y tras descartar los sobrenadantes, las muestras se secan en un liofilizador durante 5-10 min a 37°C , y se disuelven en $60 \mu\text{l}$ de H_2O dd DEPC 0.1% por calentamiento a 68°C durante 5 min. Las muestras obtenidas, que corresponden a ARN celular total, se dividen en dos fracciones: una alícuota se utiliza para cuantificar la concentración de ARN por espectrofotometría, y el resto se usa para el análisis de expresión del ARNm.

XIII.2. Cuantificación de la concentración de ARN.

Procedimiento:

La concentración de ARN de las muestras se cuantifica midiendo en un espectrofotómetro la absorbancia (A) a una longitud de onda de 260 nm, y a 280 nm, empleando la siguiente fórmula:

$$[\text{ARN}](\mu\text{g}/\text{ml}) = A_{260} \times 44.19 \times \text{dilución}$$

La pureza de las muestras se estima por la relación A_{260}/A_{280} , considerándose correcto un valor entre 1.7 y 1.9.

XIII.3. Eliminación de la contaminación de ADN con ADNasa I

Este es un punto crucial en la extracción de ARN, ya que cualquier contaminación con ADN produciría resultados erróneos en la amplificación por PCR. La ADNasa I digiere cadenas simples y dobles de ADN.

Soluciones:

- Tampón de reacción de ADNasa I: 200 mM Tris-HCl pH 8.4, 20 mM de MgCl_2 y 500 mM de KCl.
- 25 mM de EDTA pH 8.

Procedimiento:

Se añade $8 \mu\text{l}$ de muestra de ARN diluida en H_2O dd DEPC 0.1% con $1 \mu\text{l}$ de ADNasa I $1 \text{ U}/\mu\text{l}$ y $1 \mu\text{l}$ de tampón de reacción de la ADNasa I, y se incuba durante 15 min a

temperatura ambiente. Después se añaden μl de EDTA 25 mM, para inactivar la ADNasa I, y se incuba durante 10 min. a 65°C .

XIII.4. Transcripción inversa del ARN a ADN complementario (ADNc)

Soluciones:

– Mezcla de reacción: 100 U de transcriptasa inversa M-MLV-RT (Promega), 1 mM de cada uno de los cuatro nucleótidos, $2.5 \mu\text{M}$ de cebadores aleatorios, 1 mM de DTT y 20 U de inhibidor de ribonucleasa Rnasin (Promega).

Procedimiento:

Las muestras se diluyen a razón de $2 \mu\text{g}$ de ARN en $24 \mu\text{l}$ de H_2O . Tubos con $24 \mu\text{l}$ de H_2O y sin ARN se utilizan como los blancos de reacción. Muestras y blanco se incuban a 68°C durante 5 min, y se enfrían rápidamente a 4°C , para así eliminar estructuras secundarias. A continuación se les añaden $16 \mu\text{l}$ de mezcla de reacción y se incuban a 37°C durante 1 h. Tras este periodo, el resultado en las muestras corresponde al ADNc.

XIII.5. Amplificación del ADNc por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real.

Soluciones:

- Mezcla maestra de Power SYBR Green conteniendo: SYBR® Green, ADN polimerasa (AmpliTaqa Gold®), dNTPs con una combinación dUTP/dTTP, fluorescencia de referencia (Rox) y componentes del tampón optimizado.
- Cebadores específicos (directo y reverso) 300 nM cada uno.
- Muestras de ADNc; 100 ng por condición.

La reacción de amplificación se realiza en un termociclador ABI Prism 7300 (Applied-Biosystems, California, EEUU).

Procedimiento:

Se lleva a cabo por triplicado en placas de 96 pocillos, en un volumen final de $50 \mu\text{l}$ para cada réplica, usando el kit comercial “QuantiTect SYBR Green PCR”. Para ello, en cada pocillo se mezclan; $4 \mu\text{l}$ de ADNc (cuya concentración debe ser de 2.5 ng/ml) con 5 pmoles de cada cebador, $25 \mu\text{l}$ de SYBR Green máster-mix comercial (contiene la Taq polimerasa, el tampón de reacción, los dNTPs y el SYBR Green) y el resto de H_2O libre de RNAasas.

Los cebadores utilizados para amplificar los genes que se indican y los tamaños de banda obtenidos tras la amplificación fueron los siguientes:

- Cebadores específicos de la LXR α :

LXR α directo: 5'-AAGCCCTGCATGCCTACGT-3'

LXR α reverso: 5'-TGCAGACGCAGTGCAAACA-3'

- Cebadores específicos de la LXR β :

LXR β directo: 5'-TCGTGGACTTCGCTAAGCAA-3'

LXR β reverso: 5'-GCAGCATGATCTCGATAGTGGA-3'

- Cebadores específicos de la β -actina:

β - actina directo: 5'-CCAGCTCACCATGGATGATG-3'

β - actina reverso: 5'-ATGCCGGAGCCGTTGTC-3'

- Cebadores específicos de la ABCA1:

ABCA1 directo: 5'-CCCTGTGGAATGTACCTATGTG-3'

ABCA1 reverso: 5'-GAGGTGTCCCAAAGATGCAA-3'

- Cebadores específicos de la ABCG1:

ABCG1 directo: 5'-CAGTCGCTCCTTAGCACCA-3'

ABCG1 reverso: 5'-TCCATGCTCGGACTCTCTG-3'

- Cebadores específicos de la SREBP1c:

SREBP1c directo: 5'-TCAGCGAGGCGGCTTTGGAGCAG-3'

SREBP1c reverso: 5'-CATGTCTTCGATGTCCGGTCAG-3'

Las condiciones de amplificación usadas en el termociclador fueron:

10 minutos/95° C	}	40 ciclos
15 segundos / 95° C		
1 minuto/ 60° C		
20 minutos/ 60 → 95° C (disociación)		

XIII.6. Cuantificación de la expresión génica a partir de la PCR a tiempo real.

Para la cuantificación relativa de la expresión génica se usa el valor C_T , que representa el primer ciclo de PCR en el que se detecta una fluorescencia cuyo valor es 10 veces superior a la desviación estándar del ruido de fondo basal.

Procedimiento:

A la media de los valores C_T de cada condición experimental de nuestro gen problema se le sustrae la media de los valores C_T de cada condición experimental de nuestro gen interno (en nuestro caso el del β -actina), obteniéndose unos valores que se denominan ΔC_T . A continuación se calculan los valores $\Delta \Delta C_T$, que se obtienen al restar a un

calibrador (que en nuestro caso consideramos el valor ΔC_T de las células sin estimular) cada uno de los valores ΔC_T obtenidos anteriormente. Por último basta sólo emplear la fórmula $2^{-\Delta C_T}$ y representar los valores obtenidos

XIV. Ensayo de migración celular

La migración celular se evalúa en la cámaras de migración Transwell (diámetro 6.5 mm, tamaño del poro 5 μ m; Placas Costar tipo 3421). Los quimioatrayentes se depositan en el compartimiento inferior en un volumen final de 0,6 ml de medio RPMI 1640, y las placas se precalientan a 37 ° C. A continuación, 0,1 ml de medio que contiene 10^6 neutrófilos se deposita sobre cada inserto desmontable, que se coloca sobre la solución quimioatrayente. Las cámaras cargadas se incuban durante 2 horas a 37 ° C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ en aire. En pocillos separados adicionales, se añaden los neutrófilos en el compartimiento inferior y se utilizan como controles que representan la migración 100%. Al final del periodo de incubación, se recogen y se centrifugan las células que habían emigrado a las cámaras inferiores. Después de la tinción con anticuerpos monoclonales conjugados con FITC para CD16 (Immunotech, Marsella, Francia), las células se fijan con paraformaldehído al 1% y, finalmente, se cuentan en un citómetro de flujo. Los resultados se presentan como la media \pm SEM de tres experimentos separados, y se expresan como el porcentaje de neutrófilos totales inicialmente añadidos a cada cámara.

XV. Salida del colesterol

Los ensayos se realizan como en 44 (82) con algunas modificaciones. Las células se lavan y se incuban durante 5 h en medio RPMI 1640 suplementado con 0,2% de BSA con (2,0 Ci / ml) [3H] colesterol. Posteriormente, las células se lavan dos veces con PBS y se incuban durante 15 horas en medio RPMI que contiene 0,2% de BSA más los ligandos indicados (1 mM o 10 mM T0901317 15dPGJ2) más ApoAI (15 g/ml), pero que carece de colesterol radiomarcado. Una parte del medio se retira y se centrifuga a $14.000 \times g$ durante 2 min, y se determina la radiactividad por recuento de centelleo líquido. La radiactividad total asociada a las células se determina por disolución de las células en isopropanol. Cada ensayo se realiza por triplicado.

XVI. Cuantificación de la liberación de IL-8 por enzimoimmunoanálisis (ELISA)

Los sobrenadantes de los cultivos celulares se recogen después de los tratamientos, y los niveles de IL-8 secretada se cuantifican utilizando el método de enzimoimmunoanálisis, ELISA, con el estuche para la IL-8 humana (RayBiotech, Norcross, GA). Las placas se

leen en un espectrofluorímetro Victor₂ Wallac 1420 (Perkin Elmer, Madrid, España). La reacción da lugar a un cambio de color en la muestra que se cuantifica con un espectrofotómetro. Igualmente se expresó en pg/ml. Rango de sensibilidad de 1 a 240 pg/ml.

XVII. Detección de la apoptosis celular

La apoptosis medida como la fragmentación del DNA se analiza usando el estuche de detección de muerte celular ELISA^{plus} de Roche Applied Science (Barcelona, Spain), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como control positivo, las células se tratan con estaurosporina.

XVIII. Análisis de proteínas por inmunocitoquímica.

La traslocación nuclear de la subunidad NF- κ B p65 en neutrofilos humanos se determinó por tinción celular con inmunofluorescencia, como se describe previamente en con algunas modificaciones.

Procedimiento:

Los linfocitos (2×10^6 células/ml) se recogen por centrifugación a 400 x g durante 5 min a 4°C. Los precipitados se lavan dos veces por resuspensión en 1 ml de PBS frío y centrifugación 400 x g durante 5 min a 4°C. Seguidamente los precipitados se resuspenden en 300 μ l de PBS y se extienden sobre cubres cubiertos de poli-L-lisina. Los cubres se incuban en la estufa de cultivo, a 37° C, durante 15 min y luego se lavan con PBS. Tras el lavado, se fijan con paraformaldehído al 2% (en PBS) por 10 minutos y luego se vuelven a lavar con tampón PBS. A continuación se bloquean y permeabilizan, durante 15 min, a temperatura ambiente, con PBS conteniendo 1% BSA y 0.1 % Tritón X-100, tras lo cual se vuelven a lavar con PBS. Seguidamente se incuban con anti-p65 IgG de ratón a una dilución 1:100 en tampón PBS durante toda la noche a 4°C, y luego se lavan nuevamente, por dos veces, con PBS. A continuación se marcan con anticuerpo secundario (IgG de anti IgG de ratón unido a isotiocianato de fluoresceína (FITC) a dilución 1:100 en PBS) durante 30 minutos, a temperatura ambiente, y se vuelven a lavar (2 veces) con PBS. Finalmente se montan sobre portas, usando como medio de montaje glicerol al 50% en PBS. Las células inmunomarcadas se visualizan y fotografían usando un microscopio de fluorescencia NIKON-EFD-3 (NIKON-IZASA, Barcelona, España).

XIX. Análisis estadístico

Los niveles de ARNm medidos por PCR real-time se expresan como veces inducción relativa a las células no tratadas (media \pm error estándar de la media (E.S.M) de un mínimo de tres experimentos independientes realizados con resultados similares. Los niveles de proteínas medidos de Western blots se expresan en unidades arbitrarias. Los resultados fueron estadísticamente analizados usando el programa Statgraphics Plus 5.0 (Manugistic Inc., Rockville, MD). El test de Student o el ANOVA “one-way” son los que se usan para hacer las comparaciones entre grupos. Los valores se expresan como la media \pm error estándar de la media (E.S.M).

RESULTS AND DISCUSSIONS

CAPÍTULO 1. 15-desoxi- Δ 12,14 –prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂) regula la expresión del receptor hepático X (LXR) α a través del estrés oxidativo en neutrófilos humanos

El papel de los LXRs en la inducción de los programas transcripcionales que facilitan el transporte de colesterol está bien establecido. Aunque se ha informado que la activación de los LXRs por oxisteroles resulta en la producción específica de citoquinas pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno (ROS), los LXRs también muestran efectos antiinflamatorios en los macrófagos y en otras células inmunes, lo que aumenta el interés sobre las funciones complejas que los LXRs ejercen en la inflamación con el objetivo de abrir nuevas estrategias para el tratamiento de diferentes enfermedades inflamatorias crónicas tales como la artritis y la aterosclerosis. Aunque la mayoría de los estudios sobre los LXRs se han dedicado a los macrófagos y las células endoteliales, los neutrófilos humanos también juegan un papel importante en la patogénesis de la aterosclerosis, dada su capacidad para responder a oxisteroles exógenos y moléculas circulantes, especialmente bajo condiciones pro-inflamatorias. El efecto del estado inflamatorio en la expresión del LXR α no se ha estudiado en las células humanas y constituye el objetivo principal del presente trabajo. Una cuantificación relativa de ARNm de LXR y LXR β en los neutrófilos y los macrófagos humanos no tratados por medio de tiempo real de RT-PCR reveló que estos dos tipos de células expresan niveles basales comparables de ambos genes LXR. Sin embargo, se encontró que sólo el ARNm de LXR α fue inducido significativamente en los neutrófilos humanos por un ligando sintético, TO901317, mientras que el ARNm LXR β fue constitutivamente expresado por estas células y sus niveles se mantuvieron sin cambios. Además, cuando estos tipos celulares se estimulan con ligandos sintéticos, se activa la síntesis de ARNm de LXR α junto con la transcripción de los genes diana de LXR α , ABCA1, ABCG1 y SREBP1c.

Aunque por sí mismo no ejerce ningún efecto positivo o negativo sobre la expresión de ARNm del LXR se describe por primera vez que 15d-PGJ₂ fue capaz de inhibir la transcripción del mRNA del LXR α y de algunos de sus genes diana inducida por su ligando de una manera similar a otras moléculas pro-inflamatorias modelo, tales como la IL-8, TNF α e IL-1 β , en neutrófilos humanos. La inhibición de la expresión de ARNm de LXR α se correlacionó con la disminución de los niveles de la proteína LXR α en neutrófilos tratados con 15d-PGJ₂.

Por otra parte, en presencia de moléculas pro-oxidantes y antioxidantes se observó que las ROS intracelulares están involucradas en la inhibición de la síntesis de ARNm del LXR α , y de sus genes diana, ejercida por 15d-PGJ₂ en los neutrófilos tratados con TO901317. Cualquiera que sea la acción ejercida por los oxisteroles (es decir, pro- o anti-inflamatoria), los experimentos en este trabajo indican claramente que

la transcripción del LXR α se deprime bajo condiciones oxidantes. Además, los resultados de este trabajo revelaron que el efecto inhibitor de 15dPGJ₂ podría estar mediada por el estado de fosforilación del LXR α en forma dependiente de la activación de las MAPK quinasas ERK1/2.

También se muestra evidencia de que, bajo condiciones pro-oxidantes, el tratamiento por TO901317 fue capaz de inhibir la actividad de migración, la producción de ROS y la liberación de IL-8 en los neutrófilos inducida por 15d-PGJ₂, indicando que el estrés oxidativo podría cambiar una función celular mediada por LXR α importante para la resolución de los procesos de inflamación.

Transcription of Liver X Receptor Is Down-Regulated by 15-Deoxy-D^{12,14}-Prostaglandin J₂ through Oxidative Stress in Human Neutrophils

Gonzalo Alba¹, María Edith Reyes¹, Consuelo Santa-María², Remedios Ramírez¹, Isabel Geniz³, Juan Jiménez¹, José Martín-Nieto⁴, Elizabeth Pintado¹, Francisco Sobrino^{1*}

1 Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain, 2 Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain, 3 Distrito Sanitario Sevilla Norte, Servicio Andaluz de Salud, Sevilla, Spain, 4 Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, Alicante, Spain

Abstract

Liver X receptors (LXRs) are ligand-activated transcription factors of the nuclear receptor superfamily. They play important roles in controlling cholesterol homeostasis and as regulators of inflammatory gene expression and innate immunity, by blunting the induction of classical pro-inflammatory genes. However, opposite data have also been reported on the consequences of LXR activation by oxysterols, resulting in the specific production of potent pro-inflammatory cytokines and reactive oxygen species (ROS). The effect of the inflammatory state on the expression of LXRs has not been studied in human cells, and constitutes the main aim of the present work. Our data show that when human neutrophils are triggered with synthetic ligands, the synthesis of LXRA mRNA became activated together with transcription of the LXR target genes ABCA1, ABCG1 and SREBP1c. An inflammatory mediator, 15-deoxy-D^{12,14}-prostaglandin J₂ (15dPGJ₂), hindered T0901317-promoted induction of LXRA mRNA expression together with transcription of its target genes in both neutrophils and human macrophages. This down-regulatory effect was dependent on the release of reactive oxygen species elicited by 15dPGJ₂, since it was enhanced by pro-oxidant treatment and reversed by antioxidants, and was also mediated by ERK1/2 activation. Present data also support that the 15dPGJ₂-induced serine phosphorylation of the LXRA molecule is mediated by ERK1/2. These results allow to postulate that down-regulation of LXR cellular levels by pro-inflammatory stimuli might be involved in the development of different vascular diseases, such as atherosclerosis.

Citation: Alba G, Reyes ME, Santa-María C, Ramírez R, Geniz I, et al. (2012) Transcription of Liver X Receptor Is Down-Regulated by 15-Deoxy-D^{12,14}-Prostaglandin J₂ through Oxidative Stress in Human Neutrophils. PLoS ONE 7(10): e42195. doi:10.1371/journal.pone.0042195

Editor: Patricia T. Bozza, Fundação Oswaldo Cruz, Brazil

Received June 30, 2011; Accepted July 4, 2012; Published October 24, 2012

Copyright: © 2012 Alba et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Funding provided by the Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2006-13802) and the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (P08-CVI-03550) (P06-CTS-01936) Consejería de Salud, Junta de Andalucía (CS 0116/2007). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: fsobrino@us.es

Introduction

Liver X receptors (LXRs) are oxysterol-activated nuclear receptors active in different human and rodent cells, such as macrophages, adipocytes, hepatocytes, skin fibroblasts and myotubes, which regulate the expression of genes linked to cholesterol metabolism in a tissue-specific manner [1,2]. This includes the modulation in peripheral blood cells, such as macrophages, of the transcription of a panel of genes encoding proteins involved in reverse cholesterol transport, such as the ATP-binding cassette (ABC) transporters ABCA1 and ABCG1, the lipoproteins ApoE and ApoC, and the lipoprotein-remodelling enzyme PLTP [3,4]. Systemic activation of LXR thus initiates a series of tissue-specific transcriptional programs aimed at regulating whole-body cholesterol content. For instance, in the intestine LXR controls the reabsorption of cholesterol via activation of ABCG5 and ABCG8 gene expression [5]. Pharmacological activation of LXRs in vivo thereby results in increased high-density lipoprotein (HDL) levels, net whole-body cholesterol loss, and reduced atherosclerosis [6,7].

In addition to their key role in cholesterol homeostasis, LXRs have emerged as important regulators of genes involved in the

inflammatory response and innate immunity. Ligand-activated LXR thus blunts the induction of classical pro-inflammatory genes, such as those encoding inducible nitric oxide synthase (NOS2), cyclooxygenase-2 (COX-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and various chemokines in response to stimulation by bacterial lipopolysaccharide (LPS), tumor necrosis factor-α (TNFα) and interleukin-1β (IL-1β), in different mouse cell lines [8,9]. Other studies have also shown that activation of Toll-like receptors (TLR) 3 and 4 expression by bacterial and viral components results in inhibition of LXR signalling via interferon regulatory factor-3 (IRF-3), a transcription factor, suggesting that LXR functions to modulate crosstalk between inflammatory and metabolic pathways [10,11] and that the innate immune response is under the control of the LXR pathway [12,13]. Moreover, LXR ligands have proven effective in the amelioration of inflammation in a number of in vivo assays, including animal models of contact dermatitis and atherosclerosis [9,14,15]. In addition, activation of LXR attenuates the LPS-induced release of TNFα and prostaglandin E₂ (PGE₂) in rat Kupffer cells [16]. However, opposite data have also been reported on the consequences of LXR

activation by oxysterols. In this light, the treatment of human peripheral blood monocytes or the differentiated macrophage cell line THP-1 with an LXR ligand, 22(R)-hydroxycholesterol, results in the specific induction of the potent pro-inflammatory cytokine TNF α [17]. Also, LXR activation increased the generation of reactive oxygen species (ROS) by enhancing the expression of NADPH oxidase subunits in primary human macrophages [18]. In the endoplasmic reticulum of human aortic smooth muscle cells the NAD(P)H oxidase subunit Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced stress [19]. Also in this context, in U937 human promonocytic leukemia cells oxysterols favour the establishment of a pro-oxidant state, and a significant O $_2^{\cdot -}$ overproduction can be measured in the presence of LXR ligands, such as 7 β -hydroxycholesterol or 7-ketocholesterol [20].

15-Deoxy-D 12,14 -prostaglandin J $_2$ (15dPGJ $_2$) is an immunoregulatory lipid metabolite derived from prostaglandin D $_2$ (PGD $_2$) dehydration *in vivo* which is abundantly produced by mast cells, dendritic cells, and alveolar macrophages [21]. As a ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ), 15dPGJ $_2$ exerts anti-inflammatory effects that modulate vascular inflammation and atherosclerosis processes [22,23]. However, this property of 15dPGJ $_2$ remains a controversial matter, and caution must be taken in assigning this molecule a solely anti-inflammatory role, given that experimental evidence is also available that 15dPGJ $_2$ can induce the synthesis of the type II-secreted pro-inflammatory mediators phospholipase A [24] and COX-2 in vascular smooth muscle [25] and mammary epithelial cells [26]. Moreover, it has been shown that in stimulated human T lymphocytes 15dPGJ $_2$ promotes a significant increase in interleukin-8 (IL-8) production through the activation of MAP kinase- and NF- κ B-dependent signalling pathways [27], and that 15dPGJ $_2$ also induces the expression of IL-8 in human endothelial cells [28]. Furthermore, it has been shown that this prostaglandin, in contrast to reports in macrophages and other cell types, acts as a potent activator of eosinophils by inducing Ca $^{2+}$ mobilization, actin polymerization and CD11b expression [29]. In the same line, data from the present study and a previous report from our laboratory indicate that 15dPGJ $_2$ exerts a pro-inflammatory action in human neutrophils, where it elicits the production of high levels of ROS and induction of heme oxygenase 1 (HO-1) expression [30]. These facts are in keeping with previous observations in human neuroblastoma cells [31]. Furthermore, similar data have been reported by our group in human lymphocytes [32] which are also in line with recent observations that in human neutrophils and leukemic Jurkat cells ROS production becomes enhanced in response to 15dPGJ $_2$ treatment [33].

Although conflicting data are available on the consequences of LXR activation by oxysterols on the cellular inflammatory state, the opposite mechanism, that is, the potential effect of oxidative stress on LXR gene transcription, has not been analyzed in human circulating neutrophils and constitutes the aim of the present study. In this context, the pivotal role played by neutrophils as a source of ROS and mediators promoting oxidative stress and inflammation, and thereby contributing to the development of atherosclerosis, has been recently unveiled [34]. Also, classical observations had shown that neutrophils, although considered as cells with little protein synthesis capability, are able to synthesize *de novo* a series of cytokines, such as IL-1, IL-8 and interferon- α (IFN α), which are released at sites of inflammation and likely exert a crucial role in host defence mechanisms and against tissue damage [35]. These cells, given their high capacity to synthesize O $_2^{\cdot -}$, offer a natural approach to analyze the potential effect of ROS on LXR transcription in human cells, by using 15dPGJ $_2$ as a pro-inflammatory molecule. We here report for the first time that

human neutrophils when triggered with LXR synthetic ligands display a notable capacity to activate LXRa gene expression, in agreement with other cell types, together with the transcription levels of its target genes ABCA1, ABCG1 and SREBP1c. We describe as well that the presence of 15dPGJ $_2$ significantly inhibited the transcription of LXRa and ABC genes elicited by the synthetic LXR ligand, T0901317, and provide data on the intracellular signalling mechanisms involved in regulation of LXRa expression and activity, including oxidative stress and LXRa phosphorylation. Our results thus allow to extend the sphere of influence of LXR to human circulating neutrophils.

Methods

Ethics Statement

Peripheral venous blood was drawn from healthy volunteers following standardized protocols approved by the Research Ethics Committee of the Hospital Virgen Macarena, Universidad de Sevilla. The present study meets the requirements for experimentation on human beings, specifically referred to the anonymous blood samples collection from healthy volunteers, whose consent was verbal, and additionally complies with the overall Spanish and European legislation in force, according to the corresponding ethical report emitted by the Universidad de Sevilla. The University Ethics Committee approved the use of a verbal consent protocol with the aim of easing the procedure of sample obtaining and management, as soon as its providers were kept anonymous at all times. Blood withdrawing followed a routinary hospital protocol, and at the moment a simple verbal consent was requested to patients in our hospital. The blood obtained was not solely used for research purposes. Measures taken to document the process included that data handling was strictly kept anonymous and that our group did not have access to patients data unrelated to our study. The investigation was designed and conducted according to the ethical principles for medical research stated in the Declaration of Helsinki.

Chemicals and Reagents

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), phenylarsine oxide, reduced glutathione (GSH), diethylester maleic acid (DEM), 2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl (TEMPO), formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), diisopropyl fluorophosphate (DFP), IL-1 β , IL-8, TNF α , SP600125, and the vitamin E (Vit E) analog 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). SB203580 and PD098059 were products of Calbiochem (San Diego, CA), and RPMI 1640 was obtained from Biomedica (Boussens, France) Fetal calf serum was obtained from BioWhittaker (Basel, Switzerland). Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes were from Pall (Madrid, Spain), and Dextran T-500 and lymphocyte separation medium (Ficoll-Paque) were obtained from GE Healthcare (Barcelona, Spain). T0901317 and prostaglandins PGA $_1$, PGA $_2$, PGD $_2$ and PGE $_2$ were products of Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). 15dPGJ $_2$ was obtained from Biomol (Plymouth Meeting, PA). Rabbit polyclonal antibodies against phosphorylated (Thr202/Tyr204) extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) and total (unphosphorylated plus phosphorylated) ERK1/2 were obtained from New England Biolabs (Beverly, MA). Mouse monoclonal anti-human LXRa was obtained from Perseus Proteomics (Tokyo, Japan). Rabbit polyclonal anti-phosphoserine and mouse monoclonal anti-GAPDH were purchased from Chemicon International (Madrid, Spain). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit and anti-mouse IgGs were from Promega (Madison, WI).

Isolation and Culture of Human Neutrophils

Human peripheral blood neutrophils were isolated as indicated [36], from fresh heparinized blood of healthy human donors after informed consent, and further purified by Dextran T-500 sedimentation, followed by Ficoll-Paque gradient centrifugation and hypotonic lysis of residual erythrocytes. Neutrophils were washed twice in Hank's balanced salt solution and then suspended at a density of 10^7 cells/ml in Krebs Ringer Hepes buffer or RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum plus gentamicin, penicillin and streptomycin at 50 mg/ml each. Before all stimulations, neutrophil suspensions were preincubated at room temperature with 1 mM DFP (to minimize proteolysis) for 5 min [37].

Isolation and Culture of Human Macrophages

Human monocyte-derived macrophages were obtained from buffy coat preparations by Ficoll density gradient centrifugation, followed by adhesion-mediated purification on tissue culture or gelatin-coated plastic. The monocytes differentiate into macrophages *in vitro* by culturing in medium containing autologous human fibrin-depleted plasma [38].

RT-PCR Analyses of mRNA Levels

For RT-PCR analysis, 2 mg of total RNA was reverse-transcribed into cDNA as described [32]. Real time PCR was carried out in an ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the specific thermocycler conditions recommended by the manufacturer. PCR reactions were performed in triplicate and contained 2 ml of cDNA and SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) in a total volume of 25 ml, and using the following primers: hLXRa: forward, 5'-AAGCCCTG-CATGCCTACGT-3', reverse, 5'-TGCAGACGCAGTG-CAAACA-3'; hLXRb: forward, 5'-TCGTGGACTTCGCTAAG-CAA-3', reverse, 5'-GCAGCATGATCTCGATAGTGGA-3'; hABCA1: forward, 5'-CCCTGTGGAATGTACCTATGTG-3', reverse, 5'-GAGGTGTCCCAAAGATGCAA-3'; hABCG1: forward, 5'-CAGTCGCTCCTTAGCACCA-3', reverse, 5'-TCCATGCTCGGACTCTCTG-3'; hSREBP1c: forward, 5'-TCAGCGAGGCGCTTTGGAGCAG-3', reverse, 5'-CATGTCTTCGATGTCGGTCAG-3'; and b-actin: forward, 5'-CCAGCTCACCATGGATGATG-3', reverse, 5'-ATGCCG-GAGCCGTTGTC-3'. Relative levels of transcripts above were quantified by the comparative threshold cycle (Ct) method as described in the ABI Prism 7300 User Bulletin 2 [30], and normalized to b-actin mRNA levels.

Western Blotting Analysis of LXRa, Phosphorylated ERK1/2 and Phosphoserine Levels

Cells were rinsed once with ice-cold PBS, resuspended in a lysis solution containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM EDTA, 50 mM NaF, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml aprotinin and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and kept on ice for 30 min. Then the cells were disrupted by sonication on ice and, after centrifugation at 12,000g for 5 min at 4°C, protein concentration in the supernatant was determined by the Bradford method [39], using bovine serum albumin (BSA) as a standard. Proteins [40] were boiled in Laemmli loading buffer, resolved by SDS-PAGE (10% polyacrylamide) and transferred to PVDF membranes as previously described [41]. The blots were probed without need of prior blocking [42] with mouse monoclonal anti-LXRa or with rabbit polyclonal anti-phospho ERK1/2 or anti-phosphoserine antibodies at a 1:1,000 dilution in PBS plus 0.5% BSA and 0.02% Tween-

20. Thereafter, HRP-conjugated antibodies to mouse or rabbit IgG were used at a 1:5,000 dilution in PBS plus 0.5% casein followed by enhanced chemiluminescence [36]. To verify even protein loading, the blots were subsequently stripped and reprobed with mouse monoclonal antibodies against GAPDH, or rabbit polyclonal antibodies against total ERK1/2 at a 1:1,000 dilution. Band intensities were measured by scanning densitometry analysis using the Scion Image software (Frederick, MD).

Immunoprecipitation Analysis of Serine-phosphorylated Proteins

Stimulated cells were pelleted and lysed in 75 ml of ice-cold lysis buffer B, containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% Triton X-100, 300 mM NaCl, 100 mM phenylarsine oxide, 10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml aprotinin, 1 mM PMSF, 1 mM Na_2VO_4 and 5 mM EDTA. The lysates were centrifuged at 12,000g for 5 min. For immunoprecipitation, incubation with 0.5 mg of anti-LXRa specific antibodies was carried out in a volume of 70 ml with rotation for 2 h at 4°C, followed by addition of 40 ml of a 50% slurry of protein A-Sepharose beads in buffer B and further incubation for 2 h at 4°C. The immune complexes were washed five times with ice-cold lysis buffer B, and the proteins were extracted by boiling the pellet in Laemmli sample buffer. After resolution by SDS-PAGE (10% polyacrylamide), the proteins were electrotransferred to PVDF membranes as previously described [41], and subjected to immunoblotting analysis with antibodies to phosphoserine or LXRa as indicated above.

ELISA Quantitation of IL-8 Release

Cell culture supernatants were collected after treatments, and the levels of secreted IL-8 were quantified using the Human IL-8 ELISA Kit (Raybiotech, Norcross, GA). Plates were read on a Wallac 1420 Victor² spectrofluorometer (Perkin Elmer, Madrid, Spain).

Measurement of ROS using Hydroethidine

Neutrophils were treated as described above in the presence of 2 mM hydroethidine. This reagent is intracellularly oxidized by oxygen radicals to yield ethidium bromide, which tightly binds to DNA and emits a strong red fluorescence [43] whose intensity was measured using excitation/emission wavelengths of 550 nm/615 nm in the Wallac 1420 Victor² apparatus (Perkin-Elmer).

Chemotaxis Assay

Migration of neutrophils was evaluated in Transwell migration chambers (6.5 mm diameter, 5 mm pore size; Costar plates type 3421). Chemoattractants were deposited in the lower compartment in a final volume of 0.6 ml of RPMI 1640, and the plates were prewarmed at 37°C. Then 0.1 ml of medium containing 10^6 neutrophils was deposited on each detachable insert, which was placed over the chemoattractant solution. Loaded chambers were incubated for 2 h at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in air. In separate wells, neutrophils were added to the lower compartment and used as controls representing 100% migration. At the end of the incubation period, the cells that had migrated into the bottom chambers were collected and centrifuged. After staining with FITC-conjugated monoclonal antibodies to CD16 (Immunotech, Marseille, France), the cells were fixed with 1% paraformaldehyde and finally counted on a flow cytometer. The results are presented as the mean \pm SEM of three separate experiments, and are expressed as the percentage of total neutrophils initially added to each chamber.

Cholesterol Efflux

Cholesterol efflux assays were performed as described [44], with modifications. Cells were washed and incubated for 5 h in RPMI 1640 supplemented with 0.2% BSA with $[^3\text{H}]$ cholesterol (2.0 mCi/ml). To equilibrate cholesterol pools, cells were washed twice with PBS and incubated for 15 hr in RPMI containing 0.2% BSA plus the indicated ligands (1 mM T0901317 or 10 mM 15dPGJ₂) plus or apoAI (15 mg/ml), but lacking radiolabeled cholesterol. An aliquot of the medium was removed and centrifuged at 14,000g for 2 min, and the radioactivity was determined by liquid scintillation counting. Total cell-associated radioactivity was determined by dissolving the cells in isopropanol. Each assay was performed in triplicate.

Detection of Cellular Apoptosis

Apoptosis, measured as DNA fragmentation, was tested using the Cell Death Detection ELISA^{plus} kit from Roche Applied Science (Barcelona, Spain), according to the manufacturer's instructions. No evidence of apoptotic death was found in our cells, even after 20 h of incubation in our experimental conditions. Neutrophils treated with 100 nM staurosporine were used as positive control.

Statistical Analyses

mRNA levels quantitated by real time PCR are expressed as fold induction relative to untreated cells (mean \pm SEM from a minimum of 3 independent experiments performed with similar results). Protein levels quantitated from Western blots are expressed in arbitrary units. The results were statistically analyzed using the Statgraphics Plus 5.0 software (Manugistic Inc., Rockville, MD) by means of ANOVA and the Student's paired t-test.

Results

15dPGJ₂ Inhibits the Expression of LXRa and its Regulated Genes in Human Neutrophils

In preliminary experiments, we attempted to transfect human circulating neutrophils with plasmids containing cloned LXR genes or a short interfering RNA (siRNA) specific for the human LXRa. Yet, these experiments were unsuccessful, likely due to the intrinsic difficulty posed by these cells to become transfected with DNA. Initial experiments were designed to analyze whether each of the two LXR isoforms, a and b, was present at basal levels in human neutrophils. A relative quantification of LXRa and LXRb mRNAs in untreated human neutrophils and macrophages by means of real time RT-PCR revealed that these two cell types expressed comparable basal levels of both LXR genes (Figure 1A). However, we found that only the LXRa mRNA was induced in human neutrophils by a synthetic ligand, T0901317, whereas the LXRb mRNA was constitutively expressed by these cells and its levels remained unchanged (Figure 1B). As shown, the LXRa mRNA levels became up-regulated between 3 and 6 times after treatment for 18 h with T0901317, as measured in human neutrophils by real-time RT-PCR (Figure 1B). Next, experiments were designed to analyze the potential role on this process of 15dPGJ₂, a ligand of PPAR γ with capacity to modify the intracellular redox status, although with conflicting results reported on whether it enhances or ameliorates the inflammatory response. Interestingly, although 15dPGJ₂ by itself did not exert any positive or negative effect on LXRa mRNA expression (data not shown), it was able to drastically inhibit the stimulation of this process exerted by T0901317 in human neutrophils (Figure 1B). Indeed, 15dPGJ₂ effectively counteracted T0901317-activated

LXRa expression, although only at 10 mM its inhibitory effect was consistently observed and statistically significant, by ca. 75% (Figure 1B). Furthermore, the inhibition of LXRa mRNA expression correlated with decreased levels of LXRa protein in 15dPGJ₂-treated neutrophils (Figure 1C). A decrease of basal LXRa protein was also seen in the presence of 15dPGJ₂ alone (Figure 1C), although this small effect was not consistently observed.

We then set to analyze the effect of 15dPGJ₂ on the intracellular redox status in human neutrophils. To this end, we measured the short-term ROS production by neutrophils incubated with 15dPGJ₂. It was found that 15dPGJ₂ was able by itself to induce within minutes the production of ROS by these cells (Figure 1D). Moreover, the LXR synthetic ligand, T0901317, did not induce by itself ROS production (data not shown), although it reduced ROS generation elicited by 15dPGJ₂ (Figure 1D). These facts suggested that T0901317 did modify the intracellular redox status in human neutrophils. It was noteworthy that under pro-oxidant conditions, i.e. cells treated with diethylester maleic acid (DEM), an oxidant that depletes glutathione in the cell, the effect of T0901317 on ROS generation was reversed (Figure 1D). These data demonstrated that oxidative stress could change an LXR-mediated cell function in human neutrophils. Neither T0901317 nor DEM affected significantly ROS production by themselves (data not shown). In order to further assess the pro-inflammatory properties of 15dPGJ₂ and anti-inflammatory effects of LXR activation, we studied its effects on the release of IL-8, the main interleukin produced by neutrophils under pro-oxidant conditions. Figure 1E shows that 15dPGJ₂ strongly induced a significant IL-8 release to the medium by human neutrophils, and that this effect was hindered by subsequent T0901317 treatment. Thus, for both parameters measured, i.e. ROS and IL-8 levels, 15dPGJ₂ clearly exhibited pro-inflammatory properties in human neutrophils, which were significantly altered by T0901317 treatment. It should be noted that the effect of T0901317 on ROS and IL-8 levels was only observed after a previous treatment for at least 4 h with the ligand. Furthermore, T0901317 treatment for this period also hindered neutrophil migration activity induced by 15dPGJ₂ or by the chemoattractant formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) (Figure 1F), these data demonstrated that LXRa plays a role in regulation of inflammation. Also, we studied its role in cholesterol homeostasis. With this purpose, we analysed the efflux of cholesterol in human neutrophils in the presence and absence of T0901317 and/or 15dPGJ₂. However, this ligand was unable to alter cholesterol levels (data not shown).

To investigate whether the inhibitory effect of 15dPGJ₂ was specific for the LXRa in human neutrophils, we examined its biological activity by measuring the mRNA levels of a series of genes activated by this transcription factor, such as those encoding the cholesterol efflux transporters ABCA1 and ABCG1. It was found that the T0901317-activated transcription of these two genes was partially prevented by 15dPGJ₂ pretreatment (Figure 2, A and B), with an observed inhibition of ca. 40% for each ABCA1 and ABCG1 transcript levels with respect to those measured with T0901317 alone. SREBP1c was another LXR-dependent gene whose transcription, as shown in Figure 2C, was as well hindered by 15dPGJ₂ in neutrophils stimulated with T0901317, although, in this case such negative effect was not statistically significant. From these experiments it was concluded that transcription of the LXRa and its target genes induced by LXR ligands was inhibited by the simultaneous presence of 15dPGJ₂ in human neutrophils. Since the majority of previous studies on LXR gene transcription had been performed on macrophages, we set to verify whether the

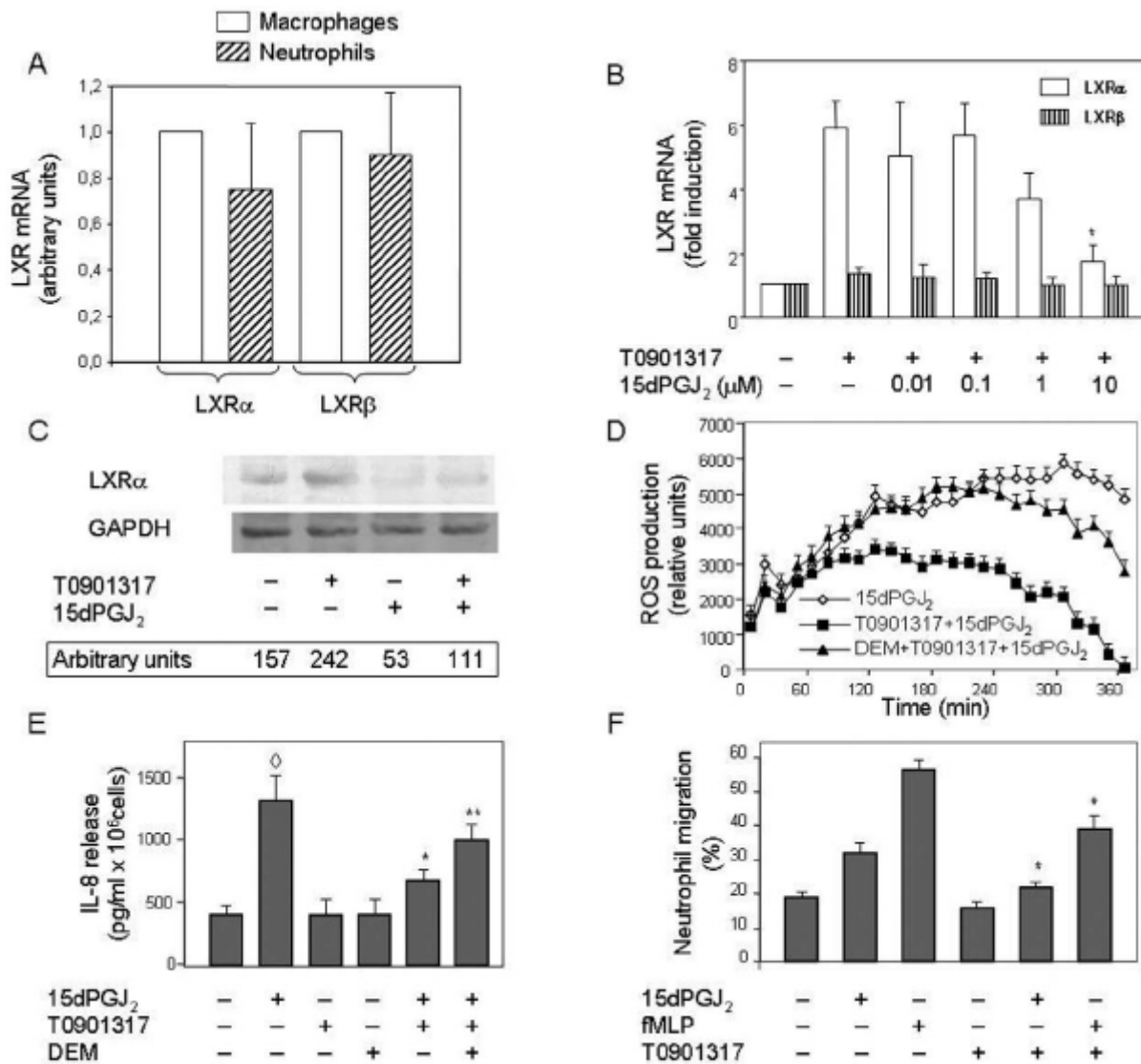


Figure 1. 15dPGJ₂ prevents ligand-induced LXR α mRNA expression in a dose-dependent manner. Neutrophils or macrophages were left untreated (A), or else neutrophils were preincubated at 37°C for 1 h with or without 15dPGJ₂ at the indicated doses (B) or at a 10 mM concentration (C), and then they were treated or not with T0901317 for 18 h (B and C). Then LXR α and LXR β mRNA levels were measured by real time RT-PCR (A and B), or LXR α protein levels were analyzed by Western blotting (C). Statistical data from real time RT-PCR experiments were normalized to LXR α or LXR β levels found in human macrophages (A) and corrected for differences in β -actin mRNA levels (as endogenous gene) and expressed as fold induction (A and B). GAPDH bands in Western blots are shown for the sake of protein loading controls (C). In a different set of experiments, neutrophils were pretreated or not with 10 mM DEM for 30 min (D and E) and, after preincubation in the absence or presence of 1 mM T0901317 for 4 h (D and E), 10 mM 15dPGJ₂ was added and ROS levels were monitored by luminescence measurement for the next 6 h (D), or released IL-8 levels were quantitated by ELISA after an incubation period of 4 h (E). Neutrophil migration was quantitated in cells preincubated with or without 1 mM T0901317 for 4 h and then transferred to Transwell chambers and treated with 10 mM 15dPGJ₂ or 0.1 mM fMLP for 1 h. Results are expressed as the percentage of cells that migrated from the upper to the lower compartment (F). Each panel is representative of a set of three experiments yielding similar results. Values are plotted as the mean \pm SEM ($n=3$) (A, B, D, E and F). * $P < 0.01$ for T0901317-stimulated, 15dPGJ₂ (B, F) or fMLP (F)-treated versus -untreated. ^e $P < 0.01$ for 15dPGJ₂-treated versus untreated (E). ** $P < 0.01$ for 15dPGJ₂ and T0901317-stimulated, DEM-treated versus -untreated (E). doi:10.1371/journal.pone.0042195.g001

inhibitory effect of 15dPGJ₂ also took place in this cell type. As illustrated in Figure 2D, 15dPGJ₂ inhibited as well LXR α , ABCA1, ABCG1 and SREBP1c mRNA transcription in cultured human macrophages treated with T0901317, although, as it was the case for neutrophils, the 15dPGJ₂ inhibitory effect on SREBP1c was not statistically significant.

Other Pro-inflammatory Molecules also Inhibit LXR α mRNA Expression in Human Neutrophils

In order to investigate whether the inhibitory effect of 15dPGJ₂ was attributable to its pro-inflammatory properties, we studied the effect of well known pro-inflammatory cytokines, namely IL-8, IL-1 β and TNF α , on LXR α mRNA levels as well as on the expression of LXR α target genes, ABCA1, ABCG1 and SREBP1c. Figure 3A shows that these cytokines not only inhibited the ligand-induced

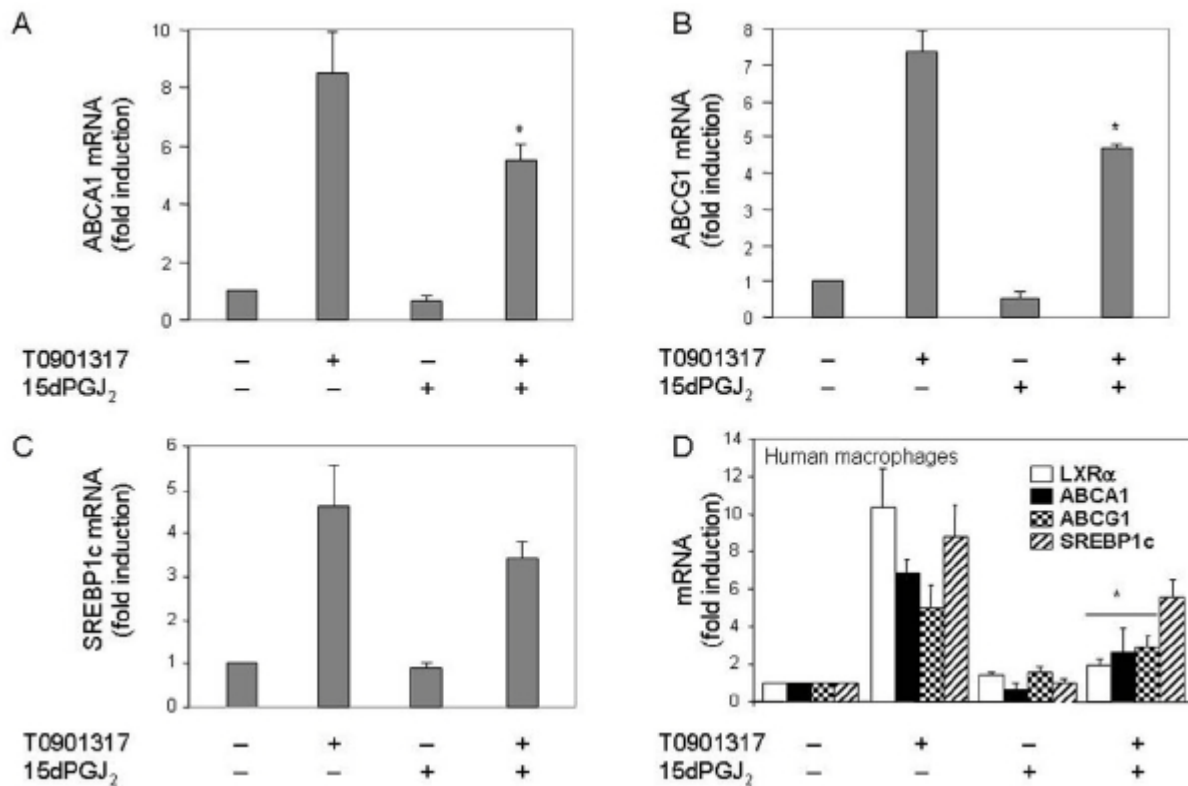


Figure 2. 15dPGJ₂ prevents T0901317-induced ABCA1, ABCG1 and SREBP1c mRNA expression in human neutrophils and macrophages. Neutrophils (A-C) or macrophages (D) were preincubated at 37°C with or without 10 mM 15dPGJ₂ for 1 h, and thereafter they were stimulated or not with 1 mM T0901317 for 18 h. The levels of mRNA from the indicated genes were analyzed by real time RT-PCR. Statistical data (mean \pm SEM, n = 3) were corrected for differences in b-actin mRNA levels and expressed as fold induction. * $P < 0.01$ for T0901317-stimulated, 15dPGJ₂-treated versus -untreated. doi:10.1371/journal.pone.0042195.g002

LXR α mRNA expression, but also that of LXR α target genes, ABCA1, ABCG1 and SREBP1c. Yet, the negative effect of IL-1 β on the four genes, although observable, was not statistically significant, as it was the case for the TNF α effect on ABCA1 induction (Figure 3A). Interestingly, IL-8 inhibited LXR α mRNA expression at a dose similar to IL-8 levels released upon 15dPGJ₂ treatment by human neutrophils.

15dPGJ₂ is a known PPAR γ natural ligand. Some authors have described that LXR and PPAR γ ligands act in a cooperative manner to induce LXR α expression in human macrophages [1]. Thus, we decided to investigate whether the inhibitory effect of 15dPGJ₂ was dependent on PPAR γ activation. To address this question, we treated neutrophils with three synthetic PPAR γ agonists, troglitazone, ciglitazone and rosiglitazone, at a 1 mM concentration. As shown in Fig. 3B, these compounds did not significantly affect either the basal levels of LXR α mRNA expression or its T0901317-induced transcription in human neutrophils. Similar negative results were obtained for ABCA1 expression (Fig. 3B). These observations were suggestive that 15dPGJ₂ inhibits LXR α expression in a PPAR γ -independent manner.

Given that the effects of cyclopentenone prostaglandins, like 15dPGJ₂ and A-series prostaglandins, are usually mediated by the reactive α,β -unsaturated carbonyl group in their cyclopentenone ring [45], subsequent experiments were addressed to study the effect on LXR α expression of prostaglandins A, which do not bind to any member of the PPAR family of nuclear receptors. Figure 3C illustrates that T0901317-promoted LXR α mRNA synthesis was

strongly inhibited by both PGA₁ and PGA₂ in human neutrophils. Moreover, PGD₂, the precursor of 15dPGJ₂ [31], also prevented LXR α gene expression, whereas PGE₂ had no significant effect on its induction by T0901317. Similar inhibitory effects were detected for these prostaglandins on the three LXR α target genes analyzed (Figure 3C), although their negative effect on SREBP1c expression was (as in Figure 2D) not statistically significant.

Inhibition of LXR α Transcription by 15dPGJ₂ is Exerted through ROS

Our group has shown that some effects of 15dPGJ₂ are exerted through its intrinsic ability to elicit ROS production by human lymphocytes and neutrophils [30,31]. We thus tested whether the negative effect of 15dPGJ₂ on LXR α mRNA expression was affected by oxidative stress. With this purpose, neutrophils were preincubated with either the pro-oxidant agent, DEM, or the reducing molecules 2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl (TEMPO) (a ROS scavenger), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (a soluble Vit E analog), or GSH, prior to addition of 15dPGJ₂ to the medium, and then LXR α mRNA synthesis was activated with T0901317. Figure 4A illustrates that DEM significantly inhibited by itself T0901317-dependent mRNA expression of the LXR α and its target genes (i.e. ABCA1, ABCG1 and SREBP1c) ($P < 0.01$), and that it was also able to enhance the negative effect of 15dPGJ₂ on the mRNA levels of LXR α target genes, but not on LXR α expression, possibly due to the strong inhibition exerted by 15dPGJ₂ by itself (Figure 4A). Even, DEM alone was able to decrease LXR α expression below basal levels,

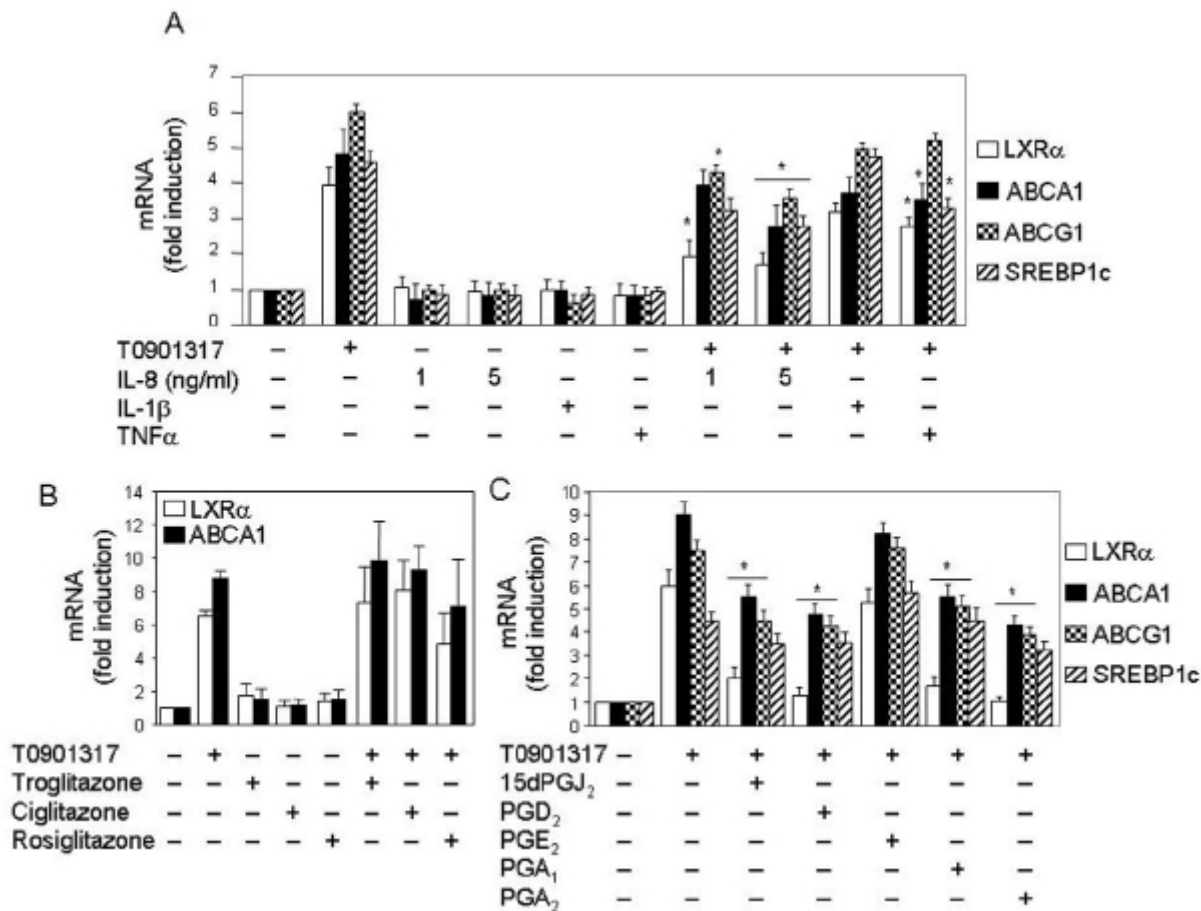


Figure 3. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins, but not PPAR agonist, inhibit induction of mRNA expression of LXR α target genes in human neutrophils. Neutrophils were preincubated at 37°C for 1 h with or without 330 ng/ml IL-1 β , 200 ng/ml TNF α or IL-8 at the indicated doses (A), 1 mM troglitazone, 1 mM ciglitazone or 1 mM rosiglitazone (B), or else with 10 mM 15dPGJ $_2$, 10 mM PGD $_2$, 10 mM PGE $_2$, 15 mM PGA $_1$ or 25 mM PGA $_2$ (C). Then, after incubation in the absence or presence of 1 mM T0901317 for 18 h, the levels of LXR α , ABCA1, ABCG1 and SREBP1c mRNAs were analyzed by real time RT-PCR. Statistical data (mean \pm SEM, $n = 3$) were corrected for differences in b-actin mRNA levels and expressed as fold induction. * $P < 0.01$ for treated with pro-inflammatory cytokines (A) or prostaglandins (C) plus T0901317-stimulated versus untreated, T0901317-stimulated only.
doi:10.1371/journal.pone.0042195.g003

although not significantly. In contrast, reducing molecules such as TEMPO (Figure 4A) and the Vit E analog (Figure 4B) significantly counteracted the negative effect of 15dPGJ $_2$ on LXR α mRNA expression with a statistical significant of $P < 0.01$, and GSH totally abolished such effect with a statistical significant of $P < 0.01$ (Figure 4B). Interestingly, the counterbalancing effect of reducing molecules was also significant on the other three LXR α target genes studied, with a statistical significant of $P < 0.01$, except for TEMPO, which was not able to reverse the negative effect of 15dPGJ $_2$ on the expression of these genes (Figure 4A). In control experiments, it was found that neither the Vit E analog (Figure 4B) nor TEMPO or GSH (data not shown) alone had any effect on T0901317 stimulatory action. These data strongly suggested that intracellular ROS are involved in the inhibition of LXR α mRNA synthesis exerted by 15dPGJ $_2$ in human neutrophils treated with T0901317.

LXR α Expression is ERK1/2-dependent in Human Neutrophils: Effect of 15dPGJ $_2$

Recently, Tontonoz's and Garabedian's groups have established that the LXR α molecule is phosphorylated at a single site, Ser-

198, in its hinge region [46,47]. This serine residue is a target site for mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation. On this basis, we analyzed in subsequent experiments the potential involvement of MAPK pathways in LXR mRNA expression and its down-regulation promoted by 15dPGJ $_2$ in human neutrophils. With this aim, neutrophils were incubated with different kinase inhibitors, such as SB203580 (a p38 MAPK inhibitor), PD098059 (an inhibitor of MEK1/2, the upstream activator of ERK1/2), and SP600125 (an inhibitor of c-Jun N-terminal kinases 1 and 2, JNK1/2), prior to addition of 15dPGJ $_2$ to the medium. As shown in Figure 5A, neither SB203580 nor SP600125 had any significant effect on T0901317-promoted LXR α transcription, nor did they alter the negative effect of 15dPGJ $_2$ on this process. This suggested that the MAPKs p38 and JNK1/2 are not involved in LXR α transcription. However, in neutrophils preincubated with PD098059, the MEK1/2 inhibitor, LXR α target genes mRNA synthesis induced by T0901317 was dramatically enhanced in a PD098059 (Figures 5, A and B). Even, this inhibitor was able by itself to (slightly) induce LXR α target genes mRNA expression above basal levels (Figure 5B), and to potently abrogate the 15dPGJ $_2$ inhibitory effect on this process (Figures 5, A and B). These data were indicative that ERK1/2 activation down-

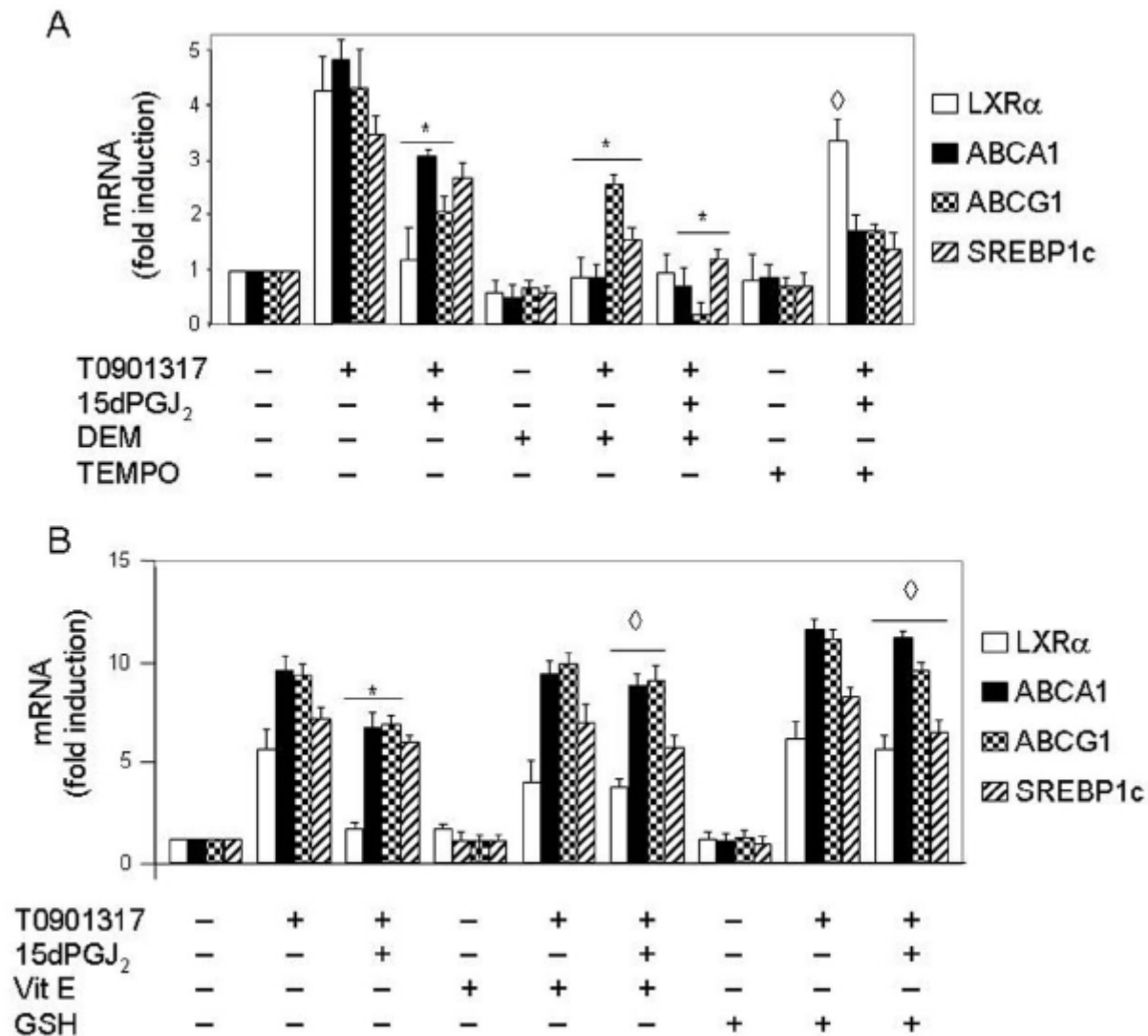


Figure 4. 15dPGJ₂ inhibition of LXR target genes mRNA expression is mediated by oxidative stress in human neutrophils. Neutrophils were preincubated at 37°C with or without 10 mM DEM, 100 mM TEMPO (A), 100 mM vitamin E analog (Vit E) or 1 mM GSH (B) for 1 h. Then the cells were treated or not with 10 mM 15dPGJ₂ for 1 h, and thereafter stimulated or not with 1 mM T0901317 for 18 h. Finally, the levels of LXR target genes mRNAs were analyzed by real time RT-PCR. Statistical data (mean \pm SEM, n = 3) were corrected for differences in b-actin mRNA levels and expressed as fold induction. * $P < 0.01$ for T0901317-stimulated, 15dPGJ₂ (A and B) or DEM (A)-treated versus -untreated. ^e $P < 0.01$ for 15dPGJ₂ and T0901317-stimulated, TEMPO (A), Vit E or GSH (B)-treated versus -untreated. doi:10.1371/journal.pone.0042195.g004

regulates LXRα target genes mRNA transcription induced by T0901317, and that the inhibitory effect of 15dPGJ₂ could be mediated by ERK1/2 activation.

15dPGJ₂ Elicits Redox-dependent Phosphorylation of ERK1/2 in Human Neutrophils

To further assess whether 15dPGJ₂ was able to activate the ERK1/2 pathway in human neutrophils, we studied its effect on the phosphorylation status of this MAPK. With this purpose, neutrophils were incubated with PMA, a known ERK1/2 activator used as a positive control, and with 15dPGJ₂ for different times (5–60 min). As illustrated in Figure 6A, 15dPGJ₂ elicited ERK1/2 phosphorylation in a time-dependent manner, reaching its maximal value after 30 min of treatment. Given that exogenous oxidants are known to promote phosphorylation, and hence activation, of p38 MAPK and ERK1/2 in human neutrophils

[48,49], we set to analyze whether oxidative stress was implicated in ERK1/2 phosphorylation induced by 15dPGJ₂. Thus, neutrophils were treated either with the oxidant reagent DEM, or with the reducing molecules Vit E (analog) or GSH, prior to addition of 15dPGJ₂ to cells. As shown in Figure 6B, DEM preincubation slightly enhanced ERK1/2 phosphorylation elicited by 15dPGJ₂, mainly of its lower, p42 band. This result was in agreement with the increased ERK1/2 phosphorylation observed upon glutathione depletion with buthionine sulfoximine in HepG2 hepatocytes [50]. On the other hand, both the Vit E analog and GSH separately hindered the positive effect of 15dPGJ₂ on ERK1/2 phosphorylation in human neutrophils (Figure 6B). However, neither Vit E or GSH had any effect by itself on this process (data not shown). Like 15dPGJ₂, other cyclopentenone prostaglandins, such as PGA₁ and PGA₂ and the 15dPGJ₂ precursor, PGD₂, promoted as well ERK1/2 phosphorylation in human neutrophils,

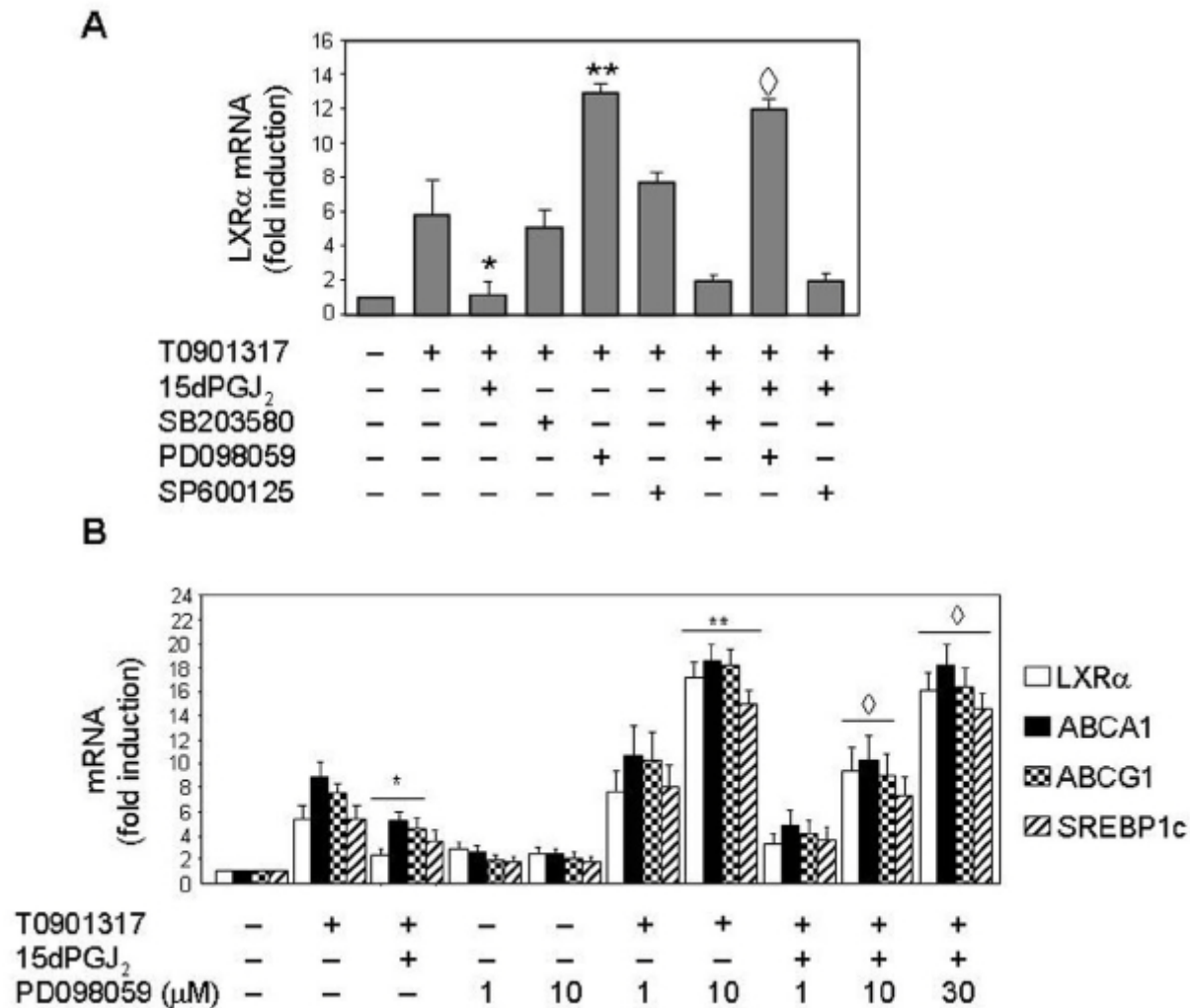


Figure 5. 15dPGJ₂ inhibition of LXR target genes mRNA expression is mediated by ERK1/2 in human neutrophils. Neutrophils were pretreated at 37°C with or without 10 mM SB203580 or 1 mM SP600125, or with PD098059 at 40 mM (A) or at the indicated doses (B) for 1 h. Then the cells were incubated in the absence or presence of 10 mM 15dPGJ₂ for 1 h, and further stimulated or not with 1 mM T0901317 for 18 h. Finally, the levels of LXR target genes mRNA were analyzed by real time RT-PCR. Statistical data (mean \pm SEM, n = 3) were corrected for differences in b-actin mRNA levels and are expressed as fold induction. * $P < 0.01$ for T0901317-stimulated, 15dPGJ₂-treated versus -untreated. ** $P < 0.01$ for T0901317-stimulated, PD098059-treated versus -untreated. $\diamond P < 0.01$ for 15dPGJ₂ plus T0901317-stimulated, PD098059-treated versus -untreated. doi:10.1371/journal.pone.0042195.g005

although not at the high level elicited by 15dPGJ₂ (Figure 6C). These results confirmed the possibility that 15dPGJ₂ could act through mechanisms related to the reactive α,β -unsaturated carbonyl group in its cyclopentenone ring (Figure 6C). The much lower effect of PGD₂ compared to 15dPGJ₂ (Figure 6C) could be attributed to the short preincubation period (30 min) with the cells, possibly insufficient for its intracellular conversion into 15dPGJ₂. In this light, longer preincubations, of up to 20 h, resulted in a much stronger enhancement of ERK1/2 phosphorylation by exogenously-added PGD₂ (Figure 6D). In contrast, T0901317 was unable to stimulate ERK1/2 phosphorylation by itself (Figure 6E), but instead inhibited PMA-induced phosphorylation of this MAPK (data not shown).

15dPGJ₂ Promotes LXR α Serine Phosphorylation in Human Neutrophils

The human LXR α is well known to be an autoinducible gene [1,2]. Also, nuclear receptor activity can be regulated by

phosphorylation [51,52], and previous studies have suggested that different signalling pathways may contribute to LXR α phosphorylation [53,54]. In this context, Garabedian's group has provided clear evidence of regulation of LXR α target gene selectivity through modulation of LXR α phosphorylation at Ser-198 in mouse macrophages [47]. Based on these data, we studied LXR α phosphorylation levels in human neutrophils. To this end, these cells were incubated with 15dPGJ₂ prior to their treatment with T0901317, the LXR α was immunoprecipitated, and Western blotting analysis was carried out using anti-phosphorylated-serine antibodies. Figure 7 illustrates that untreated human neutrophils exhibited basal levels of LXR α serine phosphorylation, and that T0901317 incubation enhanced the serine phosphorylation status of this transcription factor. We also found that 15dPGJ₂ further enhanced LXR α phosphorylation in human neutrophils, although at undetermined serine residue(s). It is noteworthy that this effect was counteracted by preincubation with PD098059, a ERK1/2 inhibitor (Figure 7).

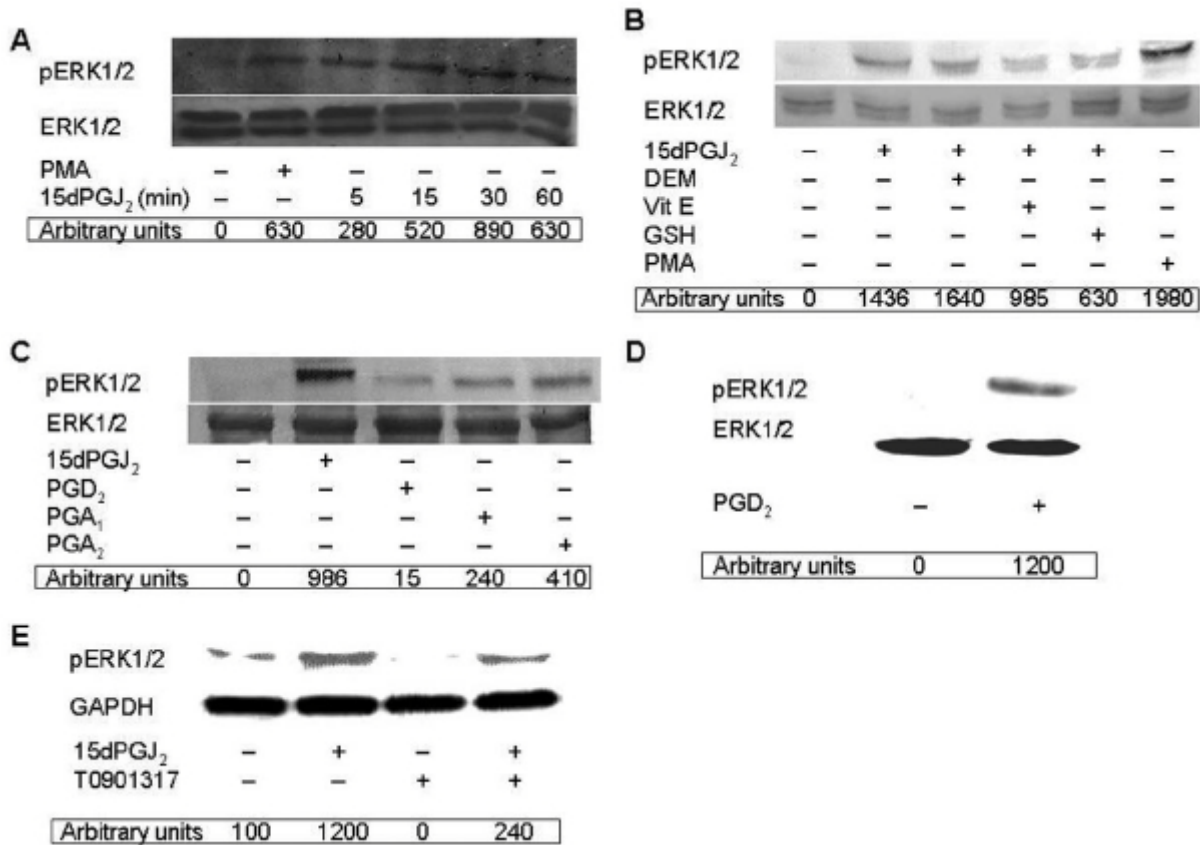


Figure 6. 15dPGJ₂-promoted ERK1/2 phosphorylation is dependent on oxidative stress in human neutrophils. Neutrophils were preincubated at 37°C with or without 10 mM DEM, 100 mM Vit E or 1 mM GSH for 1 h (B). Then the cells were treated or not with 10 mM 15dPGJ₂ for the indicated times (A) or for 30 min (B, C and E), and then with 100 nM PMA for 7 min (A and B), or else with 10 mM PGD₂, 15 mM PGA₁ or 25 mM PGA₂ for 30 min (C), with 10 mM PGD₂ for 20 h (D), or with 1 mM T0901317 for 30 min (E). Phosphorylated ERK1/2 (pERK1/2) levels were analyzed on cell lysates by Western blotting and are given in arbitrary units. Immunoblots of total ERK1/2 (A-D) or GAPDH (E) are also shown for the sake of loading controls. Each blot is representative of a set of three separate experiments yielding similar results. doi:10.1371/journal.pone.0042195.g006

Discussion

The main role traditionally assigned to LXRs is triggering transcriptional programs that promote reverse cholesterol transport. However, as indicated above, there has been a growing appreciation in recent years of its complex roles in innate immunity using established cell lines [8,9]. In the present work we extend the sphere of influence of LXR to human circulating neutrophils. Our studies show that when this cell type is triggered with an LXRα synthetic ligand, it exhibits a notable capacity to activate the transcription of the LXRα target genes ABCA1, ABCG1 and SREBP1c. Moreover, this ligand also induced LXRα expression itself at the mRNA and protein levels. These results confirm recent observations that identify neutrophils as target cells for LXR activation in mice [55]. These studies have demonstrated that the expression of LXRα (but not LXRβ) is controlled by an autoregulatory mechanism. Therefore, LXR activity is modulated not only by agonist and antagonist agents, but also through activation of LXR mRNA transcription exerted by LXRα itself [56]. Although most studies on LXR have been devoted to macrophages and endothelial cells, human neutrophils may play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis, given their capacity to respond to exogenous oxysterols and circulating molecules, especially under pro-inflammatory conditions. The traditional notion of atherosclerosis as a predominantly lipid-retentive disease has been recently expanded to a coupling of

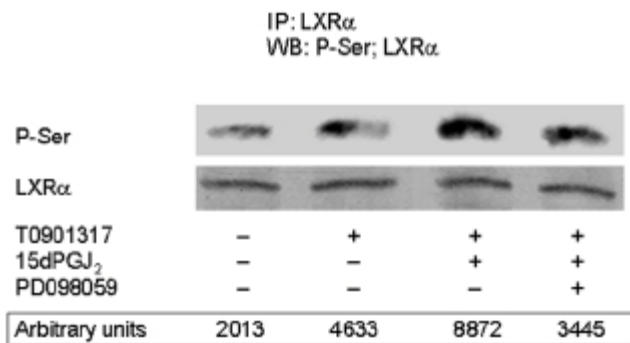


Figure 7. 15dPGJ₂ promotes LXRα serine phosphorylation in human neutrophils. Neutrophils were preincubated at 37°C with or without 30 mM PD098059 for 30 min. Then the cells were treated or not with 10 mM 15dPGJ₂ for 30 min, and thereafter stimulated or not with 1 mM T0901317 for further 30 min. Finally, the cells were lysed, LXRα was immunoprecipitated and Western blotting analysis of phosphoserine (P-Ser) and LXRα levels was carried out as indicated in Experimental Procedures. P-Ser levels are given in arbitrary units. The blot is representative of a set of three experiments yielding similar results. doi:10.1371/journal.pone.0042195.g007

inflammatory mechanisms and dyslipidemia [57]. Under this view, oxidative stress and chronic inflammation are likely involved in, and contribute to, the development of atherosclerosis [58,59]. In this context, primed neutrophils constitute a source of superoxide radicals ($O_2^{\cdot -}$) and mediators that can promote oxidative stress and inflammation [34], whose overproduction may represent a risk factor for cardiovascular diseases [60]. The LXR nuclear receptor is generally considered as an anti-inflammatory factor, given that it hinders the expression of classical pro-inflammatory genes [8]. In this line, we show evidence that T0901317 treatment was able to ameliorate neutrophil migration activity induced by pro-inflammatory agents (such as 15dPGJ₂ and fMLP). Moreover, T0901317 treatment reverted the pro-inflammatory effect of 15dPGJ₂ (i.e. ROS production, IL-8 release). But it is important to underline that these effects occurred only after long term treatment with T0901317 (i.e. 4 h). Thus the activation of LXR may play a role in resolution of inflammation processes.

Although it has been shown that under oxidative stress conditions the NADPH oxidase system becomes activated in murine macrophages treated with oxysterols [61], and that in cultured porcine retinal pigment epithelial cells oxysterols induce a significant increase of ROS production and IL-8 gene expression [62], the discrepancy existing on the relationship between oxysterols and oxidative stress could reflect differences between animal species or cell lines in their response to these compounds. However, the opposite situation, that is, the potential effect of oxidative stress on LXR gene expression, has not been analyzed in human circulating neutrophils and constitutes one of the aims of the present study. The main role of neutrophils as a source of ROS (e.g., superoxide radicals) and pro-inflammatory mediators (e.g., 15dPGJ₂), thereby promoting oxidative stress and contributing to the development of atherosclerosis, is well known [34]. Therefore, these cells offer a natural approach to analyze the potential effect of ROS on LXR transcription in human cells, by using 15dPGJ₂ as a pro-inflammatory molecule. As indicated, 15dPGJ₂ could be considered either as a pro- or anti-inflammatory molecule depending on cells under study, their context and the prostaglandin receptor implicated [63]. However, our present data provide clear evidence that 15dPGJ₂ exerts pro-inflammatory effects in human neutrophils, since it induces ROS production at high levels by this cell type. This effect was dependent on its cyclopentenone ring, and in this context it has been reported that some 15dPGJ₂ biological actions involve the covalent modification or oxidation of critical cysteine residues acting as a redox sensor [64]. Additionally, 15dPGJ₂ is able to activate cytoprotective mechanisms, such as the induction of HO-1 expression, in an NF- κ B-independent fashion [30]. Similar results have been described by our group in human lymphocytes [32], and by other researchers in murine macrophages [65]. Therefore, accumulating evidence of 15dPGJ₂ pro-inflammatory actions [22,23,66,67] taken altogether makes its anti-inflammatory properties increasingly controversial [24–27,31].

Two main observations were made in the present study regarding regulation of LXRa gene expression in human circulating neutrophils. First, these cells were able to respond positively to T0901317 by up-regulating the mRNA levels of LXRa target genes by several-fold together with its transcriptional transactivation activity. Second, we describe for the first time that LXRa mRNA transcription induced by its ligand is inhibited by 15dPGJ₂ in a fashion similar to other model pro-inflammatory molecules, such as IL-8, TNF α and IL-1, which inhibit LXR transcription in human neutrophils, as similar manner as its do on Hep3B human hepatoma cells [68]. With regard to potential mechanisms whereby 15dPGJ₂ acts negatively on LXRa target

genes mRNA expression, present data suggest that its inhibitory effect is exerted in a PPARc-independent manner, because, other PPARc ligands do not have any effect on LXRa expression. These data are in agreement with the fact that anti-atherogenic effect of PPARc ligands are exerted in a LXR-independent manner in macrophage foam-cell formation [69]. Furthermore, our data also suggest that 15dPGJ₂ inhibitory effect is performed in a ROS-dependent manner. Several lines of research illustrate the possibility that 15dPGJ₂ effect could be exerted in a PPARc-independent and ROS-dependent manner [70,71]. We have found that such 15dPGJ₂ negative effect was reversed by reducing agents and mimicked by pro-oxidant molecules, this reflecting a previously undescribed relationship between ROS production and modulation of LXR expression. This observation could be very important in the context of pathologies associated involving an inflammatory process, since the relationship between LXR activation and atherogenesis counteraction associated with reverse cholesterol transport stimulation by LXRs is well known [56,72]. In addition, it is also noticeable the relationship between ROS production and atherosclerotic vascular impairment [58,59,73]. Therefore, we can postulate that ROS production by neutrophils occurring in different inflammatory processes might interfere with other LXR-regulated events, such as atherosclerosis enhancement or even its anti-inflammatory effect. This is evidenced by the fact that inhibition of LXRa, by increased pro-oxidant condition, reversed the LXRa anti-inflammatory effects on IL8 release and ROS production induced by 15dPGJ₂. In fact, this idea has already been raised by other researchers concluding that ROS may promote coronary artery disease by counteracting the established anti-atherogenic effects of HDL and ABCA1 pathways on the human artery wall [74]. Our data are also consistent with recent reports that ROS mediate the IL-1 β -induced down-regulation of ABCA1 mRNA and protein in human macrophages (THP-1 and A549 cell lines) [75], and that epigallocatechin-3-gallate, which elevates ROS in the 3T3L1 adipocyte cell line, also decreases LXRa expression [76]. However, the latter study did not address whether this inhibitory effect was or not ROS-dependent.

15dPGJ₂ did not negatively modulate only LXRa expression, but also hindered mRNA transcription of its target genes ABCA1, ABCG1 and SREBP1c in T0901317-stimulated human neutrophils (although its effect on SREBP1c was not statistically significant). These data are in agreement with the well known fact that these three genes are LXR-regulated in rodent and human cells, via functional LXR response elements found in their promoters [7,56,77]. Therefore, it seems that 15dPGJ₂, by negatively modulating LXRa transcription factor activity, disables the expression of LXR target genes. Additionally, LXR activity appears to be regulated by post-translational modification, such as phosphorylation exerted by MAPKs, as it is the case for other nuclear receptors [51,78,79]. This led us to analyze the potential implication of these protein kinases in the modulation of LXR mRNA expression by testing the effect on this process of a set of MAPK inhibitors targeting p38, ERK1/2 and JNK1/2. Among these, neither SB203580 nor SP600125 had any effect on LXRa transcription, which reflected the lack of implication of p38 MAPK and JNK1/2. However, we found that treatment of neutrophils with PD098059, an inhibitor of ERK1/2 upstream activator, MEK1/2, resulted in a dramatic enhancement of mRNA synthesis of LXRa and other target genes induced by T0901317. Even, PD098059 alone was able to slightly increase transcription of these genes. In contrast, it has been very recently described in macrophages that ERK1/2 inhibitors do not affect LXRa/b protein expression, although they increase free cholesterol efflux and ABCA1 expression in this cell type [80].

Additionally, we present evidence that PD098059 potentially cancels 15dPGJ₂ inhibition of mRNA synthesis of LXR α and other target genes. These data strongly suggested that ERK1/2 activation is involved in the down-regulation of T0901317-induced transcription LXR α of target genes exerted by 15dPGJ₂ in human neutrophils. In fact, we have detected that 15dPGJ₂ elicited ERK1/2 phosphorylation in a PPAR α -independent manner, in similarity to reports in other cells [81,82], and that this effect was dependent on ROS production. This conclusion was further supported by the fact that other down-regulator of LXR α target genes used in this work, such as other prostaglandins, promoted as well ERK1/2 phosphorylation in human neutrophils. Therefore, in these cells LXR activity appears to be regulated, in addition to at the transcriptional level, through post-translational modification elicited by T0901317 and 15dPGJ₂. In this context, we have found that the LXR α protein undergoes serine phosphorylation promoted by its ligand, T0901317. This result is in line with the previous observation that selective regulation of LXR α target gene expression, rather than expression of the LXR α gene itself, is achieved in macrophages by phosphorylation of the LXR α at Ser-198 [47], a residue located within a consensus target for the MAPK family [46]. Our data in human neutrophils indicate that 15dPGJ₂ treatment induces an increased phosphorylation at undetermined serine residue(s) of the LXR α .

In summary, our results support the notion that pro-inflammatory stimuli such as 15dPGJ₂, together with associated ROS production, down-regulate the LXR α and at least some of its other target genes at the mRNA expression level in human neutrophils by promoting an alteration of the LXR α phosphorylation status in an ERK1/2-dependent manner. Whichever the action exerted by oxysterols (i.e., pro- versus anti-inflammatory), experiments in this work clearly indicate that LXR transcription becomes depressed under oxidative conditions. This is highly suggestive that neutrophils, alike other phagocytic cells, could be associated with the high oxidative state found in atherogenic injury conditions [58,59,73]. This pro-oxidant environment would promote the formation of the atherosclerotic plaque through the direct negative modulation of LXR activity. Present studies we believe open up the new paradigm of a cross-talk between nutritional transcription factors modulating fatty acid metabolism and oxidative stress in human circulating blood cells.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GA MER JJ. Performed the experiments: GA. Analyzed the data: GA RR IG EP CSM FS. Wrote the paper: GA JMN FS.

References

- Laffitte BA, Joseph SB, Walczak R, Pei L, Wilpitz DC, et al. (2001) Autoregulation of the Human Liver X Receptor Alpha Promoter. *Mol Cell Biol* 21: 7558–7568.
- Whitney KD, Watson MA, Goodwin B, Galardi CM, Maglich JM, et al. (2001) Liver X Receptor (LXR) Regulation of the LXRalpha Gene in Human Macrophages. *J Biol Chem* 276: 43509–43515.
- Repa JJ, Mangelsdorf DJ (2000) The Role of Orphan Nuclear Receptors in the Regulation of Cholesterol Homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 459–481.
- Zelcer N, Tontonoz P (2006) Liver X Receptors as Integrators of Metabolic and Inflammatory Signaling. *J Clin Invest* 116: 607–614.
- Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, et al. (2002) Disruption of Abcg5 and Abcg8 in Mice Reveals their Crucial Role in Biliary Cholesterol Secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16237–16242.
- Bradley MN, Hong C, Chen M, Joseph SB, Wilpitz DC, et al. (2007) Ligand Activation of LXR Beta Reverses Atherosclerosis and Cellular Cholesterol Overload in Mice Lacking LXR Alpha and apoE. *J Clin Invest* 117: 2337–2346.
- Repa JJ, Turlley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, et al. (2000) Regulation of Absorption and ABC1-Mediated Efflux of Cholesterol by RXR Heterodimers. *Science* 289: 1524–1529.
- Castrillo A, Joseph SB, Marathe C, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P (2003) Liver X Receptor-Dependent Repression of Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Macrophages. *J Biol Chem* 278: 10443–10449.
- Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P (2003) Reciprocal Regulation of Inflammation and Lipid Metabolism by Liver X Receptors. *Nat Med* 9: 213–219.
- Castrillo A, Joseph SB, Vaidya SA, Haberland M, Fogelman AM, et al. (2003) Crosstalk between LXR and Toll-Like Receptor Signaling Mediates Bacterial and Viral Antagonism of Cholesterol Metabolism. *Mol Cell* 12: 805–816.
- Castrillo A, Tontonoz P (2004) Nuclear Receptors in Macrophage Biology: At the Crossroads of Lipid Metabolism and Inflammation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 455–480.
- Valledor AF (2005) The Innate Immune Response Under the Control of the LXR Pathway. *Immunobiology* 210: 127–132.
- Pascual-Garcia M, Valledor AF (2012) Biological Roles of Liver X Receptors in Immune Cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*.
- Joseph SB, McKilligin E, Pei L, Watson MA, Collins AR, et al. (2002) Synthetic LXR Ligand Inhibits the Development of Atherosclerosis in Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7604–7609.
- Fowler AJ, Sheu MY, Schmutz M, Kao J, Fluhr JW, et al. (2003) Liver X Receptor Activators Display Anti-Inflammatory Activity in Irritant and Allergic Contact Dermatitis Models: Liver-X-Receptor-Specific Inhibition of Inflammation and Primary Cytokine Production. *J Invest Dermatol* 120: 246–255.
- Wang YY, Dahle MK, Agren J, Myhre AE, Reinholt FP, et al. (2006) Activation of the Liver X Receptor Protects Against Hepatic Injury in Endotoxemia by Suppressing Kupffer Cell Activation. *Shock* 25: 141–146.
- Landis MS, Patel HV, Capone JP (2002) Oxysterol Activators of Liver X Receptor and 9-Cis-Retinoic Acid Promote Sequential Steps in the Synthesis and Secretion of Tumor Necrosis Factor-Alpha from Human Monocytes. *J Biol Chem* 277: 4713–4721.
- Fontaine C, Rigamonti E, Nohara A, Gervois P, Teissier E, et al. (2007) Liver X Receptor Activation Potentiates the Lipopolysaccharide Response in Human Macrophages. *Circ Res* 101: 40–49.
- Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, et al. (2004) NAD(P)H Oxidase Nox-4 Mediates 7-Ketocholesterol-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Mol Cell Biol* 24: 10703–10717.
- Lemaire-Ewing S, Prunet C, Montange T, Vejux A, Berthier A, et al. (2005) Comparison of the Cytotoxic, Pro-Oxidant and Pro-Inflammatory Characteristics of Different Oxysterols. *Cell Biol Toxicol* 21: 97–114.
- Kawahito Y, Kondo M, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Bishop-Bailey D, et al. (2000) 15-Deoxy-Delta(12,14)-PGJ(2) Induces Synoviocyte Apoptosis and Suppresses Adjuvant-Induced Arthritis in Rats. *J Clin Invest* 106: 189–197.
- Law RE, Goetze S, Xi XP, Jackson S, Kawano Y, et al. (2000) Expression and Function of PPARgamma in Rat and Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation* 101: 1311–1318.
- Takata Y, Kitami Y, Yang ZH, Nakamura M, Okura T, et al. (2002) Vascular Inflammation is Negatively Autoregulated by Interaction between CCAAT/enhancer-Binding Protein-Delta and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma. *Circ Res* 91: 427–433.
- Kliwer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, et al. (1995) A Prostaglandin J2 Metabolite Binds Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma and Promotes Adipocyte Differentiation. *Cell* 83: 813–819.
- Couturier C, Brouillet A, Couriaud C, Koumanov K, Berezat G, et al. (1999) Interleukin 1beta Induces Type II-Secreted Phospholipase A(2) Gene in Vascular Smooth Muscle Cells by a Nuclear Factor kappaB and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Mediated Process. *J Biol Chem* 274: 23085–23093.
- Meade EA, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (1999) Peroxisome Proliferators Enhance Cyclooxygenase-2 Expression in Epithelial Cells. *J Biol Chem* 274: 8328–8334.
- Harris SG, Smith RS, Phipps RP (2002) 15-Deoxy-Delta 12,14-PGJ2 Induces IL-8 Production in Human T Cells by a Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *J Immunol* 168: 1372–1379.
- Imaizumi T, Kumagai M, Hatakeyama M, Tamo W, Yamashita K, et al. (2003) 15-Deoxy-Delta 12,14-Prostaglandin J2 Inhibits the Expression of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Endothelial Cells Stimulated with Lipopolysaccharide. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 71: 293–299.
- Monneret G, Li H, Vasilescu J, Rokach J, Powell WS (2002) 15-Deoxy-Delta 12,14-Prostaglandins D2 and J2 are Potent Activators of Human Eosinophils. *J Immunol* 168: 3563–3569.
- Alba G, El Bekay R, Chacon P, Reyes ME, Ramos E, et al. (2008) Heme Oxygenase-1 Expression is Down-Regulated by Angiotensin II and Under Hypertension in Human Neutrophils. *J Leukoc Biol* 84: 397–405.
- Kondo M, Oya-Ito T, Kumagai T, Osawa T, Uchida K (2001) Cyclopentenone Prostaglandins as Potential Inducers of Intracellular Oxidative Stress. *J Biol Chem* 276: 12076–12083.
- Alvarez-Maqueada M, El Bekay R, Alba G, Monteseirin J, Chacon P, et al. (2004) 15-Deoxy-Delta 12,14-Prostaglandin J2 Induces Heme Oxygenase-1

- Gene Expression in a Reactive Oxygen Species-Dependent Manner in Human Lymphocytes. *J Biol Chem* 279: 21929–21937.
33. Chen YC, Shen SC, Tsai SH (2005) Prostaglandin D(2) and J(2) Induce Apoptosis in Human Leukemia Cells Via Activation of the Caspase 3 Cascade and Production of Reactive Oxygen Species. *Biochim Biophys Acta* 1743: 291–304.
 34. Mazor R, Shurtz-Swirski R, Farah R, Kristal B, Shapiro G, et al. (2008) Primed Polymorphonuclear Leukocytes Constitute a Possible Link between Inflammation and Oxidative Stress in Hyperlipidemic Patients. *Atherosclerosis* 197: 937–943.
 35. Beaulieu AD, Paquin R, Rathanaswami P, McColl SR (1992) Nuclear Signaling in Human Neutrophils. Stimulation of RNA Synthesis is a Response to a Limited Number of Proinflammatory Agonists. *J Biol Chem* 267: 426–432.
 36. Carballo M, Marquez G, Conde M, Martin-Nieto J, Monteseirin J, et al. (1999) Characterization of Calcineurin in Human Neutrophils. Inhibitory Effect of Hydrogen Peroxide on its Enzyme Activity and on NF-kappaB DNA Binding. *J Biol Chem* 274: 93–100.
 37. Gilbert C, Rollet-Labelle E, Naccache PH (2002) Preservation of the Pattern of Tyrosine Phosphorylation in Human Neutrophil Lysates. II. A Sequential Lysis Protocol for the Analysis of Tyrosine Phosphorylation-Dependent Signalling. *J Immunol Methods* 261: 85–101.
 38. Davies JQ, Gordon S (2005) Isolation and Culture of Human Macrophages. *Methods Mol Biol* 290: 105–116.
 39. Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
 40. Naughton P, Foresti R, Bains SK, Hoque M, Green CJ, et al. (2002) Induction of Heme Oxygenase 1 by Nitrosative Stress. A Role for Nitroxyl Anion. *J Biol Chem* 277: 40666–40674.
 41. El Bekay R, Alvarez M, Carballo M, Martin-Nieto J, Monteseirin J, et al. (2002) Activation of Phagocytic Cell NADPH Oxidase by Norfloxacin: A Potential Mechanism to Explain its Bactericidal Action. *J Leukoc Biol* 71: 255–261.
 42. Mansfield MA (1995) Rapid Immunodetection on Polyvinylidene Fluoride Membrane Blots without Blocking. *Anal Biochem* 229: 140–143.
 43. Rothe G, Valet G (1990) Flow Cytometric Analysis of Respiratory Burst Activity in Phagocytes with Hydroethidine and 2,7-Dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol* 47: 440–448.
 44. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, et al. (2001) A PPAR Gamma-LXR-ABCA1 Pathway in Macrophages is Involved in Cholesterol Efflux and Atherogenesis. *Mol Cell* 7: 161–171.
 45. Santoro MG (1994) Heat Shock Proteins and Virus Replication: Hsp70s as Mediators of the Antiviral Effects of Prostaglandins. *Experientia* 50: 1039–1047.
 46. Chen M, Bradley MN, Beaven SW, Tontonoz P (2006) Phosphorylation of the Liver X Receptors. *FEBS Lett* 580: 4835–4841.
 47. Torra IP, Ismaili N, Feig JE, Xu CF, Cavasotto C, et al. (2008) Phosphorylation of Liver X Receptor Alpha Selectively Regulates Target Gene Expression in Macrophages. *Mol Cell Biol* 28: 2626–2636.
 48. McLeish KR, Klein JB, Coxon PY, Head KZ, Ward RA (1998) Bacterial Phagocytosis Activates Extracellular Signal-Regulated Kinase and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Human Neutrophils. *J Leukoc Biol* 64: 835–844.
 49. El Bekay R, Alvarez M, Monteseirin J, Alba G, Chacon P, et al. (2003) Oxidative Stress is a Critical Mediator of the Angiotensin II Signal in Human Neutrophils: Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase, Calcineurin, and the Transcription Factor NF-kappaB. *Blood* 102: 662–671.
 50. Lu Y, Cederbaum A (2007) The Mode of Cisplatin-Induced Cell Death in CYP2E1-Overexpressing HepG2 Cells: Modulation by ERK, ROS, Glutathione, and Thioredoxin. *Free Radic Biol Med* 43: 1061–1075.
 51. Rochette-Egly C (2003) Nuclear Receptors: Integration of Multiple Signalling Pathways through Phosphorylation. *Cell Signal* 15: 355–366.
 52. Weigel NL, Zhang Y (1998) Ligand-Independent Activation of Steroid Hormone Receptors. *J Mol Med* 76: 469–479.
 53. Mo J, Fang SJ, Chen W, Blobel GC (2002) Regulation of ALK-1 Signaling by the Nuclear Receptor LXRbeta. *J Biol Chem* 277: 50788–50794.
 54. Tamura K, Chen YE, Horiuchi M, Chen Q, Daviet L, et al. (2000) LXRalpha Functions as a cAMP-Responsive Transcriptional Regulator of Gene Expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8513–8518.
 55. Smoak K, Madenspacher J, Jeyaseelan S, Williams B, Dixon D, et al. (2008) Effects of Liver X Receptor Agonist Treatment on Pulmonary Inflammation and Host Defense. *J Immunol* 180: 3305–3312.
 56. Baranowski M (2008) Biological Role of Liver X Receptors. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 7: 31–55.
 57. Mayadas TN, Tsokos GC, Tsuboi N (2009) Mechanisms of Immune Complex-Mediated Neutrophil Recruitment and Tissue Injury. *Circulation* 120: 2012–2024.
 58. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS (2005) Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 29–38.
 59. Puddu GM, Cravero E, Arnone G, Muscari A, Puddu P (2005) Molecular Aspects of Atherogenesis: New Insights and Unsolved Questions. *J Biomed Sci* 12: 839–853.
 60. Yasunari K, Watanabe T, Nakamura M (2006) Reactive Oxygen Species Formation by Polymorphonuclear Cells and Mononuclear Cells as a Risk Factor of Cardiovascular Diseases. *Curr Pharm Biotechnol* 7: 73–80.
 61. Rosenblat M, Aviram M (2002) Oxysterol-Induced Activation of Macrophage NADPH-Oxidase Enhances Cell-Mediated Oxidation of LDL in the Atherosclerotic Apolipoprotein E Deficient Mouse: Inhibitory Role for Vitamin E. *Atherosclerosis* 160: 69–80.
 62. Joffre C, Leclere L, Buteau B, Martine L, Cabaret S, et al. (2007) Oxysterols Induced Inflammation and Oxidation in Primary Porcine Retinal Pigment Epithelial Cells. *Curr Eye Res* 32: 271–280.
 63. Scher JU, Pillinger MH (2009) The Anti-Inflammatory Effects of Prostaglandins. *J Investig Med* 57: 703–708.
 64. Kim EH, Surh YJ (2006) 15-Deoxy-Delta12,14-Prostaglandin J2 as a Potential Endogenous Regulator of Redox-Sensitive Transcription Factors. *Biochem Pharmacol* 72: 1516–1528.
 65. Hong HY, Jeon WK, Kim BC (2008) Up-Regulation of Heme Oxygenase-1 Expression through the Rac1/NADPH oxidase/ROS/p38 Signaling Cascade Mediates the Anti-Inflammatory Effect of 15-Deoxy-Delta 12,14-Prostaglandin J2 in Murine Macrophages. *FEBS Lett* 582: 861–868.
 66. Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, Randow F, Andersson LP, et al. (2001) The Role of PPAR-Gamma in Macrophage Differentiation and Cholesterol Uptake. *Nat Med* 7: 41–47.
 67. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, et al. (2001) PPAR-Gamma Dependent and Independent Effects on Macrophage-Genes Expression in Lipid Metabolism and Inflammation. *Nat Med* 7: 48–52.
 68. Kim MS, Sweeney TR, Shigenaga JK, Chui LG, Moser A, et al. (2007) Tumor Necrosis Factor and Interleukin 1 Decrease RXRalpha, PPARalpha, PPAR-gamma, LXRalpha, and the Coactivators SRC-1, PGC-1alpha, and PGC-1beta in Liver Cells. *Metabolism* 56: 267–279.
 69. Li AC, Binder CJ, Gutierrez A, Brown KK, Plotkin CR, et al. (2004) Differential Inhibition of Macrophage Foam-Cell Formation and Atherosclerosis in Mice by PPARalpha, beta/delta, and Gamma. *J Clin Invest* 114: 1564–1576.
 70. Wang JJ, Mak OT (2011) Induction of Apoptosis by 15d-PGJ2 Via ROS Formation: An Alternative Pathway without PPARgamma Activation in Non-Small Cell Lung Carcinoma A549 Cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 94: 104–111.
 71. Shin SW, Seo CY, Han H, Han JY, Jeong JS, et al. (2009) 15d-PGJ2 Induces Apoptosis by Reactive Oxygen Species-Mediated Inactivation of Akt in Leukemia and Colorectal Cancer Cells and shows in Vivo Antitumor Activity. *Clin Cancer Res* 15: 5414–5425.
 72. Calpe-Berdiel L, Rotllan N, Fievet C, Roig R, Blanco-Vaca F, et al. (2008) Liver X Receptor-Mediated Activation of Reverse Cholesterol Transport from Macrophages to Feces in Vivo Requires ABCG5/G8. *J Lipid Res* 49: 1904–1911.
 73. Stocker R, Keaney JF Jr (2004) Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol Rev* 84: 1381–1478.
 74. Bergt C, Pennathur S, Fu X, Byun J, O'Brien K, et al. (2004) The Myeloperoxidase Product Hypochlorous Acid Oxidizes HDL in the Human Artery Wall and Impairs ABCA1-Dependent Cholesterol Transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13032–13037.
 75. Chen M, Li W, Wang N, Zhu Y, Wang X (2007) ROS and NF-kappaB but Not LXR Mediate IL-1beta Signaling for the Downregulation of ATP-Binding Cassette Transporter A1. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C1493–501.
 76. Moon HS, Chung CS, Lee HG, Kim TG, Choi YJ, et al. (2007) Inhibitory Effect of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate on Lipid Accumulation of 3T3-L1 Cells. *Obesity (Silver Spring)* 15: 2571–2582.
 77. Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR (2000) Sterol-Dependent Transactivation of the ABC1 Promoter by the Liver X receptor/retinoid X Receptor. *J Biol Chem* 275: 28240–28245.
 78. Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM (1996) Inhibition of Adipogenesis through MAP Kinase-Mediated Phosphorylation of PPARgamma. *Science* 274: 2100–2103.
 79. Zhang B, Berger J, Zhou G, Elbrecht A, Biswas S, et al. (1996) Insulin- and Mitogen-Activated Protein Kinase-Mediated Phosphorylation and Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *J Biol Chem* 271: 31771–31774.
 80. Zhou X, Yin Z, Guo X, Hajjar DP, Han J (2010) Inhibition of ERK1/2 and Activation of Liver X Receptor Synergistically Induce Macrophage ABCA1 Expression and Cholesterol Efflux. *J Biol Chem* 285: 6316–6326.
 81. Chen ZY, Tseng CC (2005) 15-Deoxy-Delta12,14 Prostaglandin J2 Up-Regulates Kruppel-Like Factor 4 Expression Independently of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma by Activating the Mitogen-Activated Protein Kinase kinase/extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Pathway in HT-29 Colon Cancer Cells. *Mol Pharmacol* 68: 1203–1213.
 82. Kim EH, Na HK, Surh YJ (2006) Upregulation of VEGF by 15-Deoxy-Delta12,14-Prostaglandin J2 Via Heme Oxygenase-1 and ERK1/2 Signaling in MCF-7 Cells. *Ann N Y Acad Sci* 1090: 375–384.

CAPITULO 2. El factor activador de plaquetas (PAF) regula la transcripción del receptor hepático X (LXR) α a través del estrés oxidativo en neutrófilos humanos

En este trabajo se ha estudiado el efecto de la molécula proinflamatoria factor activador de plaquetas (PAF), que une los sistemas inmune innato y hemostático, sobre la señalización de LXR α en los neutrófilos humanos. Aunque por sí solo no ejerce algún efecto sobre la expresión de ARNm del LXR α , hemos encontrado que PAF, a dosis nanomolares, ejerce un efecto inhibitorio sobre la expresión de ARNm del LXR α y sus genes diana ABCA1, ABCG1 y SREBP1c inducida por TO901317 el cual es mediado por el receptor del PAF (PAFR). Se evidenció que este efecto es dependiente de la liberación de especies reactivas del oxígeno (ROS) inducidas por el PAF, ya que se potenció por el tratamiento con moléculas pro-oxidantes y se revirtió por la presencia de moléculas antioxidantes.

Además, los resultados de este trabajo ponen de manifiesto un posible mecanismo por el cual PAF ejerce su efecto proinflamatorio a través de la regulación del LXR α y de sus genes relacionados, induciendo la fosforilación de la molécula de LXR α , en forma dependiente de la activación de las MAPK ERK1/2.

Por otro lado, el pre-tratamiento de los neutrófilos con TO901319 durante al menos 4 horas, disminuyó la producción de ROS, la migración celular y la liberación de IL-8 inducida por PAF en una manera significativa, efecto que no se observó a tiempos mas corto, lo cual sugiere que el PAF podría actuar mediante la alteración de la expresión génica.

El presente trabajo evidenció que la actividad del LXR α parece estar regulada en los neutrófilos a través de la modificación post-traducciona (es decir, la fosforilación) causada por TO901317 y PAF como mecanismo modulador adicional de su actividad transcripcional. Estos resultados apoyan la utilidad potencial de los ligandos del LXR α en la modulación de las respuestas inflamatorias de neutrófilos y aporta información sobre los mecanismos por los cuales la expresión del LXR α es regulada.

Platelet-activating factor (PAF) down-regulates the expression of LXR α and its target genes in human neutrophils

María E. Reyes-Quiroz^{1,*}, Gonzalo Alba^{1,*}, Consuelo Santa-María², Javier Saenz¹, Isabel Geniz³, Juan Jiménez¹, Remedios Ramírez¹, José Martín-Nieto⁴, Elizabeth Pintado¹ and Francisco Sobrino¹

1 Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, Spain

2 Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, Spain

3 Distrito Sanitario Sevilla Norte, Servicio Andaluz de Salud, Sevilla, Spain

4 Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, Spain

Correspondence

F. Sobrino, Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Avda. Sánchez Pizjuán 4, E-41009 Sevilla, Spain

Fax: +34954907048

Tel: +34954559852

E-mail: fsobrino@us.es.

*These authors contributed equally to this work.

Running title

LXR α is down-regulated by PAF

Keywords

Inflammation, PAF, LXR α , transcriptional regulation, ERK 1 / 2

Abbreviations

LXR, liver X receptor; PAF, platelet-activating factor; PAFR, PAF receptor; ABCA1, ATP-binding cassette transporter A1; ABCG1, ATP-binding cassette transporter G1; SREBP1c, sterol response element binding protein 1c; NF- κ B, nuclear factor κ B; oxLDL, oxidized low density lipoprotein; ROS, reactive oxygen species; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases 1 and 2; MAPK, mitogen activated protein kinase; IL-8, interleukin 8; PDTC, Pyrollidine dithiocarbamate; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; MDA, malondialdehyde.

Abstract

Liver X receptors (LXRs) are ligand-activated members of the nuclear receptor superfamily that regulate the expression of genes involved in lipid metabolism and inflammation, although their role in inflammation and immunity is less known. It has been described that oxysterols/LXRs may act as anti-inflammatory molecules, although opposite actions have been also reported. In this work we have studied the effect of platelet-activating factor (PAF), a proinflammatory molecule, on LXR α signalling in human neutrophils. We have found that PAF exerts an inhibitory effect on mRNA expression of TO901317-induced LXR α , the ATP-binding cassette (ABC) transporters ABCA1 and ABCG1, and the sterol response element binding protein 1c (SREBP1c). This negative action was mediated by the PAF receptor, and was dependent on the release of reactive oxygen species elicited by PAF, since it was enhanced by pro-oxidant treatment and reversed by antioxidants. Current data also support that PAF induces phosphorylation of the LXR α molecule in an ERK1/2-mediated fashion. These results underline that a possible mechanism by which PAF exerts its pro-inflammatory effect is through the down-regulation of LXR α and its related genes, which supports the notion that LXR α ligands exert a modulatory role of the neutrophil-mediated inflammatory response.

Introduction

Liver X receptors (LXRs) are ligand-activated transcription factors of the nuclear receptor superfamily. They were first identified in 1994 by screening a rat liver cDNA library and were initially classified as orphan nuclear receptors given that their natural ligands were unknown [1]. Later on, their natural endogenous agonists have been identified and are now known to include mainly a variety of oxidized cholesterol derivatives, referred to as oxysterols and intermediate products of the cholesterol biosynthetic pathway[2]. LXRs act as key sensors of intracellular sterol levels that trigger a series of adaptive mechanisms in response to cholesterol overload and regulate positively the expression of an array of genes involved in virtually all aspects of cholesterol transport and metabolism, such as those encoding the ATP-binding cassette (ABC) transporters ABCA1 and ABCG1, and the sterol response element binding protein 1c (SREBP1c) [3]. Moreover, they are involved in the modulation of other cellular functions, such as fatty acid synthesis and metabolism, glucose homeostasis, steroidogenesis and neuronal homeostasis [4].

In addition, LXRs have been more recently associated with the modulation of the inflammatory response and innate immunity [2]. LXRs negatively regulate the transcription of pro-inflammatory genes by antagonizing the actions of transcription factors such as nuclear factor κ B (NF- κ B) [5,6]. However, the relationship between LXRs and the anti-inflammatory response is not well established, and the activation of LXRs has been also related to a positive regulation of inflammation in human macrophages [7] and mice neutrophils [8].

A novel role of LXRs in oxidative stress response has been recently described [9], and a positive regulation of the expression of antioxidant enzymes by these receptors has been found in the lung. Also, oxidative stress limits cholesterol outflow in human macrophages through a molecular cascade involving inhibition of LXR gene expression, which in turn leads to a decreased ABCA1 expression [10].

Platelet-activating factor (PAF) is a potent pro-inflammatory mediator that links the haemostatic and innate immune systems. While PAF is minimally expressed under normal physiological conditions, several cell types such as neutrophils and monocytes release significant amounts of PAF in particular conditions, such as oxidative stress [11]. PAF

contributes to increasing permeability of the endothelium, induces release of active oxygen species and contributes to low-density lipoprotein (LDL) oxidation [12]. PAF has been proposed as a key factor and initial trigger in atherosclerosis, and recently a modulation of PAF metabolism by bioactive food constituents has been associated with reduced atherosclerosis [13]. PAF exerts its physiological activities through a unique G-protein coupled receptor, the PAF receptor (PAFR). Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) particles are known to activate platelets through the PAFR [14,15].

PAF is an inducer of NF- κ B activation *in vivo* and *in vitro* [16]. This transcription factor is present in the cytoplasm of a variety of unstimulated cell types forming a complex with its inhibitory protein, I κ B. When cells are stimulated with PAF, I κ B is phosphorylated by the action of several kinases. Whereas in its reduced state I κ B is protected from phosphorylation, upon oxidative modification I κ B is inactivated by phosphorylation and subsequent ubiquitination, this allowing the translocation of NF κ B (p50 and p65 subunits) to the nucleus [17].

LXRs have been linked mainly to macrophages because of their direct relationship to atherosclerosis. However, increasing knowledge is accumulating on the role that neutrophils, the most abundant cell type in the immune system [18], play in the pathogenesis of vascular diseases [19]. In this context, we have very recently described that transcription of the LXR α gene is down-regulated by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ through oxidative stress in human neutrophils [20]. In the present work we extend our knowledge on regulation of LXR α in neutrophils using the proinflammatory molecule PAF. Present data show that when LXR α is activated by synthetic ligands, mRNA expression of LXR α and its target genes ABCA1, ABCG1 and SREBP1c becomes increased. Also, we have found that treatment of this cell type with PAF down-regulates transcriptional activation of these genes, and this modulatory process is exerted through extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2)-mediated phosphorylation.

Results

Effect of PAF on mRNA expression of LXR α and target genes in human neutrophils

LXRs comprise two isoforms: the inducible LXR α , expressed highly in the liver, adrenal glands, intestine, adipose tissue, macrophages, lung, and kidney, and LXR β , which is ubiquitously expressed [21]. We have previously found that LXR α mRNA was induced in human neutrophils by a synthetic ligand, TO901317, whereas the LXR β mRNA was constitutively expressed by these cells and its levels remained unchanged [20]. In preliminary experiments, we attempted to transfect human circulating neutrophils with plasmids containing cloned LXR α genes or a short interfering RNA (siRNA) specific for the human LXR α . Yet, these experiments were unsuccessful because of the difficulty to apply standard transfection and microinjection techniques to primary cultures of neutrophils, given that these are small, short-lived, and terminally-differentiated cells [22].

In the present work we first tested whether the addition of the pro-oxidant molecule PAF to neutrophils influenced LXR α mRNA expression induced by TO901317. We found that TO901317-induced LXR α transcription was inhibited by 10 nM PAF, and that this response was time-dependent (Fig. 1A). To order to assess whether this effect was mediated through its receptor, the PAFR, its antagonist, 1-O-hexadecyl-2-O-acetyl-sn-glycerol-3-phospho-(N,N,N-trimethyl) hexanolamine, was used [23]. This compound effectively cancelled the inhibitory effect of PAF on TO901317-induced LXR α expression in human neutrophils, as shown in Figure 1B.

We next performed assays of PAF dose-effect on the mRNA expression of LXR α and of a series of genes activated by this transcription factor, such as those encoding the cholesterol efflux transporters ABCA1 and ABCG1, and the sterol regulatory element-binding protein 1c, SREBP1c. We observed that a concentration of 10 nM PAF produced a clear inhibition of TO901317-induced LXR α mRNA expression and a decrease of mRNA levels of its target genes ABCA1, ABCG1 and SREBP1c. At doses lower than 10 nM PAF we did not observe any effect of this ligand (data not shown), whereas at higher doses, such as 100 nM PAF, its inhibitory effect was lost. Assays made using the LXR α natural agonist, 22-R-OH-cholesterol, which is chemically different from TO901317, elicited a similar response than did latter (Fig. 1D).

Effect of PAF and TO901317 on IL-8 release, cellular migration and ROS production

With the purpose of evaluating the effects of LXR α on the pro-inflammatory properties of PAF, we studied the release of IL-8, chemotaxis and ROS production by human neutrophils treated with this ligand. IL-8 is the main cytokine produced by this cell type under pro-oxidant conditions. Figure 2A shows that PAF strongly induced a significant IL-8 release to the medium by human neutrophils, and that this effect was hindered by previous TO901317 treatment. Another important role of PAF is enhancing neutrophil extravasations at nM levels. Thus, chemotaxis was also assayed, with the finding that TO901317 treatment inhibited as well PAF-induced neutrophil migration activity (Fig. 2B). Treatment with the natural agonist 22-R-OH-cholesterol also reduced this migration, but to a minor extent than TO901317. Therefore, for both parameters measured, i.e., IL-8 levels and chemotaxis, PAF clearly exhibited pro-inflammatory properties in human neutrophils, whose mobility was diminished when LXR α was activated by its agonists.

PAF activates NADPH oxidase in neutrophils. Therefore, subsequent experiments were oriented to address where the down-regulatory effect of PAF on LXR α mRNA expression affected the release of reactive oxygen species (ROS) elicited by PAF. With this purpose, we measured ROS production in neutrophils pre-treated with TO901317 for 1, 2 and 5 h before PAF addition. We observed that the ability of PAF to induce ROS was decreased in a time-dependent fashion (Fig. 2C). When this pretreatment was shorter than 1 h we did not observe any change (data not shown), and TO901317 did not induce any ROS production by itself (Fig. 2C). These facts suggested that TO901317 did alter the intracellular redox status in human neutrophils.

Effect of intracellular redox status on mRNA expression of LXR α and its target genes in human neutrophils

Next, we tested if the down-regulation on LXR α mRNA expression by PAF was affected by the intracellular redox status. With this purpose, neutrophils were separately treated with both antioxidant and pro-oxidant molecules. Antioxidants with thiol-reducing groups, such as GSH or N-acetyl cysteine (NAC), reversed the inhibitory effect of PAF on LXR α expression, as well as on its target genes ABCA1, ABCG1 and SREBP1c (Fig. 3A). Similarly, other chemically different

antioxidants, such as vitamin E and TEMPO (2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy), also counteracted the inhibitory effect of PAF on the mRNA expression of LXR α and its target genes (Fig. 3B). In contrast, under pro-oxidant conditions, i.e. treatment with Fe²⁺/Cu²⁺ ions (Fenton reaction), the inhibitory effect of PAF on LXR α and LXR α -responsive genes expression was found to become potentiated (Fig. 3C).

Possible implication of MAPKs on mRNA expression of LXR α and its target genes in human neutrophils

LXR α is phosphorylated at Ser198 by mitogen-activated protein kinases (MAPKs) [24]. Thus, we set to analyze the possible participation of MAPK pathways in modulation of LXR α mRNA expression and its down-regulation promoted by PAF in human neutrophils. Neutrophils were incubated, prior to addition of PAF to the medium, with different kinase inhibitors such as PD098059 (an inhibitor of MEK1/2, the upstream activator of ERK1/2), SB203580 (a p38 MAPK inhibitor) and SP600125 (an inhibitor of c-Jun N-terminal kinases 1 and 2, JNK1/2). Neither SB203580 nor SP600125 had any significant effect on TO901317-promoted LXR α transcription (Fig. 4A), nor did they alter the negative effect of PAF on this process (Fig. 4A). Therefore, neither p38 nor JNK1/2 MAPKs seemed to be involved in regulation of LXR α gene transcription in human neutrophils. Nevertheless, when these cells were preincubated with the MEK1/2 inhibitor, PD098059, LXR α mRNA synthesis induced by TO901317 was considerably enhanced (Fig. 4A). Actually, this inhibitor was able by itself to induce LXR α mRNA expression (Fig. 4A). The effect observed on LXR α with the inhibitor PD098059 was extensible to its target genes (Fig. 4B). These data suggested that ERK1/2 activation down-regulates mRNA transcription induced by TO901317 of LXR α and its target genes, and that the inhibitory effect of PAF on this process could be mediated by ERK1/2 activation.

Next, we tested the effect of PAF on the phosphorylation status of ERK1/2 (p42/44) in neutrophils of different times of incubation, up to 1h. We observed that PAF elicited maximum levels of ERK1/2 phosphorylation at 3 min, and that this effect was progressively decreased at longertimes (Fig. 5A). Moreover, when a dose-response study was performed at PAF concentrations ranging from 1 to 100 nM, this ligand elicited ERK1/2 phosphorylation in a dose-dependent manner, illustrated in Figure 5B, with the highest values being observed at a 10 nM

PAF concentration. In contrast, TO901317 did not induce any ERK1/2 phosphorylation by itself. Interestingly, the pretreatment with TO901317 inhibited instead ERK1/2 phosphorylation elicited by PAF.

Implication of NF- κ B on mRNA expression of LXR α and its target genes in human neutrophils

PAF is known to act as an activator of NF- κ B *in vivo* and *in vitro* [16] by promoting phosphorylation of I κ B inhibitory proteins. These become then ubiquitinated, releasing NF- κ B which thereafter translocates to the nucleus to activate its target genes [17]. Many kinases have been suggested to potentially phosphorylate I κ B, which led us to study whether the inhibition of ERK phosphorylation by PD098059 affected NF- κ B activation elicited by PAF. With this purpose, neutrophils were preincubated at 37°C in the presence or absence of PD98059 or MG132 (a specific proteasome inhibitor that blocks NF- κ B activation). Then, the cells were treated with PAF, and I κ B levels were measured in total cell extracts. PAF induced I κ B degradation, with levels found being a 30% lower than in untreated neutrophils (Fig 6A). However, when these were treated with both PAF and MG132, the inhibitory effect of PAF on I κ B disappeared, as it was expected (Fig. 6A). Treatment of neutrophils with PAF and PD098059 also reversed the degradation of I κ B observed upon PAF treatment. We thus concluded that ERK inhibition blocked the NF- κ B activation induced by PAF. Further, in order to analyze whether this I κ B decrease correlated with NF- κ B p65 subunit nuclear translocation, immunocytochemical experiments were performed. Figure 6B illustrates that in resting neutrophils the p65 subunit was exclusively located in the cytosol, whereas in PAF-treated cells this polypeptide appeared as well in the nucleus (albeit remaining partly cytosolic). Noticeably, I κ B disappearance from the cytosol was observed to occur prior to p65 nuclear translocation (Fig. 6A).

Subsequent experiments were addressed to study if NF- κ B was implicated in the PAF inhibition of the expression of LXR α and its target genes. With this purpose, the cells were preincubated at 37°C with or without the NF- κ B inhibitor MG132 before they were treated with

PAF, and LXR α expression was finally induced by TO901317 addition. As shown in Figure 6C, we observed that the NF- κ B inhibitor was able to reverse the PAF negative effect on the expression of all 4 genes, i.e. LXR α and its targets ABCA1, ABCG1 and SREBP1c.

Discussion

LXRs regulate lipid metabolism and exert anti-inflammatory effects, although the latter are not well established. Most studies on LXRs have focused on macrophages, with little attention being paid to neutrophils. We have recently described that mRNA expression of LXR α (but not LXR β) becomes induced in human neutrophils by a synthetic LXR ligand, TO901317 [20]. In the present work we have investigated the influence on LXR α mRNA expression in neutrophils exerted by PAF, a strong pro-inflammatory and pro-oxidant mediator that links the hemostatic and innate immune systems. We observed that PAF at a 10 nM concentration produced a clear inhibition of TO901317-induced LXR α mRNA expression, which was extensive to that of LXR target genes ABCA1, ABCG1 and SREBP1c. Similar behaviour was observed when the natural LXR ligand 22-R-OH-cholesterol was used instead of TO901317.

Neutrophils are activated by PAF via its receptor, PAFR, which is a member of the seven transmembrane-domain receptor family (also termed G protein-coupled receptors) participating in various second messenger systems, including those involving phospholipase A₂, C and D activation and the MAPK cascade [25]. By using a PAFR antagonist, we found evidence that the effects on LXR α activation elicited by PAF were mediated by this receptor. In this context, the PAFR has been associated with foam cell formation because of playing a pivotal role in mediating the oxLDL uptake, and could thus constitute a promising target for atherosclerosis treatment [26].

Next, possible changes in the pro-inflammatory properties of PAF exerted on neutrophils after oxysterol activation of LXR α were evaluated. PAF mediates the effect of different proinflammatory cytokines [27] and IL-8 is an important cytokine produced by neutrophils under oxidative conditions. In this context, we have found in the present work that IL-8 release is significantly decreased in PAF-stimulated neutrophils when LXR α is activated by TO901319. Interaction of oxLDL with the PAFR also induces IL-8 release in macrophages [26], and other authors have described that LXR α may regulate cytokine release in human monocytes [28] and pancreatic islets [29]. PAF also induces chemotaxis in neutrophils, and this important proinflammatory action was also found reduced in LXR α -activated neutrophils in this work. Similar results have been described in TO901317-treated neutrophils from lung [30]. PAF

can directly stimulate the production of ROS by inflammatory cells, such as neutrophils, eosinophils and macrophages *in vitro* as well as *in vivo* [31]. We have also assessed this pro-inflammatory capacity of PAF, and found that the pre-treatment of neutrophils with TO901319 diminished the ROS release induced by PAF in a timely fashion. However, when PAF pre-treatment was shorter than 1 h, we did not observe any change. The long pre-treatment time needed to observe changes, as described above, suggested that PAF might act by altering gene expression.

LXRs activity appears to be regulated by phosphorylation. In studies carried out on macrophages, Chen et al. [24] provided the first evidence that LXRs are phosphorylated proteins, and that LXR α is phosphorylated by MAPKs on Ser198, a residue located in its hinge region [24]. It was later found that PAF preferentially activates p38 MAPK, as well as ERK to a lower extent, but that it does not activate JNKs in neutrophils [11]. We thus examined the potential participation of MAPKs in the modulation of LXR α mRNA expression in these cells. We found that the treatment of neutrophils with PD098059, an inhibitor of the ERK upstream activator, MEK1/2, resulted in a great increase of mRNA synthesis of LXR α and other target genes induced by TO901317. Even, PD098059 alone was able to augment the transcription of these genes, and furthermore we observed that PD098059 reversed the effect of PAF on TO901317-induced LXR α , ABCA1, ABCG1 and SREBP1c mRNA expression in a dose-dependent manner. These data strongly suggested that ERK1/2 activation is involved in the down-regulation of TO901317-induced transcription of these genes exerted by PAF in human neutrophils. Therefore, LXR α activity appears to be regulated in these cells through post-translational modification (i.e., phosphorylation) elicited by TO901317 and PAF.

Post-translational modifications of nuclear receptors provide a rapid cellular response to environmental changes, the main of such changes being phosphorylation, acetylation and SUMOylation [32]. Post-translational modification by phosphorylation has been described for nuclear receptors other than LXR α [33,34], although the functional significance of phosphorylation in modulation of LXR activity has not been clarified so far. Chen et al. [24], found that a phosphorylation-deficient LXR α mutant, S198A, responds to ligands as effectively as does the wild-type on activation of the expression of ABCA1 or ABCG1 genes, this suggesting that phosphorylation at Ser198 is not required for the expression of these genes

under basal conditions. In contrast, Torra et al. [35] revealed a previously unrecognized role of phosphorylation in restricting the repertoire of LXR α -responsive genes. Expression of some established LXR α target genes, such as those encoding the apoptosis inhibitor of macrophages (AIM) and lipoprotein lipase (LPL), but not others such as ABCA1 or SREBP1c, is increased in RAW 264.7 macrophages expressing the S198A phosphorylation-deficient mutant LXR α as compared to those exhibiting the wild-type receptor. Other authors have reported LXR α phosphorylation by kinases other than MAPKs. In this context, Yamamoto et al. [34] described in liver that protein kinase A (PKA) directly phosphorylates the LXR α protein and inhibits SREBP1c transcription, suggesting a relationship between phosphorylation of LXR α by PKA in fasting conditions and the reduction of the expression of the lipogenic gene, SREBP1c. Also, Delvecchio et al. [36] described that transcriptional activation of LXR α and related genes is decreased by activation of the protein kinase C (PKC) signalling pathway in monkey kidney COS-1 cells.

Several mechanistic effects have been associated with the phosphorylation of LXR α , such as a decreased ability of dimerization with its obligate partner, the retinoid X receptor (RXR), a decreased binding of the phosphorylated heterodimer to LXR-responsive DNA elements, or an altered cofactor recruitment to its regulated promoters [34]. A possible candidate for preferential binding to the S198-phosphorylated LXR α could be the corepressor NCoR, for which a reduced recruitment by the non-phosphorylatable S198A LXR α has been observed [35].

PAF is extracellularly released almost immediately in response to inflammatory stimuli and induced NF- κ B activation. This transcription factor is a key regulator of the levels of many proteins involved in the inflammatory process, such as receptors, enzymes and cytokines [27]. Many of the genes inhibited by LXRs are established targets of NF- κ B signalling [37], and activation by PAF of this transcription factor is exerted through the generation of ROS [31]. Actually, our results indicate that PAF acts as an NF- κ B activator in an ERK1/2-dependent manner. Besides, NF- κ B is implicated in the PAF negative effects on the expression of LXR α and its target genes. Taking together these results, we can orderly suggest that PAF, through

ROS production, would induce ERK1/2 phosphorylation, and that this in turn would inhibit LXR α and its target genes expression in a NF- κ B-dependent manner.

Intracellular thiols (or oxidants) could also regulate NF- κ B activation at other points in this signal transduction pathway [38]. PAF modulates the redox status in U-937 monocyte cells, and antioxidants mostly inhibit PAF-induced NF- κ B activation. In this regard, the NF- κ B inhibitor Pyrollidine dithiocarbamate (PDTC), a thiol-containing agent known to be a stable antioxidant, totally inhibited PAF-induced secretion of MCP-1 by U-937 monocytes [39].

In summary, the results herein presented underscore that a possible mechanism for the proinflammatory effect of PAF may be the down-regulation of LXR α and its target genes. Despite increasing knowledge on the physiological function and mechanisms of action of LXRs, little is known about the mechanisms by which LXR α expression is regulated. In this light our results presented in this work point to LXR α phosphorylation as an additional modulatory mechanism of its transcriptional activity. They also support the potential usefulness of LXR α ligands in the therapeutic of neutrophil inflammatory responses.

Experimental procedures

Materials

TO901317 and PAF were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI) and 1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phospho-(N,N,N-trimethyl)hexanolamine (aPAF), SP600125, SB203580 and PD098059 from Calbiochem (San Diego, CA, USA). RPMI 1640 medium was obtained from Biomedica (Boussens, France); Dextran T-500 and lymphocyte separation medium (Ficoll-Paque) from GE Healthcare (Barcelona, Spain), and polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes from Pall (Madrid, Spain). Rabbit polyclonal antibodies against phosphorylated (Thr202/Tyr204) ERK1/2 and total (unphosphorylated plus phosphorylated) ERK1/2 were products of New England Biolabs (Beverly, MA); anti-p65 and anti-I κ B were obtained from Santa Cruz Biotechnology; Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit and anti-mouse IgG were products of Promega (Madison, WI); mouse monoclonal anti-GAPDH was purchased from Chemicon International (Madrid, Spain); 22-R-OH-cholesterol, 2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl (TEMPO), luminol, reduced glutathione (GSH), N-acetylcysteine (NAC), FeSO₄, CuSO₄, protease inhibitor cocktail, vitamin E, MG132, IL-8, horseradish peroxide and diisopropyl fluorophosphate (DFP), were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Fetal calf serum, L-glutamine, streptomycin, penicillin and amphotericine B were obtained from BioWhittaker (Basel, Switzerland).

Isolation and culture of human neutrophils

Human peripheral blood neutrophils were isolated from fresh heparinized blood of human donors by Dextran T-500 sedimentation, followed by Ficoll-Paque gradient centrifugation and hypotonic lysis of residual erythrocytes [40]. For experiments, 2×10^7 neutrophils were cultured in RPMI complete medium (RPMI 1640, Life Technologies BRL, Rockville, MD) containing 10% (v/v) heat-inactivated bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 μ g/mL streptomycin, 100 IU/mL penicillin and 250 ng/mL amphotericine B. Before all stimulations, neutrophil suspensions were pre-incubated at room temperature with 1 mM DFP (to minimize proteolysis) for 5 min [41], and

then incubated at 37°C for the times indicated in each experiment. In all experiment cell viability ranged between 90 and 97%, is estimated from the lactic dehydrogenase release assay after treatment [42].

RT-PCR quantitation of mRNA levels

Real-time PCR analysis was performed using SYBR Green and the ABI Prism 7300 sequence detection system from Applied Biosystems (Foster City, CA) under the specific thermocycler conditions recommended by the manufacturer for the primers used. PCR reactions were performed in triplicate. Each sample was also analyzed for β -actin transcript levels to normalize for RNA input amounts. For the relative quantification of gene expression, the comparative threshold cycle method was used as described in the ABI Prism 7700 User Bulletin 2 [43]. Primers were designed with Primer Express (Applied Biosystems) and synthesized by Roche Diagnostics, and their sequences were as follows:

LXR α : forward, 5'-AAGCCCTGCATGCCTACGT; reverse, 5'-TGCAGACGCAGTGCAAACA;
SREBP1c: forward, 5'-CATGTCTTCGATGTCGGTCAG; reverse, 5'-TCCTGTTGCCCATATGAAATCA; ABCA1: forward, 5'-CCCTGTGGAATGTACCTATGTG;
reverse, 5'-GAGGTGTCCCAAAGATGCAA. ABCG1: forward, 5'-CAGTCGCTCCTTAGCACCA
reverse, 5'-TCCATGCTCGGACTCTCTG; β -actin: forward, 5'-CCAGCTCACCATGGATGATG;
reverse, 5'-ATGCCGGAGCCGTTGTC.

ELISA quantitation of IL-8 release

Cell culture supernatants were collected after treatments, and the levels of secreted interleukin 8 (IL-8) were quantified using the Human IL-8 ELISA Kit (Raybiotech, Norcross, GA). Plates were read on a Wallac 1420 Victor² spectrofluorometer (Perkin Elmer, Madrid, Spain).

Chemotaxis assay

Migration of neutrophils was assessed in Transwell migration chambers (6.5 mm diameter, 5 µm pore size; Costar plates type 3421). Cells were preincubated with or without TO901317 during 4 h at 37°C. Chemoattractants were deposited in the lower compartment in a final volume of 0.6 ml of RPMI 1640, and the plates were prewarmed at 37°C. Then 0.1 ml of medium containing 10^6 neutrophils was deposited on each detachable insert, which was placed over the chemoattractant solution. Loaded chambers were incubated for 2 h at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. In separate wells, neutrophils were added to the lower compartment and used as controls representing 100% migration. At the end of the incubation period, the cells that had migrated into the bottom chambers were collected and centrifuged. After staining with FITC-conjugated monoclonal antibodies to CD16 (Immunotech, Marseille, France), the cells were fixed with 1% paraformaldehyde and finally counted on a flow cytometer. The results are presented as the mean ± SEM from three separate experiments, and are expressed as the percentage of total neutrophils initially added to each chamber.

Measurement of reactive oxygen species (ROS) production

Cells were incubated with or without TO901317 during 4 h at 37°C. Then they were treated with 10 µg/ml horseradish peroxidase (HRP) enzyme and 40 µM luminol, and ROS assay was carried out as indicated previously [44]. The luminol-plus-horseradish peroxidase-derived chemiluminescence was initiated by adding 3 mM NADH as a substrate. The production of ROS in neutrophils was detected in the Wallac 1420 Victor² luminescence analyzer.

Western blotting analysis of phosphorylated ERK1/2 and IκB

Cells were rinsed once with ice-cold PBS, resuspended in a lysis solution containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM EDTA, 50 mM NaF, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and kept on ice for 30 min. Then the cells were disrupted by sonication on ice and, after centrifugation at

12,000×g for 5 min at 4°C, protein concentration in the supernatant was determined by the Bradford method [45], using BSA as a standard. Proteins were boiled in Laemmli loading buffer, resolved by SDS-PAGE (10% polyacrylamide) and transferred to PVDF membranes as previously described [44]. The blots were probed, without need of prior blocking, with rabbit polyclonal anti-phospho-ERK1/2, at a 1:1,000 dilution or rabbit polyclonal anti-IκB, at a 1:2,000 dilution in PBS plus 0.5% BSA and 0.02% Tween-20 [46]. Thereafter, HRP-conjugated antibodies to rabbit or mouse IgG were used at a 1:5,000 or 1:20,000 dilution, respectively, in PBS plus 0.5% casein, and detection was carried out by enhanced chemiluminescence [40]. To verify even protein loading, the blots were subsequently stripped and reprobed with mouse monoclonal antibodies against GAPDH at a 5,000 dilution. Band intensities were measured by scanning densitometry analysis using the Scion Image software (Frederick, MD).

Immunofluorescence microscopy analysis of NF-κB p65 nuclear translocation

The nuclear translocation of the NF-κB p65 subunit in human neutrophils was assessed by immunofluorescence cell staining, as described previously [47] with minor modifications. After stimulation with PAF for 15 min, neutrophils (10^7 cells) were harvested, washed with PBS and smeared onto poly-L-lysine-coated glass slides, and then fixed at room temperature with 2% paraformaldehyde for 30min. After washing with PBS, unspecific binding was blocked with PBS containing 10% (v/v) heat-inactivated bovine serum, 0.1% Triton X-100 and 1 mg/ml BSA. Further, the cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10min, and thereafter incubated with rabbit anti-p65 IgG at a 1:100 dilution overnight at 4°C, washed extensively and stained with FITC-conjugated anti-rabbit IgG at a 1:500 dilution for 30min. After final washing, coverslips were mounted on the slides using 50% glycerol in PBS. Immunostained cells were observed and photographed using a Nikon EFD-3 fluorescence microscope.

Statistical analysis

mRNA levels measured by real-time PCR are expressed as fold induction relative to untreated cells (mean ± SEM from a minimum of 3 independent experiments performed with similar

results). Protein levels measured from Western blots are expressed in arbitrary units. The results were statistically analyzed using the Statgraphics Plus 5.0 software (Manugistic Inc., Rockville, MD) by means of ANOVA and the Student's paired t-test.

Acknowledgements

M.E.R-Q was supported by a fellowship from the Asociación Virgen Macarena, Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla. G.A. was supported by fellowships from the Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2006-13802) and the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (P08-CVI-03550). This work was funded by grants from the latter (P06-CTS-01936 and P08-CVI-03550) to F.S., and from the Consejería de Salud, Junta de Andalucía (CS 0116/2007) to E. P. We are indebted to Margarita Rodríguez Borrego for her technical assistance.

Competing interests

The authors have declared that no competing interests exist.

Figure legends

Fig. 1. Effect of platelet-activating factor (PAF) on mRNA expression of LXR α and target genes in human neutrophils. Neutrophils were incubated at 37°C with or without 10 nM PAF (A and B) for 1 h. In panel B, cells were additionally preincubated at 37°C with or without 10 nM PAFR antagonist 1-O-hexadecyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phospho-(N,N,N-trimethyl)hexanolamine (aPAF) for 30 min prior to PAF addition. Then, 1 μ M TO901317 was added and neutrophils were incubated as above for further 5 h (A and B). In another set of assays, the cells were cultured with or without PAF at the indicated doses for 1 h, and then treated or not with 1 μ M TO901317 (C) or 22R-OH-cholesterol (22R-OH-Chol) (D) for 5 h. Control cells were cultured for the same times as treated cells, but without any additions. Each panel is representative of a set of three experiments yielding similar results and values are plotted as the mean \pm SEM. Statistical data from experiments addressing mRNA levels measured by real-time RT-PCR corrected for differences in β -actin mRNA levels, expressed as fold induction: * p <0.05 for PAF and TO901317- or 22R-OH-Chol-treated versus PAF-untreated; ** p <0.01 for aPAF-, PAF- and TO901317-treated versus aPAF-untreated.

Fig. 2. Effect of platelet-activating factor (PAF) and TO901317 on IL-8 release, cellular migration and ROS production. (A) Neutrophils were preincubated at 37°C with or without 1 μ M TO901317 for 5 h. Then, the cells were treated or not with 10 nM PAF for 1 h and levels of IL-8 released were analyzed by ELISA. (B) Cells were stimulated or not with 1 μ M TO901317 or 22R-OH-cholesterol (22R-OH-Chol) for 5 h and then PAF was added for 1 h. Neutrophil migration activity was assayed in Transwell chambers and the results were expressed as the percentage of cells that migrated from the upper to the lower compartment. (C) Neutrophils were treated with 1 μ M TO901317 for 1, 2 or 5 h. Then, 10 μ g/ml HRP and 40 μ M luminol were added, and cells were stimulated with 10 nM PAF. The production of ROS by neutrophils was detected in a luminescence analyzer. Control cells were incubated for the same times than treated cells without any additions. Each panel is representative of a set of three experiments yielding similar results and values are plotted as the mean \pm SEM. Statistical data from experiments: * p <0.01 for PAF-treated versus untreated; ** p <0.01 for PAF and TO901317-

treated versus TO901317-untreated; $\text{p} < 0.01$ for PAF and 22R-OH-Chol-treated versus PAF and 22R-OH-Chol-untreated.

Fig. 3. Effect of the intracellular redox status on mRNA expression of LXR α and its target genes in human neutrophils. Cells were preincubated with 5 mM reduced glutathione (GSH), 1 mM N-acetyl cysteine (NAC), 0.1 mM vitamin E, 0.1 mM 2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl (TEMPO) (A and B) or 0.1 mM FeSO $_4$ plus CuSO $_4$ (C) at 37°C for 1 h. Then, 10 nM PAF was added and the cells were incubated for further 1 h, and thereafter stimulated or not with 1 μ M TO901317 during 5 h. Control cells were cultured for the same times without any additions. Finally, the levels of mRNA were analyzed by real-time RT-PCR and corrected for differences in β -actin mRNA levels, and are indicated as fold induction. Each panel is representative of a set of three experiments yielding similar results and values are plotted as the mean \pm SEM. Statistical data: * $\text{p} < 0.01$ for TO901317- stimulated, PAF and GSH, NAC, Vitamine E, TEMPO or FeSO $_4$ plus CuSO $_4$ - treated versus antioxidant- or pro-oxidant-untreated; ** $\text{p} < 0.01$ for FeSO $_4$ plus CuSO $_4$ - stimulated and TO901317- treated versus FeSO $_4$ plus CuSO $_4$ - untreated.

Fig. 4. Possible implication of MAP kinases on mRNA expression of LXR α and its target genes in human neutrophils. (A) Cells were preincubated at 37°C with or without 25 μ M PD98059, 10 μ M SB203580 or 1 μ M SP600125 for 30 min. Then, they were treated with 10 nM PAF for 1 h, and after addition of 1 μ M TO901317 the cells were incubated at 37°C for further 5 h. (B) PD98059 was added to cells at the indicated concentrations. After 30 min, 10 nM PAF was added for 1 h and thereafter they were incubated with 1 μ M TO901317 for 5 h. The levels of mRNA were analyzed by real-time RT-PCR and corrected for differences in β -actin mRNA levels, and are indicated as fold induction. Each panel is representative of a set of three experiments yielding similar results, and values are plotted as the mean \pm SEM. Statistical data: * $\text{p} < 0.01$ for PD98059 and TO901317- stimulated versus PD98059- untreated; ** $\text{p} < 0.01$ for PD98059, PAF and TO901317- treated versus PD98059- untreated.

Fig. 5. Cells were incubated with 1 μ M TO901317 for 5 h (B). Then, PAF was added at 10 nM for the indicated times (A) or at the indicated concentrations for 15 min (B). Phosphorylated

ERK1/2 (pERK1/2) levels were analyzed on cell lysates by Western blotting and are given in arbitrary units. Control cells were cultured for the same times without any additions. Each panel is representative of a set of three experiments yielding similar results, and values are plotted as the mean \pm SEM. Statistical data: * $p < 0.05$ for PAF- treated versus untreated; ** $p < 0.01$ for PAF and TO901317- treated versus TO901317- untreated.

Fig. 6 Effect of PAF on NF- κ B activation in human neutrophils. Cells were preincubated at 37°C with or without 25 μ M PD98059 (A) or 25 μ M MG132 (A and C) during 30 min. Then, they were incubated with 10 nM PAF for 3 min (A), 15 min (B) or 1 h (C), and thereafter with or without 1 μ M TO901317 for further 5 h (C). Levels of I κ B and GAPDH were assessed by Western blotting and expressed as I κ B/GAPDH ratio (A). p65 nuclear translocation was assessed by using antibodies against p65 and FITC-conjugated anti-rabbit IgG. Immunostained and DAPI-stained cells were photographed under a Nikon EFD-3 fluorescence microscope (B). The levels of mRNA were analyzed by real-time RT-PCR, and corrected for differences in β -actin mRNA levels, and are expressed as fold induction (C). Each panel is representative of a set of three experiments yielding similar results and values are plotted as the mean \pm SEM. Statistical data: * $p < 0.01$ for PAF- treated versus untreated; ** $p < 0.01$ for PAF and PD098059 or MG132- treated versus PD098059 or MG132- untreated; $\diamond p < 0.05$ for TO901317 and PAF and MG132- treated versus MG132- untreated.

Fig. 1

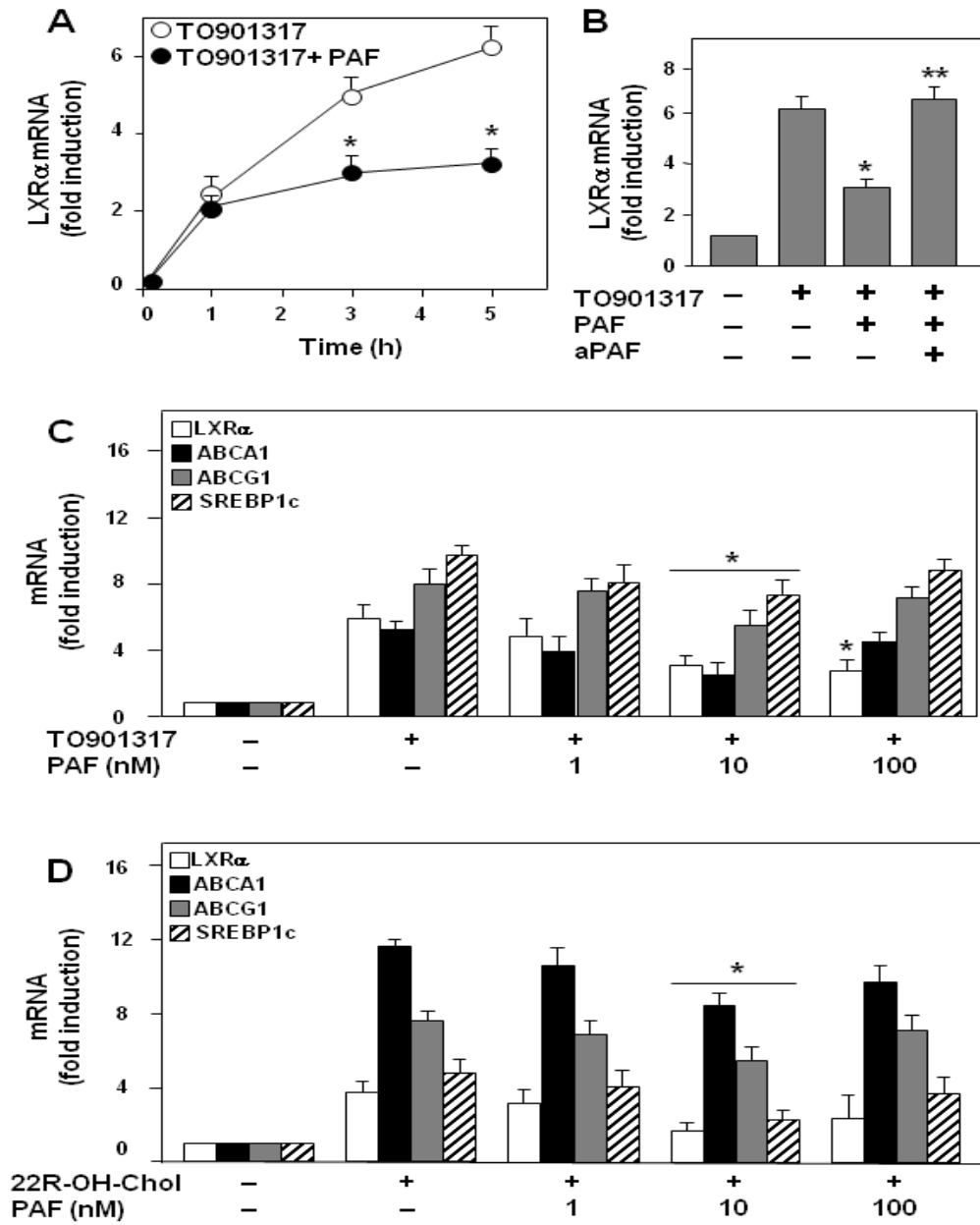


Fig. 2

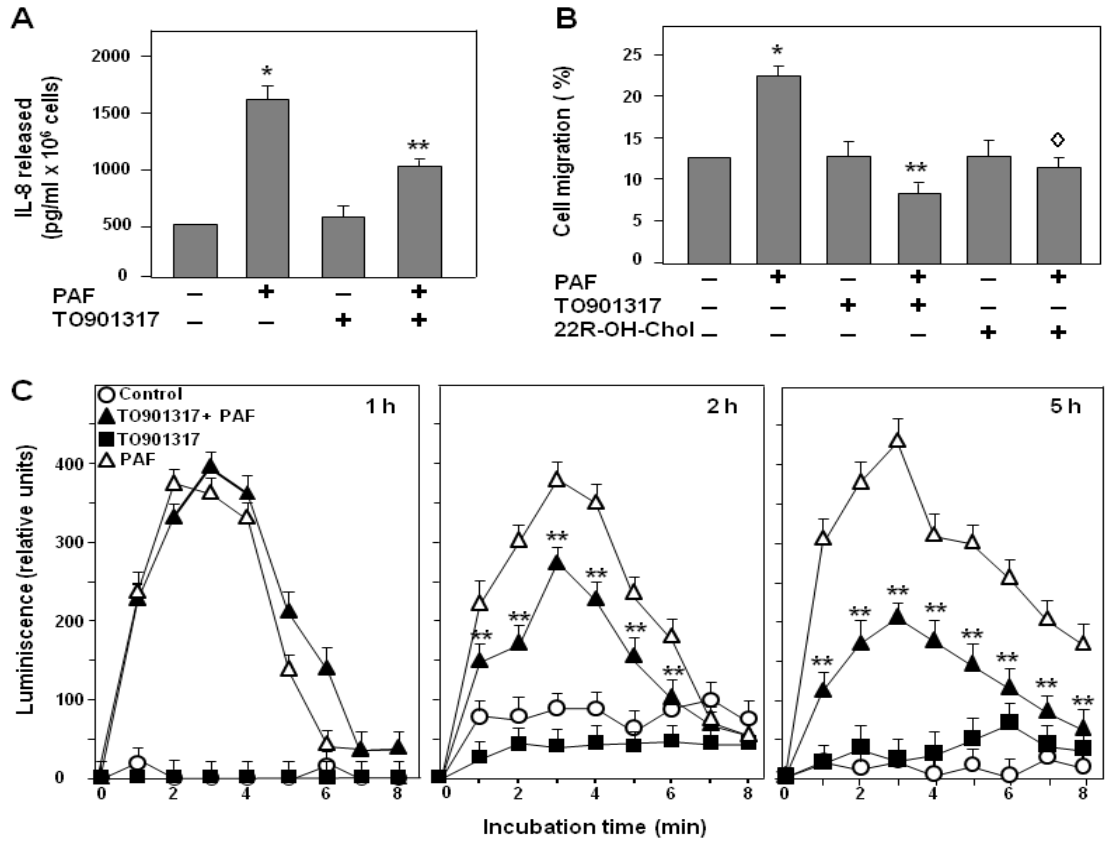


Fig. 3

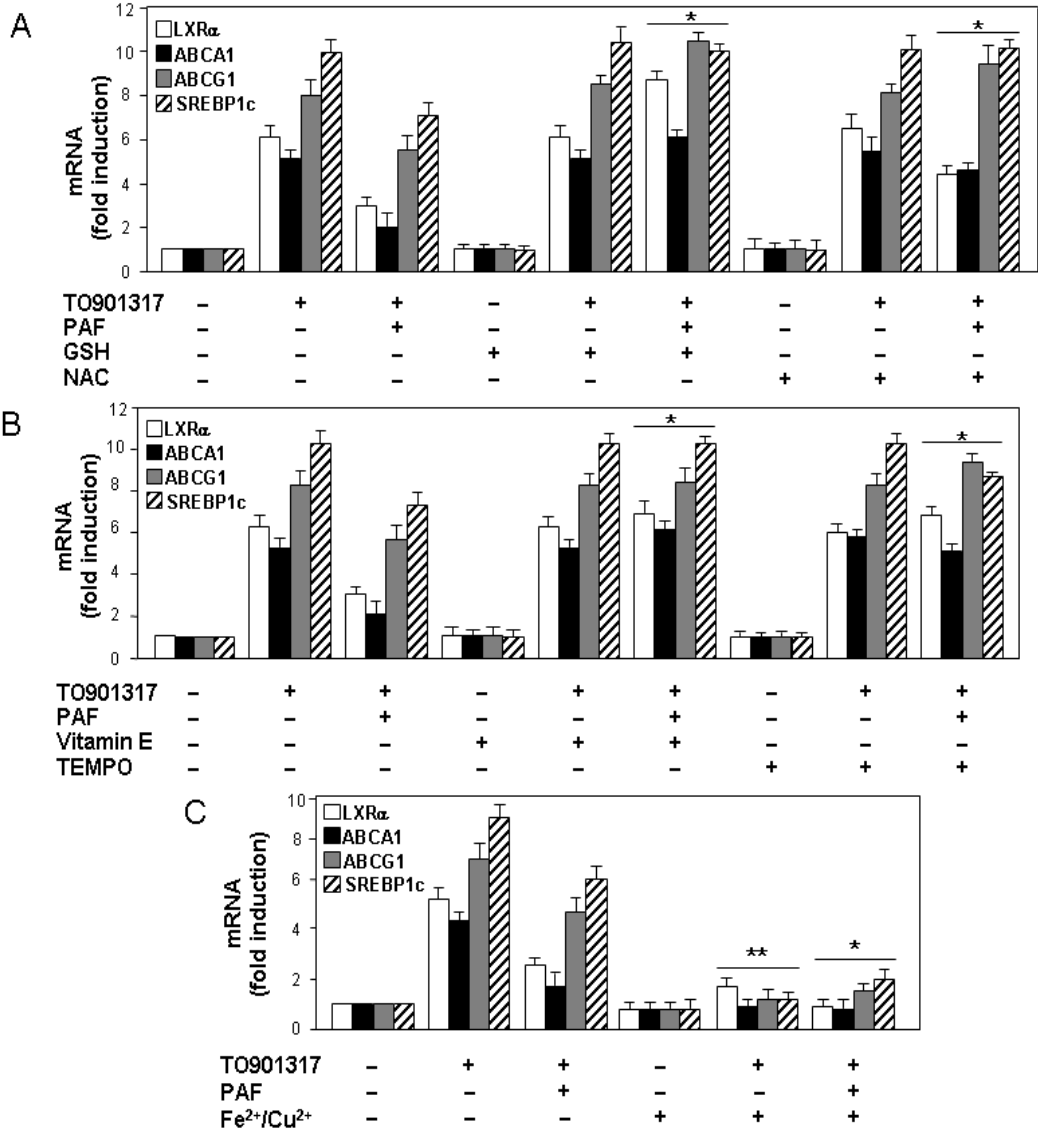


Fig.4

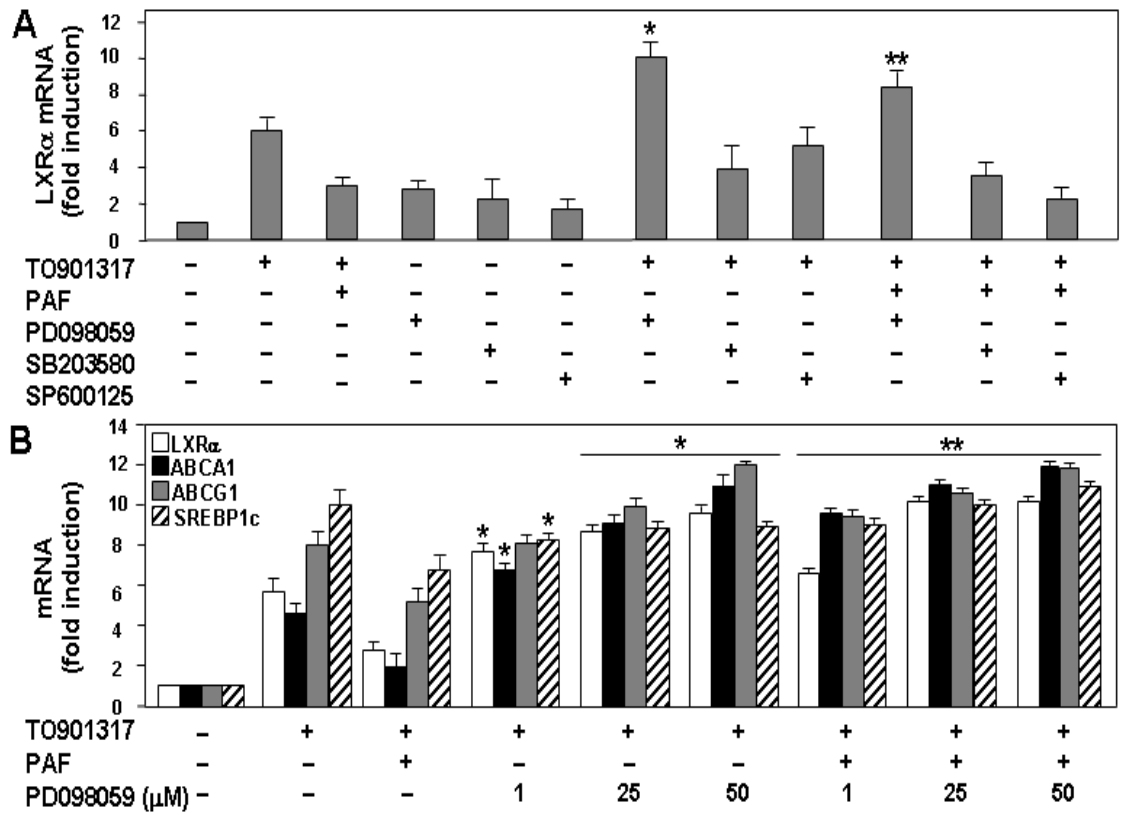
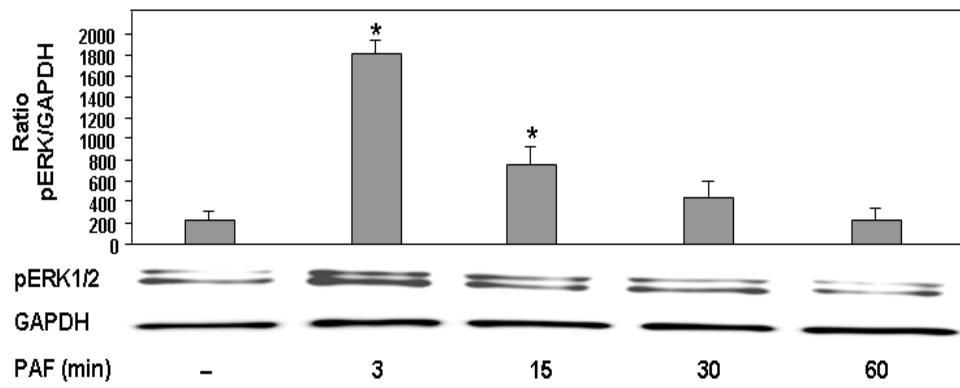


Fig.5

A



B

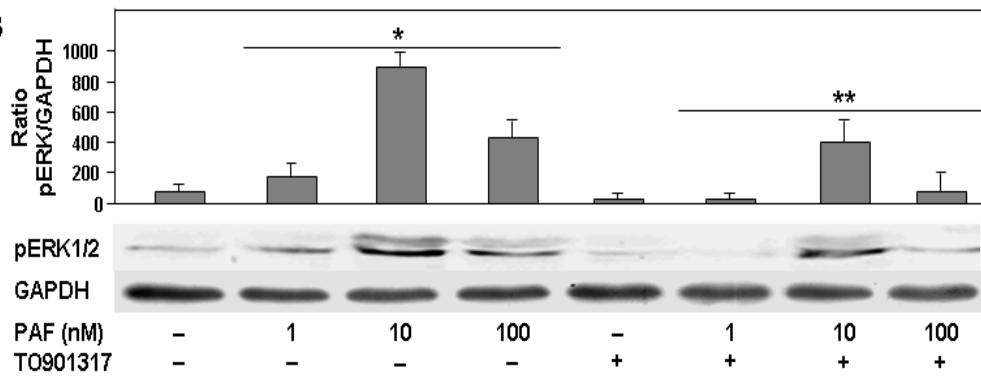
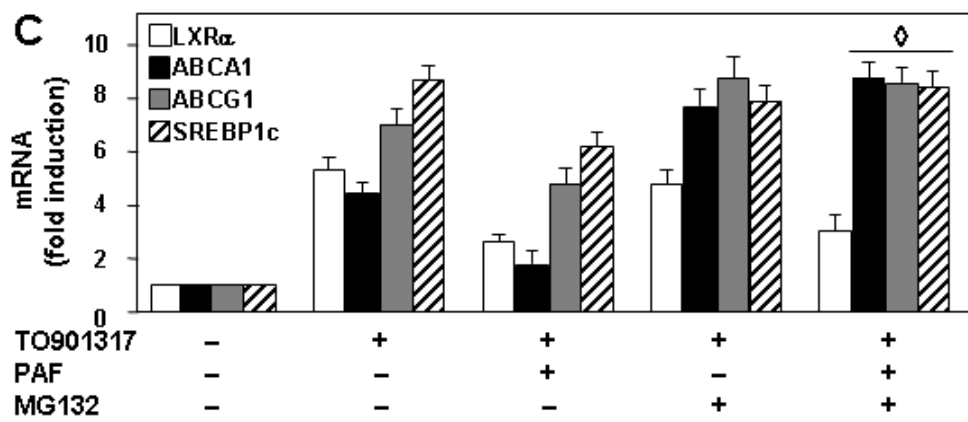
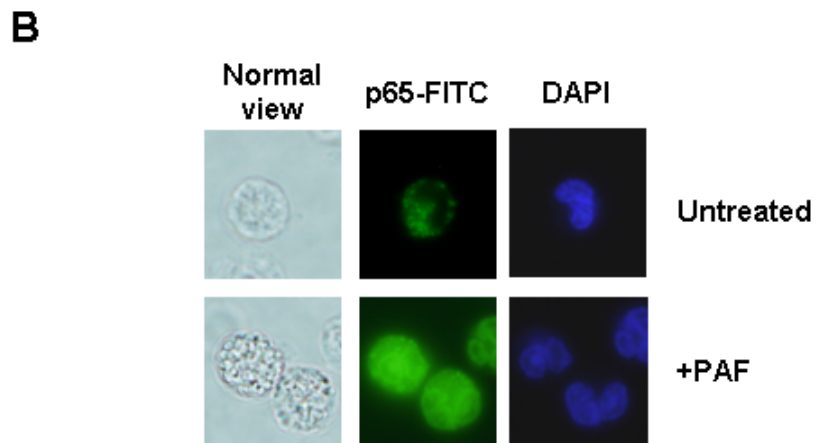
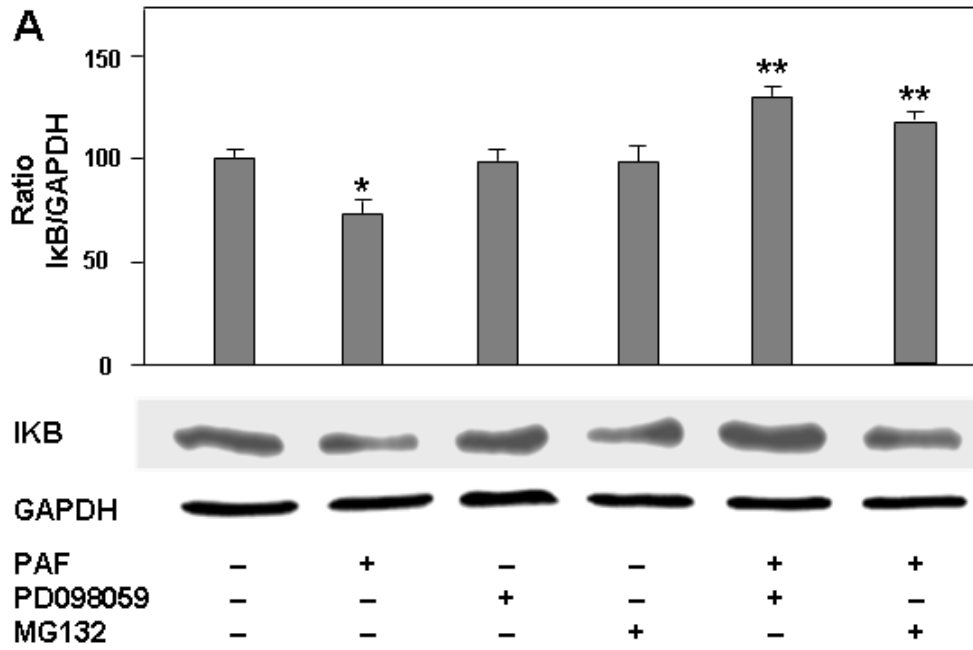


Fig.6



CAPÍTULO 3. Doble efecto del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) sobre la transcripción del LXR α y sus genes diana en los neutrófilos humanos.

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se ha relacionado con la modulación de los genes implicados en el proceso inflamatorio y la inmunidad adaptativa. En el capítulo anterior se describió el efecto inhibitorio del PAF a una dosis nanomolar sobre la transcripción del LXR α y sus genes diana en neutrófilos humanos. El actual capítulo habla del efecto dual causado por diferentes concentraciones del H₂O₂ y PAF. Concentraciones nanomolares de PAF inhibieron la transcripción del LXR α , ABCA1, ABCG1 y SREBP1c inducida por TO901317, mientras que las concentraciones micromolares, la potenciaron. Los ensayos posteriores se dirigieron a buscar la causa de este efecto y por ello, se midieron los niveles de ROS extra e intracelular inducidos por PAF a diferentes concentraciones. Los resultados indicaron que el peróxido de hidrógeno podría ser la molécula responsable. Se observó la capacidad de 1 μ M H₂O₂ y 10 nM PAF, y por otro lado, de 100 μ M H₂O₂ y 5 μ M PAF, para inducir niveles de producción de ROS similares. Usando diferentes concentraciones de H₂O₂ como estímulo en lugar de PAF para determinar su efecto sobre la transcripción del LXR α y sus genes diana, se observó que las concentraciones en un rango de 1 pM a 1 μ M H₂O₂ tuvieron un efecto inhibitorio sobre la expresión de ARNm y sus genes relacionados, mientras que las concentraciones entre 10 y 300 μ M tuvieron efectos potenciadores sobre la transcripción de los mismos genes. Se ha informado que tanto PAF como H₂O₂ activan NF κ B. Aunque está bien establecido que los ROS median en la activación de NF- κ B inducida por la mayoría de los agentes, el efecto de H₂O₂ en la vía de NF κ B y de LXR α en neutrófilos humanos aun está en proceso de estudio. Al analizar la posible participación de las MAPKs ERK1/2 en el efecto inhibitorio de H₂O₂ y PAF, observamos que ambas moléculas indujeron la fosforilación de la ERK1/2 (p42/44), de manera dependiente de la dosis. Cuando se usaron inhibidores específicos de NF- κ B, éstos fueron capaces de inhibir significativamente la fosforilación de la ERK1/2 (p42/44) inducida por 1 μ M H₂O₂ o 10 nM PAF. En contraste, ningún efecto se observó cuando la concentración aumentó a 100 μ M o 5 μ M, respectivamente. Nuestros resultados indican que el H₂O₂, exógeno o inducido por el PAF, causa regulación dual sobre los mecanismos oxidativos que inducen la fosforilación de la MAPK ERK1/2 y la activación de NF- κ B, y finalmente, sobre la expresión del LXR α y sus genes diana (In press).

CONCLUSIONS

Conclusiones

1. Los niveles de mRNA y la fosforilación en serina del ~~LXR~~ α aumentan en neutrófilos humanos estimulados con TO901317 y esto se evidencia también con el aumento de la transcripción de sus genes diana ABCA1, ABCG1 y SREBP1c.
2. 15dPGJ₂ inhibe la transcripción del mRNA del ~~LXR~~ α , ABCA1, ABCG1 y SREBP1c, inducida por su ligando TO901317 en forma dependiente de la producción de ROS, de la activación de la ERK1/2 y NF- κ B y de manera independiente de PPAR γ .
3. Neutrófilos tratados con diferentes dosis de PAF y H₂O₂ muestran un comportamiento dual sobre el nivel de expresión del ARNm del LXR α , ABCA1, ABCG1 y SREBP1c inducido por TO901317. Bajas concentraciones de PAF y H₂O₂ inhiben la expresión de la transcripción de los genes, mientras que altas concentraciones la potencian, sugiriendo un papel bifuncional de los prooxidantes.
4. La aplicación de H₂O₂ exógeno y PAF a neutrófilos en cultivo, induce la liberación de H₂O₂ dependiente de la dosis en neutrófilos humanos, similares al comparar entre sí bajas y altas concentraciones de los pro-oxidantes.
5. H₂O₂ y PAF inducen, de manera dependiente de la dosis, la fosforilación de MAPK ERK1/2.
6. Bajas concentraciones de H₂O₂ y PAF activan el NF κ B. Por el contrario, altas concentraciones de H₂O₂ y PAF no tienen efecto sobre la activación de NF κ B, debido a que se activan sistemas citoprotectores como el de la hemo-oxigenasa.



**B
I
B
L
I
O
G
R
A
F
I
A**

1. Palucka , Banchereau J. How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Current Opinion Immunology*. 2002;14(4):420-31.
2. Vos Q, Lees A, Wu ZQ, Snapper CM, Mond J. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Journal of Immunology Review*. 2000;176:154.
3. Yang C, Cambier C, Davis J, Hall C, Crosier P, Ramakrishnan L. Neutrophils exert protection in the early tuberculous granuloma by oxidative killing of mycobacteria phagocytosed from infected macrophages.. *Cell Host Microbe*. 2012;12:301.
4. Zucker-Franklin D. *Blood*. . 1980;56:534.
5. Moraes TJ, Zurawska JH, Downey GP. Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. *Curr Opin Hematol*. 2006 Jan;13(1):21-7.
6. Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *Journal Leukocyte Biology*. 2007;82(2):244.
7. Peng Y, Martin DA, Kenkel J, Zhang K, Ogden CA, Elkon KB. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells. *Journal of Autoimmunity*. 2007;29(4):303.
8. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Current Protocols Immunology*. 2008;Chapter 14:Unit 14.1.
9. Takahashi T, Hato F, Yamane T, Fukumasu H, Suzuki K, Ogita S, et al. Activation of human neutrophil by cytokine-activated endothelial cells. *Circulation research*. 2001;88:422.
10. Libby P, Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: New mechanisms and clinical targets. *Nat Med*. 2002 Nov;8(11):1257-62.
11. Shibata N, Glass CK. Macrophages, oxysterols and atherosclerosis. *Circ J*. 2010 Oct;74(10):2045-51.
12. Clerk A, Fuller SJ, Michael A, Sugden PH. Stimulation of "stress-regulated" mitogen-activated protein kinases (stress-activated protein kinases/c-jun nterminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases) in perfused rat hearts by oxidative and other stresses. *Journal Biological Chemistry*. 1998;273(13):7228.
13. Powell WH. IUPAC. revised nomenclature for radicals, ions, radical ions and related species, recommendations 1993, W. H. powell (ed.). *Pure Applied Chemistry*. 1993;65:1357.
14. Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Science STKE*. 2005;18 (306):re12.
15. Tonks NK. Redox redux: Revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell*. 2005;121:667.
16. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function.. *Free Radical Biology Medicine*. 2007;42(2):153.

17. Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, et al. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science*. 1997;276:2034.
18. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002;397:342.
19. Rotrosen D, Yeung CL, Leto TL, Malech HL, Kwong CH. Cytochrome b558: The flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science*. 1992 Jun 5;256(5062):1459-62.
20. Freeman JL, Lambeth JD. NADPH oxidase activity is independent of p47phox in vitro. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271:22578.
21. Leto TL, Garrett MC, Fujii H, Nunoi H. Characterization of neutrophil NADPH oxidase factors p47phox and p67phox from recombinant baculoviruses. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266:19812.
22. Wientjes F, Hsuan J, Totty N, Segal A. p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochemistry Journal*. 1993;296:557.
23. Heyworth PG, Curnutte JT, Nauseef WM, Volpp BD, Pearson DW, Rosen H, et al. Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. translocation of p47phox and p67phox requires interaction between p47phox and cytochrome b558. *Journal Clinical Investigation*. 1991;87:352.
24. Uhlinger DJ, Inge KL, Kreck ML, Tyagi SR, Neckelmann N, Lambeth JD. Reconstitution and characterization of the human neutrophil respiratory burst oxidase using recombinant p47phox, p67phox and plasma membrane. *Biochemical Biophysical Research Community*. 1992;186:509.
25. Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal*. 1999 Jan;11(1):1-14.
26. Kehrer JP. The haber-weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000;149:43.
27. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2000;279:L1005.
28. Rengasamy A, Johns RA. Inhibition of nitric oxide synthase by a superoxide generating system. *Journal of Pharmacology Experimental Therapy*. 1993;267:1024.
29. Alvarez-Maqueda M, El Bekay R, Alba G, Monteseirín J, Chacón P, Vega A, et al. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 induces heme oxygenase-1 gene expression in a reactive oxygen species-dependent manner in human lymphocytes. *Journal Biological Chemistry*. 2004;279:21929.
30. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 1994;344:721.
31. Morel Y, Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochemistry Journal*. 1999;342:481.

32. Flora SJ. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell Molecular Biology*. 2007;53:1.
33. Braven J, Ansari N, Figgitt DP, Fisher A, Luders C, Hickling P, et al. A comparison of glutathione reductase and glutathione peroxidase activities in patients with rheumatoid arthritis and healthy adults. *Bromatology Journal Rheumatology*. 1989;28:212.
34. Halliwell B, Gutteridge JM. Protection against oxidants in biological systems: The superoxide theory of oxygen toxicity *Free Radicals in Biology and Medicine*. 1989:87.
35. Kalpakcioglu B, Senel K. The interrelation of glutathione reductase, catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and glucose-6-phosphate in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinical of Rheumatology*. 2008;27(2):141.
36. Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annual Review Pharmacology Toxicology*. 2010;50:323.
37. Maines MD. The heme oxygenase system: Update 2005. *Antioxidant Redox Signaling*. 2005;7:1761.
38. Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood*. 2001;98:1802.
39. Koizumi S. Human heme oxygenase-1 deficiency: A lesson on serendipity in the discovery of the novel disease. *Pediatrics Internattional*. 2007;49:125.
40. Maines MD, Gibbs PE. 30 some years of heme oxygenase: From a "molecular wrecking ball" to a "mesmerizing" trigger of cellular events. *Biochemical Biophysical Research Community*. 2005;338:568.
41. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature*. 1997;389(6648):300.
42. Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *Journal Biological Chemistry*. 1997;272(32):19633.
43. Finkel T. Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion Cell Biology*. 1998;10:248.
44. Kyosseva SV. Mitogen-activated protein kinase signaling. *International Review Neurobiology*. 2004;59:201.
45. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response

. *Annual Review Immunology*. 2002;20:55.
46. Morrison DK, Davis RJ. Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annual Review. Cellular Development Biology*. 2003;19:91.
47. Bogoyevitch MA, Court NW. Counting on mitogen-activated protein kinases-ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. *Cellular Signaling*. 2004;16:1345.

48. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: A family of protein kinases with diverse biological functions. *Journal Microbiology Molecular Biology Review*. 2004;68:320.
49. Baas AS, Berk BC. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H₂O₂ and O₂⁻ in vascular smooth muscle cells. *Circulation research*. 1995;77(1):29.
50. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiology Review*. 2001;81:807.
51. Gallin JI, Fletcher MP, Seligmann BE, Hoffstein S, Cehrs K, Mounessa N. Human neutrophil-specific granule deficiency: A model to assess the role of neutrophil-specific granules in the evolution of the inflammatory response. *Blood*. 1982;59(6):1317.
52. Vaziri ND, Rodríguez-Iturbe B. Mechanisms of disease: Oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nature Clinical Practice Nephrology*. 2006;2:582.
53. Berrebi D, Bruscoli S, Cohen N, Foussat A, Migliorati G, Bouchet-Delbos L, et al. Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: An anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood*. 2003;101:729.
54. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infections*. 2003;5:1317.
55. Straus DS, Glass CK. Cyclopentenone prostaglandins: New insights on biological activities and cellular targets. *Medicine Research Review*. 2001;21:185.
56. Murakami M, Kudo I. Phospholipase A₂. *Journal of Biochemistry*. 2002;131(3):285.
57. Ueno N, Murakami M, Tanioka T, Fujimori K, Tanabe T, Urade Y, et al. Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A₂. *Journal of Biology Chemistry*. 2001;276(37):34918.
58. Helliwell RJ, Adams LF, Mitchell MD. Prostaglandin synthases: Recent developments and a novel hypothesis. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids*. 2004;70(2):101.
59. Scher JU, Pillinger MH. 15d-PGJ₂: The anti-inflammatory prostaglandin? *Clinical Immunology*. 2005;114(2):100.
60. Kanaoka Y, Fujimori K, Kikuno R, Sakaguchi Y, Urade Y, Hayaishi O. Structure and chromosomal localization of human and mouse genes for hematopoietic prostaglandin D synthase. conservation of the ancestral genomic structure of sigma-class glutathione S-transferase. *European Journal Biochemistry*. 2000;267(11):3315.
61. Arimura A, Yasui K, Kishino J, Asanuma F, Hasegawa H, Kakudo S, et al. Prevention of allergic inflammation by a novel prostaglandin receptor antagonist, S-5751. *Journal Pharmacology Experimental Therapy*. 2001;298(2):411.

62. Fitzpatrick FA, Wynalda MA. Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D₂. identification of products formed in vitro. *Journal of Biology Chemistry*. 1983;258(19):11713.
63. Shibata T, Kondo M, Osawa T, Shibata N, Kobayashi M, Uchida K. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J₂. A prostaglandin D₂ metabolite generated during inflammatory processes. *Journal of Biology Chemistry*. 2002;277(12):10459.
64. Braissant O, Fougère F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*. 1996;137:354.
65. Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): Transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrinology Review*. 2003;24:78.
66. Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. From molecular action to physiological outputs: Peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res*. 2006;45:120.
67. Guo B, Koya D, Isono M, Sugimoto T, Kashiwagi A, Haneda M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit TGF-beta 1-induced fibronectin expression in glomerular mesangial cells. *Diabetes*. 2004;53:200.
68. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Review Immunology*. 2002;2:787.
69. Mendez M, LaPointe MC. PPARgamma inhibition of cyclooxygenase-2, PGE₂ synthase, and inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Hypertension*. 2003;42:844.
70. Planavila A, Rodríguez-Calvo R, Jové M, Michalik L, Wahli W, Laguna JC, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta activation inhibits hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovascular research*. 2005;65:832.
71. Delerive P, De Bosscher K, VandenBerghe W, Fruchart JC, Haegeman G, Staels B. DNA binding-independent induction of IkappaBalpha gene transcription by PPARalpha. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*. 2002;16:1029.
72. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J₂ metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*. 1995;83:813.
73. Meade EA, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *Journal of Biology Chemistry*. 1999;274:8328.
74. Harris SG, Smith RS, Phipps RP. 15-deoxy-delta 12,14-PGJ₂ induces IL-8 production in human T cells by a mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of Immunology*. 2002;168:1372.
75. Imaizumi T, Kumagai M, Hatakeyama M, Tamo W, Yamashita K, Tanji K, et al. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J₂ inhibits the expression of granulocyte-

macrophage colony-stimulating factor in endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide. *Prostaglandins Other Lipids Mediators*. 2003;71:293.

76. Kim HJ, Rho YH, Choi SJ, Lee YH, Cheon H, Um JW, et al. 15-deoxy-delta12,14-PGJ2 inhibits IL-6-induced Stat3 phosphorylation in lymphocytes. *Experimental Molecular Medicine*. 2005;37:179.

77. Monneret G, Li H, Vasilescu J, Rokach J, Powell WS. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandins D2 and J2 are potent activators of human eosinophils. *Journal of Immunology*. 2002;168:3563.

78. Chen YC, Shen SC, Tsai SH. Prostaglandin D(2) and J(2) induce apoptosis in human leukemia cells via activation of the caspase 3 cascade and production of reactive oxygen species. *Biochemical Biophysical Acta*. 2005;1743:291.

79. Petrova TV, Akama KT, Van Eldik LJ. Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: Down-regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy-Delta12,14- prostaglandin J2. *Proceedings National Academic Science U. S. A*. 1999;96:4668.

80. Hinz B, Brune K, Pahl A. 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 inhibits the expression of proinflammatory genes in human blood monocytes via a PPAR-gamma-independent mechanism. *Biochemical Biophysical Research Community*. 2003;302:415.

81. Ward C, Dransfield I, Murray J, Farrow SN, Haslett C, Rossi AG. Prostaglandin D2 and its metabolites induce caspase-dependent granulocyte apoptosis that is mediated via inhibition of I kappa B alpha degradation using a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanism. *Journal of Immunology*. 2002;168:6232.

82. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nature medicine*. 2001;7:48.

83. Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, et al. Antiinflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature*. 2000;403:103.

84. Bureau F, Desmet C, Melotte D, Jaspar F, Volanti C, Vanderplasschen A, et al. A proinflammatory role for the cyclopentenone prostaglandins at low micromolar concentrations: Oxidative stress-induced extracellular signal-regulated kinase activation without NF-kappa B inhibition. *Journal Immunology*. 168;2002:5318.

85. Hanahan DJ. Platelet activating factor: A biologically active phosphoglyceride. *Annual Review Biochemistry*. 1986;55:483.

86. Ko HM, Jung HH, Seo KH, Kang YR, Kim HA, Park SJ, et al. Platelet-activating factor-induced NF-kappaB activation enhances VEGF expression through a decrease in p53 activity. *FEBS letters*. 2006;580(13):3006.

87. Montrucchio G, Alloatti G, Camussi G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiololy Review*. 2000;80(4):1669.

88. Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annual Review Biochemistry*. 2000;69:419.
89. Nakajima T, Sugimoto T, Kurachi Y. Platelet-activating factor activates cardiac GK via arachidonic acid metabolites. *FEBS letters*. 1991;289(2):239.
90. Gomez-Cambronero J, Wang E, Johnson G, Huang CK, Sha'afi RI. Platelet-activating factor induces tyrosine phosphorylation in human neutrophils. *Journal of Biology Chemistry*. 1991;266(10):6240.
91. Chao W, Olson MS. Platelet-activating factor: Receptors and signal transduction *Biochemistry Journal*. 1993;292:617.
92. Lu J, Caplan MS, Li D, Jilling T. Polyunsaturated fatty acids block platelet-activating factor-induced phosphatidylinositol 3 kinase/akt-mediated apoptosis in intestinal epithelial cells. *American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*. 2008;294(5):G1181.
93. Borthakur A, Bhattacharyya S, Alrefai WA, Tobacman JK, Ramaswamy K, Dudeja PK. Platelet-activating factor-induced NF-kappaB activation and IL-8 production in intestinal epithelial cells are Bcl10-dependent. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(4):593.
94. Ashraf MZ, Kar NS, Podrez EA. Oxidized phospholipids: Biomarker for cardiovascular diseases. *International Journal Biochemistry Cellular Biology*. 2009;41(6):1241.
95. Penna C, Bassino E, Alloati G. Platelet activating factor: The good and the bad in the ischemic/reperfused heart. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011 Apr 1;236(4):390-401.
96. Shimizu T, Mori M, Bito H, Sakanaka C, Tabuchi S, Aihara M, et al. Platelet-activating factor and somatostatin activate mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) and arachidonate release. *Journal of Lipids Mediators Cell Signal*. 1996;14(1-3):103.
97. Soldi R, Sanavio F, Aglietta M, Primo L, Defilippi P, Marchisio PC, et al. Platelet-activating factor (PAF) induces the early tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125FAK) in human endothelial cells. *Oncogene*. 1996;13(3):515.
98. Nick JA, Avdi NJ, Young SK, Knall C, Gerwins P, Johnson GL, et al. Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP. *Journal Clinical Investigation*. 1997;99(5):975.
99. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Development*. 2004;18(18):2195.
100. Winterbourn CC, Hampton MB, Livesey JH, Kettle AJ. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: Implications for microbial killing. *Journal of Biology Chemistry*. 2006;281(52):39860.
101. Staal FJ, Roederer M, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kappa B and transcription of human immunodeficiency virus *Proceedings National Academic Sciences U S A*. 1990;87(24):9943.

102. O'Flaherty JT, Jacobson D. Protein kinase C blockers and neutrophil receptors for leukotriene B₄. *Biochemistry and Biophysics Research Community*. 1989;163(3):1456.
103. Stafforini DM. Biology of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH, lipoprotein associated phospholipase A₂). *Cardiovascular Drugs Therapy*. 2009;23(1):73.
104. Geiszt M, Leto TL. The nox family of NAD(P)H oxidases: Host defense and beyond. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;10;279(50):51715.
105. Lefer DJ, Granger DN. Oxidative stress and cardiac disease. *American Journal of Medicine*. 2000;109(4):315.
106. Stone JR. An assessment of proposed mechanisms for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2004;422:119.
107. Stone JR, Collins T. The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. *Endothelium*. 2002;9(4):231.
108. Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circulation research*. 2003;92(2):e31.
109. Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: Structural aspects and activation mechanism *Cell Molecular Life Science*. 2002;59(9):1428.
110. Choi MH, Lee IK, Kim GW, Kim BU, Han YH, Yu DY, et al. Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature*. 2005;435(7040):347-53.
111. Ushio-Fukai M. Redox signaling in angiogenesis: Role of NADPH oxidase. *Cardiovascular research*. 2006;71(2):226.
112. Bossis G, Melchior F. Regulation of SUMOylation by reversible oxidation of SUMO conjugating enzymes *Molecular cell*. 2006;21(3):349.
113. Miller EW, Dickinson BC, Chang CJ. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proceedings National Academic Sciences U S A*. 2010;107(36):15681.
114. Cao C, Leng Y, Kufe D. Catalase activity is regulated by c-abl and arg in the oxidative stress response *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(32):29667.
115. Veal EA, Day AM, Morgan BA. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Molecular Cell*. 2007;26:1.
116. Glass CK, Ogawa S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jan;6(1):44-55.
117. Francis GA, Fayard E, Picard F, Auwerx J. Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annual Review of Physiology*. 2003;65:261.
118. Castrillo A, Tontonoz P. Nuclear receptors in macrophage biology: At the crossroads of lipid metabolism and inflammation. *Annual Review Cellular Development Biology*. 2004;20:455.

119. Sonoda J, Pei L, Evans RM. Nuclear receptors: Decoding metabolic disease. *FEBS Lett.* 2008 Jan 9;582(1):2-9.
120. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacology Review.* 2006;58(4):685.
121. Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem.* 2002 May 24;277(21):18793-800.
122. Calkin AC, Tontonoz P. Liver x receptor signaling pathways and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Aug;30(8):1513-8.
123. Calkin AC, Tontonoz P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Mar 14;13(4):213-24.
124. Viennois E, Mouzat K, Dufour J, Morel L, Lobaccaro JM, Baron S. Selective liver X receptor modulators (SLiMs): What use in human health? *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Apr 4;351(2):129-41.
125. Apfel R, Benbrook D, Lernhardt E, Ortiz MA, Salbert G, Pfahl M. A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol Cell Biol.* 1994 Oct;14(10):7025-35.
126. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:459-81.
127. Song C, Kokontis JM, Hiipakka RA, Liao S. Ubiquitous receptor: A receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Nov 8;91(23):10809-13.
128. Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature.* 2008 Feb 21;451(7181):904-13.
129. Novac N, Heinzl T. Nuclear receptors: Overview and classification. *Current Drugs Targets Inflammatory Allergy.* 2004;3(4):335.
130. Klinge CM, Bodenner DL, Desai D, Niles RM, Traish AM. Binding of type II nuclear receptors and estrogen receptor to full and half-site estrogen response elements in vitro . *Nucleic Acids Research.* 1997;25(10):1903.
131. Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell.* 1991;65(7):1255.
132. Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):789-99.
133. Alba G, Reyes ME, Santa-Maria C, Ramirez R, Geniz I, Jimenez J, et al. Transcription of liver X receptor is down-regulated by 15-deoxy-delta(12,14)-

- prostaglandin J(2) through oxidative stress in human neutrophils. *PLoS One*. 2012;7(10):e42195.
134. Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med*. 2003 Feb;9(2):213-9.
135. Zelcer N, Tontonoz P. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J Clin Invest*. 2006 Mar;116(3):607-14.
136. Baranowski M. Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol*. 2008 Dec;59 Suppl 7:31-55.
137. Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev*. 2000 Nov 15;14(22):2831-8.
138. Collins JL, Fivush AM, Watson MA, Galardi CM, Lewis MC, Moore LB, et al. Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *J Med Chem*. 2002 May 9;45(10):1963-6.
139. Zhao C, Dahlman-Wright K. Liver X receptor in cholesterol metabolism. *J Endocrinol*. 2010 Mar;204(3):233-40.
140. Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR. Tissue-specific induction of intestinal ABCA1 expression with a liver X receptor agonist raises plasma HDL cholesterol levels. *Circ Res*. 2006 Sep 29;99(7):672-4.
141. Houck KA, Borchert KM, Hepler CD, Thomas JS, Bramlett KS, Michael LF, et al. T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. *Mol Genet Metab*. 2004 Sep-Oct;83(1-2):184-7.
142. Mitro N, Vargas L, Romeo R, Koder A, Saez E. T0901317 is a potent PXR ligand: Implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Lett*. 2007 May 1;581(9):1721-6.
143. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature*. 1996 Oct 24;383(6602):728-31.
144. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, et al. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem*. 1997 Feb 7;272(6):3137-40.
145. Peet DJ, Janowski BA, Mangelsdorf DJ. The LXRs: A new class of oxysterol receptors. *Curr Opin Genet Dev*. 1998 Oct;8(5):571-5.
146. Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB, Mak PA, Wilpitz DC, Edwards PA, et al. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Oct 24;97(22):12097-102.
147. Laffitte BA, Kast HR, Nguyen CM, Zavacki AM, Moore DD, Edwards PA. Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor. *J Biol Chem*. 2000 Apr 7;275(14):10638-47.

148. Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem.* 2000 Sep 8;275(36):28240-5.
149. Schwartz K, Lawn RM, Wade DP. ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Aug 11;274(3):794-802.
150. Tangirala RK, Bischoff ED, Joseph SB, Wagner BL, Walczak R, Laffitte BA, et al. Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 3;99(18):11896-901.
151. Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: Implications for novel therapies. *J Clin Invest.* 2006 Dec;116(12):3090-100.
152. Joseph SB, McKilligin E, Pei L, Watson MA, Collins AR, Laffitte BA, et al. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 May 28;99(11):7604-9.
153. Honzumi S, Shima A, Hiroshima A, Koieyama T, Ubukata N, Terasaka N. LXRA regulates human CETP expression in vitro and in transgenic mice. *Atherosclerosis.* 2010 Sep;212(1):139-45.
154. Luo Y, Tall AR. Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element. *J Clin Invest.* 2000 Feb;105(4):513-20.
155. Mak PA, Kast-Woelbern HR, Anisfeld AM, Edwards PA. Identification of PLTP as an LXR target gene and apoE as an FXR target gene reveals overlapping targets for the two nuclear receptors. *J Lipid Res.* 2002 Dec;43(12):2037-41.
156. Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR, Mangelsdorf DJ, et al. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 16;98(2):507-12.
157. Jiang ZY, Parini P, Eggertsen G, Davis MA, Hu H, Suo GJ, et al. Increased expression of LXR alpha, ABCG5, ABCG8, and SR-BI in the liver from normolipidemic, nonobese chinese gallstone patients. *J Lipid Res.* 2008 Feb;49(2):464-72.
158. Lo Sasso G, Murzilli S, Salvatore L, D'Errico I, Petruzzelli M, Conca P, et al. Intestinal specific LXR activation stimulates reverse cholesterol transport and protects from atherosclerosis. *Cell Metab.* 2010 Aug 4;12(2):187-93.
159. Yu L, von Bergmann K, Lutjohann D, Hobbs HH, Cohen JC. Selective sterol accumulation in ABCG5/ABCG8-deficient mice. *J Lipid Res.* 2004 Feb;45(2):301-7.
160. Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 2000 Jan 15;14(2):121-41.
161. Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldan A, Tarr P, Fishbein MC, et al. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* 2005 Feb;1(2):121-31.

162. Naik SU, Wang X, Da Silva JS, Jaye M, Macphee CH, Reilly MP, et al. Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation*. 2006 Jan 3;113(1):90-7.
163. Wang MD, Franklin V, Marcel YL. In vivo reverse cholesterol transport from macrophages lacking ABCA1 expression is impaired. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Aug;27(8):1837-42.
164. Yvan-Charvet L, Ranalletta M, Wang N, Han S, Terasaka N, Li R, et al. Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J Clin Invest*. 2007 Dec;117(12):3900-8.
165. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002 May;109(9):1125-31.
166. Tontonoz P, Mangelsdorf DJ. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol*. 2003 Jun;17(6):985-93.
167. Levin N, Bischoff ED, Daige CL, Thomas D, Vu CT, Heyman RA, et al. Macrophage liver X receptor is required for antiatherogenic activity of LXR agonists. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Jan;25(1):135-42.
168. Arbel Y, Finkelstein A, Halkin A, Birati EY, Revivo M, Zuzut M, et al. Neutrophil/lymphocyte ratio is related to the severity of coronary artery disease and clinical outcome in patients undergoing angiography. *Atherosclerosis*. 2012 Dec;225(2):456-60.
169. Mazor R, Shurtz-Swirski R, Farah R, Kristal B, Shapiro G, Dorlehter F, et al. Primed polymorphonuclear leukocytes constitute a possible link between inflammation and oxidative stress in hyperlipidemic patients. *Atherosclerosis*. 2008 Apr;197(2):937-43.
170. Valledor AF. The innate immune response under the control of the LXR pathway. *Immunobiology*. 2005;210(2-4):127-32.
171. Joseph SB, Bradley MN, Castrillo A, Bruhn KW, Mak PA, Pei L, et al. LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell*. 2004 Oct 15;119(2):299-309.
172. Valledor AF, Hsu LC, Ogawa S, Sawka-Verhelle D, Karin M, Glass CK. Activation of liver X receptors and retinoid X receptors prevents bacterial-induced macrophage apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 21;101(51):17813-8.
173. Fowler AJ, Sheu MY, Schmuth M, Kao J, Fluhr JW, Rhein L, et al. Liver X receptor activators display anti-inflammatory activity in irritant and allergic contact dermatitis models: Liver-X-receptor-specific inhibition of inflammation and primary cytokine production. *J Invest Dermatol*. 2003 Feb;120(2):246-55.
174. Castrillo A, Joseph SB, Vaidya SA, Haberland M, Fogelman AM, Cheng G, et al. Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol Cell*. 2003 Oct;12(4):805-16.

175. Scholz H, Lund T, Dahle MK, Collins JL, Korsgren O, Wang JE, et al. The synthetic liver X receptor agonist GW3965 reduces tissue factor production and inflammatory responses in human islets in vitro. *Diabetologia*. 2009 Jul;52(7):1352-62.
176. Wang YY, Dahle MK, Agren J, Myhre AE, Reinholt FP, Foster SJ, et al. Activation of the liver X receptor protects against hepatic injury in endotoxemia by suppressing kupffer cell activation. *Shock*. 2006 Feb;25(2):141-6.
177. Medzhitov R, Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol*. 2009 Oct;9(10):692-703.
178. Jakobson T, Svitskar N, Tamme K, Starkopf J, Karjagin J. Two cases of takotsubo syndrome related to tracheal intubation/extubation. *Medicina (Kaunas)*. 2012;48(2):77-9.
179. Villablanca EJ, Raccosta L, Zhou D, Fontana R, Maggioni D, Negro A, et al. Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat Med*. 2010 Jan;16(1):98-105.
180. Terasaka N, Hiroshima A, Ariga A, Honzumi S, Koieyama T, Inaba T, et al. Liver X receptor agonists inhibit tissue factor expression in macrophages. *FEBS J*. 2005 Mar;272(6):1546-56.
181. Morales JR, Ballesteros I, Deniz JM, Hurtado O, Vivancos J, Nombela F, et al. Activation of liver X receptors promotes neuroprotection and reduces brain inflammation in experimental stroke. *Circulation*. 2008 Sep 30;118(14):1450-9.
182. Iwamoto T, Okamoto H, Toyama Y, Momohara S. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: Chemokines in the joints of patients. *FEBS J*. 2008 Sep;275(18):4448-55.
183. Boissier MC. Cell and cytokine imbalances in rheumatoid synovitis. *Joint Bone Spine*. 2011 May;78(3):230-4.
184. Park MC, Kwon YJ, Chung SJ, Park YB, Lee SK. Liver X receptor agonist prevents the evolution of collagen-induced arthritis in mice. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 May;49(5):882-90.
185. Venteclef N, Jakobsson T, Ehrlund A, Damdimopoulos A, Mikkonen L, Ellis E, et al. GPS2-dependent corepressor/SUMO pathways govern anti-inflammatory actions of LRH-1 and LXRbeta in the hepatic acute phase response. *Genes Dev*. 2010 Feb 15;24(4):381-95.
186. Fontaine C, Rigamonti E, Nohara A, Gervois P, Teissier E, Fruchart JC, et al. Liver X receptor activation potentiates the lipopolysaccharide response in human macrophages. *Circ Res*. 2007 Jul 6;101(1):40-9.
187. Korf H, Vander Beken S, Romano M, Steffensen KR, Stijlemans B, Gustafsson JA, et al. Liver X receptors contribute to the protective immune response against mycobacterium tuberculosis in mice. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1626-37.

188. Gong H, He J, Lee JH, Mallick E, Gao X, Li S, et al. Activation of the liver X receptor prevents lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Biol Chem*. 2009 Oct 30;284(44):30113-21.
189. Marcil V, Delvin E, Sane AT, Tremblay A, Levy E. Oxidative stress influences cholesterol efflux in THP-1 macrophages: Role of ATP-binding cassette A1 and nuclear factors. *Cardiovasc Res*. 2006 Dec 1;72(3):473-82.
190. Ogawa S, Lozach J, Jepsen K, Sawka-Verhelle D, Perissi V, Sasik R, et al. A nuclear receptor corepressor transcriptional checkpoint controlling activator protein 1-dependent gene networks required for macrophage activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 5;101(40):14461-6.
191. Ghisletti S, Huang W, Ogawa S, Pascual G, Lin ME, Willson TM, et al. Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol Cell*. 2007 Jan 12;25(1):57-70.
192. Ghisletti S, Huang W, Jepsen K, Benner C, Hardiman G, Rosenfeld MG, et al. Cooperative NCoR/SMRT interactions establish a corepressor-based strategy for integration of inflammatory and anti-inflammatory signaling pathways. *Genes Dev*. 2009 Mar 15;23(6):681-93.
193. Poukka H, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ. Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 19;97(26):14145-50.
194. Tian S, Poukka H, Palvimo JJ, Janne OA. Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor. *Biochem J*. 2002 Nov 1;367(Pt 3):907-11.
195. Treuter E, Venteclef N. Transcriptional control of metabolic and inflammatory pathways by nuclear receptor SUMOylation. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Aug;1812(8):909-18.
196. Palvimo JJ. PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription. *Biochem Soc Trans*. 2007 Dec;35(Pt 6):1405-8.
197. Huang W, Ghisletti S, Perissi V, Rosenfeld MG, Glass CK. Transcriptional integration of TLR2 and TLR4 signaling at the NCoR derepression checkpoint. *Mol Cell*. 2009 Jul 10;35(1):48-57.
198. Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature*. 2005 Sep 29;437(7059):759-63.
199. Yoon HG, Chan DW, Huang ZQ, Li J, Fondell JD, Qin J, et al. Purification and functional characterization of the human N-CoR complex: The roles of HDAC3, TBL1 and TBLR1. *EMBO Journal*. 2003;22(6):1336.
200. Huang W, Ghisletti S, Saijo K, Gandhi M, Aouadi M, Tesz GJ, et al. Coronin 2A mediates actin-dependent de-repression of inflammatory response genes. *Nature*. 2011 Feb 17;470(7334):414-8.

201. Hu Q, Kwon YS, Nunez E, Cardamone MD, Hutt KR, Ohgi KA, et al. Enhancing nuclear receptor-induced transcription requires nuclear motor and LSD1-dependent gene networking in interchromatin granules. *proc natl acad sci U S A. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:19199.
202. Fullwood MJ, . Liu MH, Pan YF, L, J., Xu H, Mohamed YB, et al. An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome. *Nature.* 2009;462:58.
203. Gandhi M, Achard V, Blanchoin L, Goode BL. Coronin switches roles in actin disassembly depending on the nucleotide state of actin. *Molecular Cell.* 2009;34:364.
204. Briehier WM, Kueh HY, Ballif BA, Mitchison TJ. Rapid actin monomer-insensitive depolymerization of listeria actin comet tails by cofilin, coronin, and Aip1. *Journal Cell Biology.* 2006;175:315.
205. Rajamaki K, Lappalainen J, Oorni K, Valimaki E, Matikainen S, Kovanen PT, et al. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: A novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One.* 2010 Jul 23;5(7):e11765.
206. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature.* 2010 Apr 29;464(7293):1357-61.
207. Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2010 Jan;10(1):36-46.
208. Im SS, Osborne TF. Liver x receptors in atherosclerosis and inflammation. *Circ Res.* 2011 Apr 15;108(8):996-1001.
209. Pascual-García M, Valledor AF. Biological roles of liver X receptors in immune cells. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis.* 2012;60(4):235.
210. Carballo M, Conde M, El Bekay R, Martín-Nieto J, Camacho MJ, Monteseirín J, et al. Oxidative stress triggers STAT3 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation in human lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry.* 1999;274:17580.
211. Hathaway WE, Newby LA, Githens JH. The acridine orange viability test applied to bone marrow cells. I. correlation with trypan blue and eosin dye exclusion and tissue culture transformation. *Blood.* 1964;23:517.
212. Marino PL. *Medicina crítica y terapia intensiva.* buenos aires: Editora médica panamericana. . 1993:430.
213. El Bekay R, Alvarez M, Monteseirin J, Alba G, Chacon P, Vega A, et al. Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human neutrophils: Involvement of mitogen-activated protein kinase, calcineurin, and the transcription factor NF- κ B. *Blood.* 2003;102:662.
214. Nicholls P. The reaction between aminotriazole and catalase. *Biochemical Biophysical Acta.* 1962;59:414.

215. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72:248.

216. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987;162:156.

A B R E V I A T U R A S

ABC	Proteínas transportadoras de unión al ATP
ACAT	Acil-CoA: colesterol aciltransferasa
ADNc	ADN complementario
AF-1	Función de activación-1
AP-1	Proteína activadora-1
Apo	Apolipoproteína
BSA	Albúmina sérica bovina
CCR7	Receptor de quimoquina-7
CD	Células dendríticas
CETP	Proteína de transferencia colesterol ester
CO	Monóxido de carbono
CORO2A	Coronina 2A
COX	Ciclooxigenasa
DBD	Dominio de unión al ADN
DCFDA	2,7-diclorohidrofluoresceína diacetato
DEM	Dietilmaleato
dNTP	Dinucleótido trifosfato
DR	Repeticiones directas
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiamina ácido tetraacético
ERK	Proteína quinasa activada por señales extracelulares
FACS	Clasificación de células activadas por fluorescencia
FAS	Sintasa de ácidos grasos
FXR	Receptor farnesoide X
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa
GPS2	Supresor de la vía de proteína-G 2
Gpx	Glutation peroxidasa
GR	Glutation reductasa
GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutation oxidado
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
H ₂ Odd	Agua destilada y desionizada
HAT	Histona acetiltransferasa
HDAC	Histonas deacetilasa
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
IL	Interleuquina
INF- γ	Interferón gamma
JNK	Quinasa terminal NH ₂ -c-Jun
KR-HEPES	Medio Krebs-Ringer-HEPES
LBD	Dominio de unión al ligando
LCAT	Lecitina: colesterol aciltransferasa
LDH	Lactato deshidrogenasa
LPS	Lipopolisacárido
LXR	Receptor hepático X
LXRE	Elemento de respuesta del LXR
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
Min	Minuto
NAC	N-acetil cisteína
NCoR	Receptor corepresor nuclear
NF- κ B	Factor nuclear- κ B

NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NR	Receptor nuclear
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OONO ⁻	Peroxinitrito
PAO	Óxido de fenilarsina
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD098059	2-(2-amino-3 metoxifenil)4H-1-4-benzopirano
PG	Prostaglandina
15d-PGJ ₂	15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J ₂
PKC	Proteína quinasa C
PLTP	Proteína de transferencia de fosfolípidos
PMA	Forbol miristato acetato
PMSF	Fenil metilsulfonil fluoruro
PPAR	Receptor activado por la proliferación de peroxisomas
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
PXR	Receptor pregnado X
RCT	Transporte reverso de colesterol
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RXR	Receptor retinoid X
SB203580	4-(4-fluofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-4-(piridil)-1-H-imidazol
Seg	Segundos
SMRT	Receptor mediador de silenciamiento de ácido retinoico y tiroideo
SOD	Superóxido dismutasa
SR-BI	Receptor <i>scavenger</i> BI
SREBP-1c	Proteína se unión al elemento regulatorio de esteroides 1c
STAT	Señal traductora y activadora de transcripción
SUMO	Proteína modificadora como ubiquitina pequeña
TBLR1/TBL1	Proteína similar a Transducina β
TEMED	N,N,N',N' tetrametiletildiamina
TGF	Factor transformante de crecimiento
TLR	Receptor similar a Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPCK	N-tosil-L-fenilalanil-clorometil cetona
UBL	Modificadores como ubiquitina