

Rol modulador del Receptor Activado por Factores de Proliferación Peroxisomal de tipo gamma (PPAR γ) en la respuesta inflamatoria cardiaca

Eugenia Hovsepian¹, Gerardo A. Mirkin², Federico Penas¹, Nora B. Goren^{1*}.

¹ Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO-CONICET-UBA), Buenos Aires, Argentina.

² Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Autora responsable de la publicación:

Dra. Nora B. Goren

¹ Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO-CONICET-UBA). Paraguay 2155, piso 12. Buenos Aires 1121.

Tel/Fax: 54 11 5950 9500 ext 2184 / 54 11 4964 2554

E-mail: ngoren@fmed.uba.ar

Recibido: 21/2/2011.

Aceptado: 2/3/2011

Resumen

Los Receptores Activados por factores de Proliferación Peroxisomal (PPARs) son factores de transcripción dependientes de ligando y están implicados en la regulación del metabolismo lipídico, la diferenciación, la homeostasis y en el control de la inflamación. La 15-deoxy- Δ 12,14 Prostaglandina J2 (15dPGJ2), ligando natural de PPAR γ , tiene alta afinidad por su receptor y se postula como modulador de la respuesta inflamatoria. En este trabajo estudiamos el rol de la 15dPGJ2 en la resolución de la inflamación de células cardiacas neonatales en dos modelos experimentales de inflamación: uno de shock endotóxico generado por lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* y otro de infección aguda por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Los resultados demuestran que la 15dPGJ2 modula la inflamación ya que inhibe la expresión de enzimas típicamente inflamatorias como Óxido Nítrico (NO) Sintasa 2 o inducible (NOS-2), Ciclooxigenasa 2 (COX-2) y Metaloproteasas (MMP-9 y MMP-2) inducidas por LPS o por la infección con *T. cruzi*. Además, el pretratamiento de los miocardiocitos con el agonista de PPAR γ inhibe la síntesis de citoquinas proinflamatorias como Interleuquina 6 (IL-6) y Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α), la actividad de MMP-9 y MMP-2 y la liberación de NO, metabolito de NOS-2. Además se observó que el tratamiento de los miocardiocitos con GW9662, antagonista específico de PPAR γ , revierte los efectos inhibitorios de 15dPGJ2 sobre la inflamación medida a través de la producción de NO. El papel de PPAR γ en la respuesta inflamatoria fue confirmado mediante la técnica de ARN de interferencia. Nuestros resultados muestran que el silenciamiento de PPAR γ impide la acción inhibitoria de 15dPGJ2 sobre la respuesta

inflamatoria. Este trabajo demuestra que 15dPGJ2 ejerce una modulación importante sobre la respuesta inflamatoria cardíaca a través de PPAR γ en ambos modelos experimentales.

Palabras clave: PPAR γ , 15dPGJ2, miocardiocitos, inflamación, NOS-2, COX-2, MMPs.

Abstract

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are ligand-dependent nuclear transcription factors that have been implicated in the regulation of lipid and glucose metabolism, differentiation, homeostasis and control of the inflammatory response. 15-deoxy- Δ 12,14 Prostaglandin J2 (15dPGJ2), natural PPAR γ ligand, has high affinity for PPAR γ and has been proposed as a regulator of the inflammatory response. In this work we studied the role of 15dPGJ2 in the resolution of inflammation of neonatal cardiac cells in two experimental models: one of endotoxic shock generated by lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* and the other of *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) acute infection. Our results show that 15dPGJ2 modulates inflammation by inhibiting inflammatory enzymes such as Nitric Oxide (NO) Synthase 2 (NOS-2), Cyclooxygenase 2 (COX-2) and Metalloproteases (MMP-9 and MMP-2) induced by LPS or by *T. cruzi* infection. Moreover, pre treatment of cardiomyocytes with PPAR γ agonist inhibits the synthesis of proinflammatory cytokines like Interleukin-6 (IL-6) and Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), MMP-9 and MMP-2 activities and NO production. Moreover, we observed that pre treatment of cardiomyocytes with GW9662, a PPAR γ specific antagonist, prevented 15dPGJ2 inhibitory effects on the inflammatory response. PPAR γ role in inflammation was confirmed through transfection of cardiomyocytes with PPAR γ -small interfering RNA (PPAR γ -siRNA). Our results show that transfection impairs the effects of 15dPGJ2 in the regulation of inflammatory response. Our data point out 15dPGJ2 as a potent modulator of cardiac inflammation in both experimental models.

Key words: PPAR γ , 15dPGJ2, cardiomyocytes, inflammation, NOS-2, COX-2, MMPs.

Introducción

El Receptor Activado por factores de Proliferación Peroxisomal de tipo gamma (PPAR γ) es un factor de transcripción activado por ligando que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares hormonales. Los PPAR γ se encuentran ampliamente expresados en el organismo, incluyendo a los tejidos adiposo, vascular, cardíaco y al sistema inmune. Existen además otras isoformas de PPAR codificadas por diferentes genes: PPAR α y PPAR β/δ quienes junto con PPAR γ han surgido como blanco terapéutico de diversos desordenes inflamatorios.

La activación de los distintos PPARs por sus respectivos ligandos resulta en la formación de heterodímeros con otro receptor nuclear y de esta forma activan o suprimen diversos patrones de expresión génica, aunque los mecanismos involucrados aún permanecen desconocidos (Mangelsdorf DJ et al., 1995). Los ligandos de PPAR γ incluyen al metabolito natural 15-deoxy- Δ 12,14 Prostaglandina J2 (Kliewer SA et al., 1995), ácidos grasos poli insaturados, drogas antiinflamatorias no esteroideas (Lehmann JM et al., 1997) y ligandos sintéticos como los miembros de la familia de tiazolidindionas (TZD) (Stumvoll M et al., 2002). Estos últimos son una clase de fármacos empleados en el tratamiento de diabetes tipo II ya que poseen efecto hipoglucemiante debido a su acción sobre el tejido graso y músculo esquelético donde aumentan la sensibilidad a insulina. Además, existen evidencias de que la unión de TZDs a PPAR γ ejerce también efectos anti-inflamatorios y posiblemente cardioprotectores (Chinetti G et al., 2000 y Delerive P et al., 2001).

Diversos trabajos describen que la 15dPGJ2, ligando natural de PPAR γ , posee una alta afinidad por su receptor y es capaz de reprimir ciertos genes en macrófagos activados, incluyendo a los de NOS-2, COX-2 y TNF- α (Straus DS et al., 2000). Además, 15dPGJ2 se encuentra presente durante la fase de resolución de la inflamación *in vivo* sugiriendo que podría funcionar como un regulador negativo de la respuesta inflamatoria (Gardner OS et al., 2005).

En el transcurso de enfermedades cardíacas como miocarditis, shock séptico, infarto de miocardio e incluso en la patogénesis de enfermedades parasitarias como Chagas, ha sido descripto que NOS-2 posee un rol importante (Goren N et al., 2004, Muñoz-Fernandez MA et al., 1992 y Qian Z et al., 2001). La expresión moderada de NOS-2 ejerce efectos beneficiosos modulando múltiples procesos fisiológicos y fisiopatológicos del sistema cardiovascular (Ignarro LJ et al., 2002). Sin embargo ha sido sugerido que una producción excesiva de NO por células inflamatorias provoca daños celulares que pueden llevar a la falla cardíaca (Massion PB et al., 2003).

De la misma manera, las metaloproteasas (MMPs) son enzimas que participan activamente en la degradación de la matriz extracelular favoreciendo la migración de células inmunes a sitios de injuria tisular (Van den Steen PE et al., 2002). Más aún, la síntesis elevada de MMPs en respuesta a infecciones con *Trypanosoma cruzi* se asocia con una respuesta inflamatoria sostenida y puede llevar a una degradación excesiva de la matriz

extracelular lo que perjudica el remodelamiento tisular pudiendo provocar un fallo cardiaco (Gutierrez FRS et al., 2008).

En este trabajo estudiamos el rol de un ligando natural de PPAR γ , la 15dPGJ2, en la resolución de la inflamación de células cardiacas neonatales en un modelo de shock endotóxico por lipopolisacárido (LPS) y en otro de infección con *T. cruzi*.

Nuestros resultados demuestran que la 15dPGJ2 inhibe la expresión -a nivel de ARN mensajero (ARNm) y proteína- de las enzimas infamatorias NOS-2, COX-2, MMP-9 y MMP-2 en las células cardiacas en ambos modelos experimentales. Además, hemos detectado que el pretratamiento de los miocardiocitos con 15dPGJ2 inhibe la liberación de NO, la actividad de MMP-9 y MMP-2 y la síntesis de citoquinas proinflamatorias tales como IL-6 y TNF- α . Más aún, comprobamos la participación de PPAR γ en esta modulación a través de un antagonista farmacológico específico y de ensayos de silenciamiento de PPAR γ mediante ARN de interferencia.

Materiales y Métodos

Cultivo primario de miocardiocitos neonatales de ratón

Ratones neonatos de 1 a 3 días de vida de la cepa CF-1 fueron sacrificados por dislocación cervical. Se obtuvieron los corazones y se los mantuvo en solución salina de Hanks estéril. Una vez aisladas, las células fueron resuspendidas en medio de cultivo DMEM: M-199 (Gibco™, Grand Island, N.Y., USA) en relación 4:1, vol/vol (Aoki MP et al., 2006). Más del 90% de las células obtenidas resultaron ser miocardiocitos, detectado mediante inmunomarcación con anticuerpo anti α -actinina. La viabilidad celular fue evaluada con Azul de Trypan.

Tratamiento con LPS

Los cultivos primarios de miocardiocitos fueron estimulados con lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* O26:B6 (Sigma-Aldrich Co St. Louis USA.) y tratados con 15dPGJ2, (Sigma-Aldrich Co St. Louis USA) o GW9662, (Sigma-Aldrich Co St. Louis USA). El solvente de 15dPGJ2 fue etanol y el de GW9662 DMSO.

Ratones e Infección

Ratones macho adultos de la cepa CF-1 fueron infectados por vía intraperitoneal con 1×10^5 tripomastigotes de la cepa pantrópica/reticulotrópica letal RA de *Trypanosoma cruzi*, tal como se describió anteriormente (Gonzalez Cappa SM et al., 1981). Todos los procedimientos involucrando animales fueron aprobados por el comité de ética del CONICET mediante la utilización de guías de la ANMAT y SENASA basadas en la guía de uso y cuidado de animales de laboratorio del NIH, USA.

Infección de miocardiocitos con *Trypanosoma cruzi*

Las células cardíacas fueron infectadas con la cepa RA de *T. cruzi* y al cabo de 3 horas los cultivos fueron lavados con medio fresco para remover los parásitos libres. Las células infectadas fueron cultivadas por diferentes tiempos según el experimento a realizar.

Medición de Óxido Nítrico (NO)

Los niveles de NO liberados al medio fueron determinados mediante el reactivo de Griess y cuantificados por espectrofotometría tal como se describió anteriormente (Goren N et al., 2004). La absorbancia a 540 nm fue comparada con una curva estándar de NaNO₂ y expresada como μM NOx.

RT-PCR Cuantitativa y a tiempo real (QRT-PCR)

Se extrajo ARN total de células tratadas con LPS o infectadas con *T. cruzi* y de sus respectivos controles mediante la utilización del reactivo de *Trizol* (Invitrogen, Life Technologies, Inc.) y siguiendo las instrucciones del proveedor. La concentración de ARN de cada muestra fue determinada mediante espectrofotometría a una absorbancia de 260 nm y la pureza, con el cociente a 260-280 nm. El ARN total (1 μg por muestra) fue retrotranscrito, con una mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs), mediante el reactivo comercial *Expand Transcriptase Reverse* (Roche, Basilea, Suiza) y de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Los ensayos de Q-RT-PCR fueron realizados con el reactivo *SyBr Green PCR kit* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) y bajo la utilización de un detector de secuencias *Applied Biosystems 7500*. Las secuencias de los cebadores o *primers*, diseñadas con el programa *Primer Express* (*Applied Biosystems*), fueron las siguientes:

PPAR γ directo: 5'-ATCTACACGATGCTGGC-3' reverso: 5'-GGATGTCCTCGATGGG-3';
NOS-2 directo: 5'-CACAGCAATATAGGCTCATCCA-3' reverso: 5'-GGATTTTCAGCCTCATGGTAAAC-3'; COX-2 directo: 5'-GCTGTACAAGCAGTGGCAAAG-3' reverso: 5'-GCGTTTGCGGTACTCATTGAGA-3'; MMP-2 directo: 5'-CGGAGATCTGCAAACAGGACA-3' reverso: 5'-CGCCAAATAAACCGGTCCTT-3'; MMP-9 directo: 5'-CAGACCAAGGGTACAGCCTGTT-3' reverso: 5'-AGTGCATGGCCGAACTC-3'.
Todas las muestras fueron normalizadas con 18S: directo 5'-AACACGGGAAACCTCACCC-3' y reverso: 5'-CCACCAACTAAGAACGGCCA-3'. El protocolo de PCR utilizado fue: 50°C por 2 min, 95°C por 2 min y 40 ciclos de 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min. Los valores de expresión cuantitativa fueron extrapolados a partir de curvas patrón para 18S, generadas con diluciones 1:10 de ADN copia o cDNA, por duplicado. Los valores obtenidos fueron promediados con los replicados en cada reacción, y las veces de inducción fueron determinadas considerando 1 el valor obtenido en el tiempo 0.

ARN de interferencia (siARN)

Los oligonucleótidos de siARN de PPAR γ (PPARGMSS-207863, -207864, -276435) y el control negativo (contenido de GC) fueron adquiridos a Invitrogen. Los miocardiocitos fueron cultivados hasta un 30-50% de confluencia por 24 horas y fueron transfectados con las combinaciones indicadas de PPAR γ -siARN utilizando oligofectamina (Invitrogen). A las 24 y 72 horas post transfección, se realizaron ensayos de actividad génica. El impacto del PPAR γ -siARN sobre el ARNm de PPAR γ mRNA fue evaluado por QRT-PCR.

Preparación de extractos proteicos totales y Western blot

Los miocardiocitos en cultivo fueron lavados 3 veces con PBS 1X y raspados de las placas de cultivo para aislar los extractos proteicos totales. Brevemente, se añadió OGP (Sigma-Aldrich Co) y buffer de lisis (100 μ l/placa de 3cm) luego se centrifugó a 13,000 g por 15 minutos. Los sobrenadantes fueron mantenidos a -80°C. Los análisis de Western blot fueron realizados según descrito anteriormente (Goren N et al., 2004).

Zimografía

La actividad gelatinolítica de MMP-9 y MMP-2 en el medio de cultivo fue analizada mediante zimogramas. Los medios de cultivo fueron sujetos a electroforesis en geles SDS-PAGE de 7.5%, a los cuales se les incorporó 1 mg/ml de gelatina (tipo A de piel porcina). Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron lavados para remover el SDS. Luego los geles fueron incubados en buffer Tris 50 mM pH 7.4 conteniendo 0.15 mM de NaCl y 30 mM de CaCl₂, por 36 h a 37 °C. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie y desteñidos con una solución de metanol 30% y ácido acético 10% en agua destilada. Las áreas de actividad proteolítica aparecieron como bandas de tinción negativa sobre el fondo oscuro teñido. Las regiones que representaban actividad de MMPs fueron cuantificadas mediante densitometría usando el programa *NIH-Image J*.

Análisis estadísticos

Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar (SD) de por lo menos tres experimentos independientes. Los valores *P* fueron determinados usando el test de Student o el de Tukey para valores no paramétricos. *P* < 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo.

Resultados

15dPGJ2 inhibe la expresión de NOS-2, COX-2 y MMP-9 en miocardiocitos estimulados con LPS.

En el transcurso de una sepsis o endotoxemia, se genera una respuesta de tipo inflamatoria en diferentes órganos que promueve la expresión de genes de enzimas proinflamatorias como NOS-2, COX-2 y MMPs. Con el objeto de estudiar si esta respuesta

contribuiría al daño cardiaco, nos hemos propuesto analizar la expresión de estas enzimas en nuestro modelo de miocardiocitos neonatales estimulados con LPS. Pudimos observar un aumento de dicha expresión a nivel ARNm, mediante PCR a tiempo real o cuantitativa (Q-RT-PCR), y a nivel de proteínas, mediante Western blot, a las 24 h post estímulo con LPS (10mg/ml) (Fig. 1 A y B respectivamente). A partir de estos resultados nos propusimos evaluar la capacidad de un ligando endógeno de PPAR γ , la 15-deoxi- Δ 12,14-PGJ2 (15dPGJ2), de regular la expresión de estos genes inflamatorios en los miocardiocitos en cultivo. Para ello, las células cardíacas fueron incubadas con 15dPGJ2 (2 μ M) por 30 min y estimuladas con LPS (10 μ g/ml) durante 24 h. La figura 1 A muestra que 15dPGJ2 inhibió la expresión de NOS-2, COX-2 y MMP-9 inducida por LPS. Más aún, la expresión del ARNm de estas enzimas inflamatorias también resultó inhibida por el tratamiento con 15dPGJ2 (Fig. 1 B).

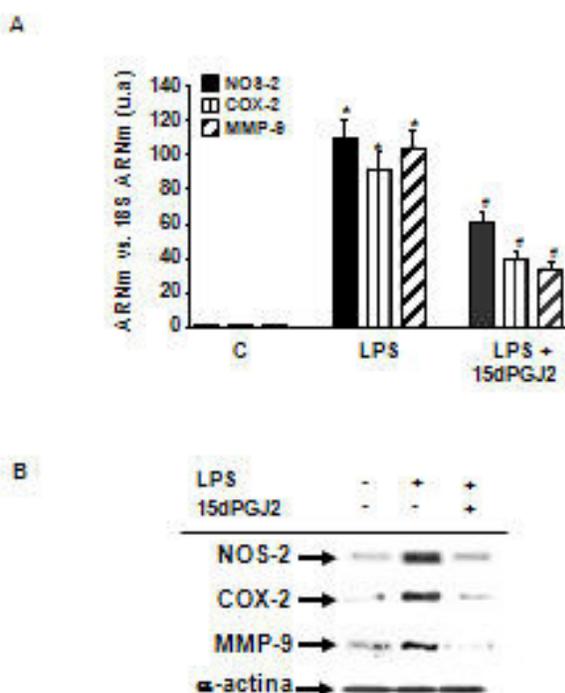


Figura 1. 15dPGJ2 modula la expresión de NOS-2, COX-2 y MMP-9 en miocardiocitos estimulados con LPS. *p<0.05 vs. Control; #p<0.05 vs. LPS.

El agonista natural de PPAR γ regula la expresión de NOS-2 y la actividad de MMPs en células cardíacas infectadas con *T. cruzi*.

A partir de los resultados anteriores, nos pareció interesante evaluar la capacidad de *T. cruzi* de inducir una respuesta inflamatoria en los miocardiocitos en cultivo. En primer lugar determinamos la relación óptima de infección parásitos/células tal que promoviera una respuesta inflamatoria para ser evaluada en términos de producción de NO. Se observó que la relación 5:1 (parásitos/célula) es la mínima relación necesaria para inducir dicha respuesta (Fig. 2 A). En segundo lugar, se analizó la expresión de genes típicamente

inflamatorios como NOS-2, MMP-9 y MMP-2. Para ello, las células cardíacas neonatales en cultivo fueron infectadas con la cepa aguda y letal RA de *T. cruzi*. Se observó una expresión significativa de los niveles de ARNm de dichas enzimas, medido por Q-RT-PCR, a las 48 h post infección (Fig 2 B). También pudimos detectar expresión a nivel proteína de NOS-2 medida por Wb (Resultados no mostrados) y una actividad aumentada de MMP-9 y MMP-2 evaluada por ensayos de zimografía (Fig. 2 C).

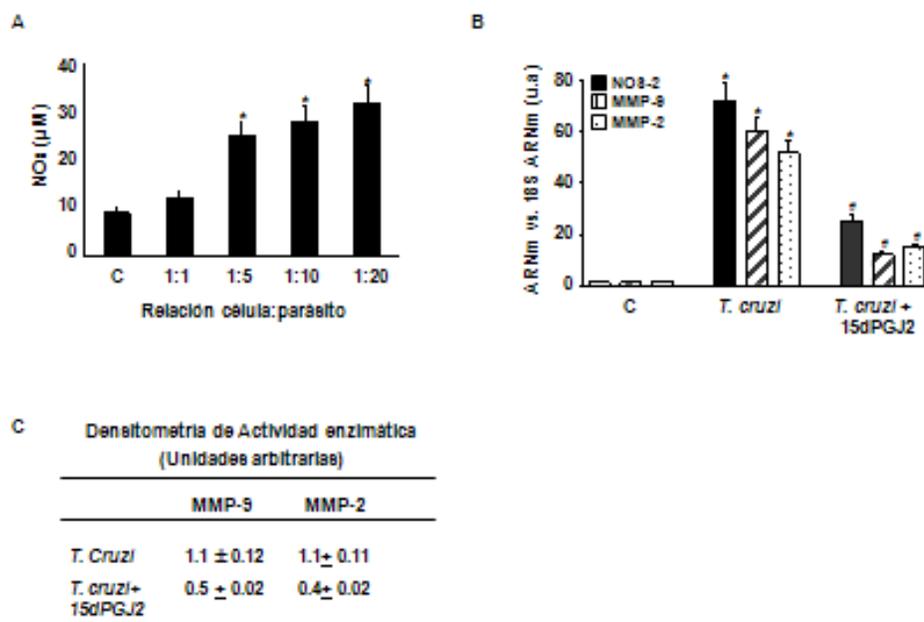


Figura 2. Caracterización de la respuesta inflamatoria en células cardíacas infectadas con *T. cruzi*. Efectos de 15dPGJ2 sobre la expresión de NOS-2, MMP-9 y MMP-2 y sobre la actividad de MMPs. *p<0.05 vs. Control; #p<0.05 vs. *T. cruzi*.

Dado que publicaciones anteriores hacen referencia a que ligandos de los PPAR γ ejercen efectos antiinflamatorios en diversos modelos experimentales, nos propusimos estudiar los efectos del pre-tratamiento con 15dPGJ2 en miocardiocitos infectados. Para ello, las células cardíacas neonatales fueron tratadas con 15dPGJ2 (2 μ M) por 30 min e infectadas con *T. cruzi*. La figura 2 B muestra inhibición en los niveles de expresión del ARNm de estas enzimas inflamatorias a las 48 h en miocardiocitos infectados con *T. cruzi*. Más aún, observamos que el tratamiento con 15dPGJ2 inhibe la expresión de NOS-2 a nivel de proteína inducida por la infección (Resultados no mostrados). Luego investigamos la capacidad de 15dPGJ2 de inhibir la actividad de MMP9 y MMP-2. Los datos tabulados en la Figura 2C muestran que 15dPGJ2 inhibe significativamente la actividad gelatinolítica de MMPs inducida por la infección.

Evaluación de la actividad de NOS-2 y de la participación de PPAR γ en los efectos inhibitorios de 15dPGJ2.

A partir de los resultados obtenidos decidimos evaluar si la inhibición de NOS-2 por 15dPGJ2 se veía reflejada también a nivel de la actividad de la enzima. Para ello cuantificamos los niveles de NO producidos y liberados por miocardiocitos estimulados con LPS o infectados con *T. cruzi*. La tabla 1 muestra que 15dPGJ2 es capaz de inhibir los

niveles de NO producidos a las 24 h de estímulo con LPS y a las 48 h de infección con *T. cruzi*. De acuerdo a los resultados obtenidos, y con el objetivo de evaluar la participación de PPAR γ en los efectos de 15dPGJ2, decidimos tratar a los miocardiocitos, en primer lugar con GW9662, antagonista específico de PPAR γ . La tabla 1 muestra que, en presencia de GW9662 (10 mM), 15dPGJ2 no es capaz de inhibir la producción de NO demostrando la participación de PPAR γ en dicho efecto. En función de este resultado, y con el objetivo de profundizar y confirmar el papel de PPAR γ , decidimos evaluar las consecuencias del silenciamiento de PPAR γ sobre los efectos de 15dPGJ2. De manera similar a lo observado con el antagonista, los efectos inhibitorios de 15dPGJ2 sobre la producción de NO también resultan revertidos en presencia del PPAR γ -siARN (Tabla 2). Estos resultados en conjunto nos muestran el rol modulador 15dPGJ2 a través de PPAR γ en la inflamación de miocardiocitos como resultado del tratamiento con LPS o de la infección con *T. cruzi*.

	NOx (μ M)		
	-	+ 15dPGJ2	+ 15dPGJ2 + GW9662
Control	9 \pm 1.0	10 \pm 0.9	8 \pm 0.9
LPS	55 \pm 5.6 ^a	18 \pm 1.9 ^b	45 \pm 4.4 ^a
<i>T. cruzi</i>	42 \pm 4.3 ^a	22 \pm 2.3 ^b	34 \pm 3.3 ^a

Tabla 1. Niveles de Óxido Nítrico (NO) producidos por miocardiocitos estimulados con LPS o infectados con *T. cruzi*. Papel del agonista de PPAR γ 15dPGJ2 y del antagonista GW9662. ^ap<0.05 vs. Control; ^bp<0.05 vs. LPS/*T. cruzi*; ^cp<0.05 vs. LPS/*T. cruzi* + 15dPGJ2.

	NOx (μ M)			
	-	+ 15dPGJ2	+ siARN	+ siARN + 15dPGJ2
Control	11 \pm 1.0	10 \pm 0.9	12 \pm 1.1	10 \pm 0.9
LPS	55 \pm 5.6 ^a	18 \pm 1.9 ^b	54 \pm 5.4	53 \pm 5.4 ^a
<i>T. cruzi</i>	45 \pm 4.3 ^a	23 \pm 2.3 ^b	43 \pm 4.3	39 \pm 3.9 ^a

Tabla 2. Participación de PPAR γ en la actividad de NOS-2 en miocardiocitos estimulados con LPS o infectados con *T. cruzi*. ^ap<0.05 vs. Control; ^bp<0.05 vs. LPS/*T. cruzi*; ^cp<0.05 vs. LPS/*T. cruzi* + 15dPGJ2.

Discusión y Conclusiones

En este trabajo hemos estudiado el efecto modulador de 15dPGJ2, agregado exógenamente, sobre la respuesta inflamatoria de células cardiacas neonatales tanto frente a un estímulo con LPS como a una infección con *T. cruzi*.

Los efectos antiinflamatorios ejercidos como respuesta a la activación de PPAR γ continúan siendo objeto de diversos estudios. En nuestro trabajo hemos observado que el tratamiento con 15dPGJ2 de los miocardiocitos estimulados con LPS, inhibe la expresión

tanto a nivel de ARNm como de proteína de NOS-2, COX-2 y MMP-9. Estos resultados sugieren que el efecto inhibitorio del ligando de PPAR γ sobre estas enzimas sería mediado por mecanismos transcripcionales. Además, en nuestro modelo de infección con *T. cruzi*, 15dPGJ2 también inhibió la expresión y activación de NOS-2, MMP-9 y MMP-2 y la expresión de los ARNm de citoquinas inflamatorias como TNF- α e IL-6. Publicaciones anteriores que hacen referencia a diversos modelos experimentales han demostrado que los ligandos PPAR γ pueden ejercer efectos anti inflamatorios (Bishop-Bailey D, 2010). También ha sido descrito que 15dPGJ2 posee efectos protectores frente a fallas orgánicas múltiples ocasionadas por endotoxinas (Collin et al., 2004). Consecuentemente a la inhibición de NOS-2, hemos detectado que el tratamiento con 15dPGJ2 inhibió la producción de NO, tanto en miocardiocitos estimulados con LPS como infectados con *T. cruzi*. Este hallazgo sugiere un rol dual para el NO, dado que este metabolito en exceso podría causar daños en el miocardio pero al mismo tiempo es conocida su capacidad parasiticida, incluso para *T. cruzi*. En este sentido, se ha reportado que ratones deficientes en NOS-2 (*NOS-2 knock out*) presentan una mayor parasitemia y mortalidad en la infección aguda comparados con ratones control (Holscher C et al., 1998, Machado FS et al., 2000 y Rodrigues MM et al., 2000). Por otra parte, el pre-tratamiento con GW9662, antagonista específico de PPAR γ , impidió el efecto inhibitorio de 15dPGJ2 sobre NOS-2 tanto células estimuladas con LPS como infectadas con *T. cruzi*, confirmando la participación de PPAR γ en dicho efecto.

Asimismo, en nuestro trabajo postulamos que las metaloproteasas contribuirían a la manifestación de la miocardiopatía chagásica al favorecer la entrada de los parásitos a tejidos y células. Se ha descrito una asociación directa entre la actividad elevada de MMP-9 y MMP-2 y la mortalidad de ratones infectados durante la fase aguda de la infección experimental con *T. cruzi*, sugiriendo un rol importante en la inducción de la miocarditis (Gutierrez FRS et al., 2008). En este trabajo hemos demostrado que 15dPGJ2 inhibe la actividad gelatinolítica y la expresión a nivel ARNm de MMP-9 y MMP-2 en ambos modelos experimentales.

Con el objetivo de profundizar en el estudio y así confirmar la participación de PPAR γ en los efectos de 15dPGJ2 sobre miocardiocitos infectados con *T. cruzi*, decidimos silenciar el ARNm de PPAR γ mediante ensayos con ARN de interferencia. Así, observamos que en presencia del siARNm, al no expresarse los receptores PPAR γ , 15dPGJ2 no pudo ejercer sus efectos inhibitorios sobre la expresión de NOS-2 y la producción de NO, confirmando la participación de PPAR γ en la resolución de la respuesta inflamatoria cardiaca generada por la infección con *T. cruzi*. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo confirmarían que 15dPGJ2 modula la respuesta inflamatoria a través de la unión a PPAR γ en las células cardiacas de ambos modelos experimentales.

Referencias Bibliográficas

Aoki MP, Canoa RC, Pellegrinia AV, Tanosb T, Guiñazúa NL, Cosob OA, Gea S: Different signaling pathways are involved in cardiomyocyte survival induced by a *Trypanosoma cruzi* glycoprotein. *Microbes and Infection* 8(7): 1723-1731, 2006.

Bishop-Bailey D: PPAR receptor activation: Experimental studies on cardiac structure and function. *Curr Opin Investig Drugs* 11(3):283-8, 2010.

Chinetti G, Fruchart JC, Staels B: Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* 49(10): 497–505, 2000.

Collin M, Patel NS, Dugo L, Thiemermann: Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in the protection afforded by 15-deoxydelta12,14 prostaglandin J2 against the multiple organ failure caused by endotoxin. *C. Crit Care Med* 32(3):826-31, 2004.

Delerive P, Fruchart JC, Staels B: Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol* 169(3):453–9, 2001.

Gardner OS, Dewar BJ, Graves LM: Activation of mitogen-activated protein kinases by peroxisome proliferator-activated receptor ligands: an example of nongenomic signaling. *Mol Pharmacol* 68(4):933-941, 2005.

Gonzalez Cappa SM, Bijovsky AT, Freilij H, Muller L, Katzin AM: Isolation of a *Trypanosoma cruzi* strain of predominantly slender form in Argentina. *Medicina (B Aires)* 41:119-120, 1981.

Goren N, Cuenca J, Martín-Sanz P, Bosca L: Attenuation of NF-kB signaling in rat cardiomyocytes at birth restricts the induction of inflammatory genes. *Cardiovasc Res* 64(2): 289-297, 2004.

Gutierrez FRS, Lalu MM, Mariano FS, Milanezi CM, Cena J, Gerlach RF, Santos JET, Torres-Duenas D, Cunha FQ, Schulz R, Silva JS: Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 are associated with mortality during the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Infect Dis* 197: 1468-76, 2008.

Holscher C, Kohler G, Muller U, Mossmann H, Schaub GA, Brombacher F: Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun* 66: 1208-15, 1998.

Ignarro LJ, Napoli C, Loscalzo J: Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. *Circ Res* 90:21–8, 2002.

Kliwer 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* 83: 813-9, 1995.

Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliwer SA: Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 272: 3406–3410, 1997.

Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva JS: Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation* 102: 3003-8, 2000.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM: The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835–9, 1995.

Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL: Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res* 93:388–398, 2003.

Munoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M: Activation of human macrophages for the killing of intracellular Trypanosoma cruzi by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett* 33: 35-40, 1992.

Qian Z, Gelzer-Bell R, Yang SX, Cao W, Ohnishi T, Wasowska BA, Hruban RH, Rodriguez ER, Baldwin WM 3rd, Lowenstein CJ: Inducible nitric oxide synthase inhibition of weibel-palade body release in cardiac transplant rejection. *Circulation* 104: 2369-75, 2001.

Rodrigues MM, Ribeiro M, Boscardin SB: CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate Trypanosoma cruzi through a nitric oxide dependent mechanism. *Immunol Lett* 73: 43-50, 2000.

Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, Glass CK: 15-deoxy-delta^{12,14}-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signalling pathway *Proc. Natl Acad Sci* 97: 4844-9, 2000.

Stumvoll M, Häring H. Glitazones: clinical effects and molecular mechanisms. *Ann Med* 34(3):217-24, 2002.

Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G: Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Re Biochem Mol Biol* 37(6): 375-536, 2002.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 1, año 10, Abril 2011

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar