



FACULTADE DE CIENCIAS

GRAO EN BIOQUÍMICA

D. David Rial Santos

**Estudio de la implicación de las
ciclofilinas en la inflamación**

Traballo Fin de Grao

06/2024

Índice

Resumen.....	4
Castellano: Estudio de la implicación de las ciclofilinas en la inflamación	4
Galego: Estudo da implicación das ciclofilinas na inflamación	4
English: Study of the involvement of cyclophilins in the inflammation.....	5
Abreviaturas y acrónimos	6
1. Introducción.....	8
1.1. Inflamación.....	8
1.2. Papel de los macrófagos en la inflamación	11
1.3. Rutas y mediadores inflamatorios en macrófagos.....	13
1.3.1. Óxido nítrico.....	16
1.4. Ciclofilinas.....	17
1.4.1. Ciclofilina A.....	18
1.4.2. Ciclofilina D.....	19
1.5. Métodos para evaluar la liberación de mediadores inflamatorios.....	21
1.5.1. Método de Griess.....	21
1.5.2. Estudio por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)	22
1.6. Compuestos marinos con actividad antiinflamatoria	22
1.6.1. Furanoditerpenos de <i>Spongia (Spongia) tubulifera</i>	23
2. Objetivos	25
3. Material y métodos.....	26
3.1. Reactivos y soluciones.....	26
3.2. Cultivo celular.....	27
3.3. Análisis de la viabilidad celular.....	27
3.4. Medida de liberación de NO	27
3.5. Determinación de los niveles de IL-10	28
3.6. Análisis estadístico	28
4. Resultados y discusión	29
4.1. Resultados	29
4.1.1. Estudio de la viabilidad de macrófagos murinos tratados con saponina.....	29
4.1.2. Estudio de la viabilidad de macrófagos murinos tratados con furanoditerpenos derivados de esponjas marinas.....	30
4.1.3. Estudio del efecto de los furanoditerpenos en la respuesta inflamatoria de macrófagos murinos	31

4.2. Discusión	34
4. Conclusiones	37
6. Bibliografía	38

Resumen

Castellano: Estudio de la implicación de las ciclofilinas en la inflamación

En este Trabajo de Fin de Grado se ha estudiado la implicación de las ciclofilinas A y D en la inflamación mediante su inhibición por dos furanoditerpenos naturales derivados de la esponja *Spongia (Spongia) tubulifera*. En primer lugar, se analizó la citotoxicidad en la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7, observándose que ninguno de los compuestos afectaba a la viabilidad celular. Por tanto, se continuó el estudio analizando su potencial para inhibir la respuesta inflamatoria en estas células, para lo que se estableció un modelo inflamatorio tratando a las células con lipopolisacárido durante 24 horas. Se observó que el compuesto 1, que inhibe la ciclofilina A, favorece la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo antiinflamatorio (M2b) al disminuir ligeramente la concentración de óxido nítrico y aumentar los niveles de una citocina antiinflamatoria (interleucina 10), por lo que la ciclofilina A parece estar relacionada con la resolución de la respuesta inflamatoria. Por otra parte, el compuesto 4, a través de la inhibición de las ciclofilinas A y D, provoca una disminución dosis-dependiente de la liberación de óxido nítrico en los macrófagos, pero no afecta a los niveles de interleucina 10, por lo que parece que la inhibición de las ciclofilinas A y D interviene en la mejora de la respuesta inflamatoria. En resumen, el compuesto 1 presenta potencial para controlar la inflamación, ya que promueve el cambio fenotípico de los macrófagos, mientras que el compuesto 4 parece tener efectos antiinflamatorios clásicos, disminuyendo marcadores proinflamatorios. Estos resultados confirman que tanto la ciclofilina A como la D están implicadas en la respuesta inflamatoria en macrófagos, por lo que su modulación podría ser una estrategia terapéutica novedosa para el tratamiento de enfermedades en las que la inflamación juega un papel clave.

Palabras clave: inflamación, ciclofilinas, furanoditerpenos, óxido nítrico, interleucina 10, macrófagos

Galego: Estudo da implicación das ciclofilinas na inflamación

Neste Traballo de Fin de Grao estudouse a implicación das ciclofilinas A e D na inflamación mediante a súa inhibición por dous furanoditerpenos derivados da esponxa *Spongia (Spongia) tubulifera*. En primeiro lugar, analizouse a citotoxicidade na liña celular de macrófagos murinos RAW 264.7, observándose que ningún dos compostos afectaba a viabilidade celular. Polo tanto, continuose o estudo analizando o seu potencial para inhibir a resposta inflamatoria nestas células, para o que se estableceu un modelo inflamatorio tratando as células con lipopolisacárido durante 24 horas. Observouse que o composto 1, que inhibe a ciclofilina A, favorece a polarización dos macrófagos hacia un fenotipo antiinflamatorio (M2b) ao disminuir lixeiramente a concentración do óxido nítrico e aumentar os niveis

dunha citocina antiinflamatoria (interleucina 10), polo que a ciclofilina A parece estar relacionada coa resolución da resposta antiinflamatoria. Por outra banda, o composto 4, a través da inhibición das ciclofilinas A e D, provoca unha diminución dosis-dependente da liberación de óxido nítrico nos macrófagos, pero non afecta aos niveis de interleucina 10, polo que parece que a inhibición das ciclofilinas A e D intervén na mellora da resposta inflamatoria. En resumo, o composto 1 presenta potencial para controlar a inflamación, xa que promove o cambio fenotípico dos macrófagos, mentres que o composto 4 parece ter efectos antiinflamatorios clásicos, diminuindo marcadores proinflamatorios. Estes resultados confirman que tanto a ciclofilina A coma a D están implicadas na resposta inflamatoria en macrófagos, polo que a súa modulación podería ser unha estratexia terapéutica novedosa para o tratamento de enfermidades nas que a inflamación xoga un papel chave.

Palabras chave: inflamación, ciclofilinas, furanoditerpenos, óxido nítrico, interleucina 10, macrófagos

English: Study of the involvement of cyclophilins in the inflammation

In this Final Degree Project, the involvement of cyclophilins A and D in inflammation has been studied through their inhibition by two furanoditerpenes derived from the sponge *Spongia (Spongia) tubulifera*. Firstly, cytotoxicity was analyzed in the murine macrophage cell line RAW 264.7, observing that none of the compounds affected cell viability. Hence, the study was followed by analyzing the potential of the compounds to inhibit the inflammatory response, so an inflammatory model was established by treating cells with lipopolysaccharide for 24 hours. Compound 1, which inhibits cyclophilin A, favours the polarization of macrophages towards an anti-inflammatory phenotype (M2b) by slightly decreasing nitric oxide concentration and by increasing the levels of an anti-inflammatory cytokine (interleukin 10), so cyclophilin A seems to be related to the resolution of the inflammatory response. On the other hand, compound 4, through the inhibition of cyclophilins A and D, triggers a dose-dependent decrease of nitric oxide release, but it did not affect interleukin 10 levels, so the inhibition of cyclophilins A and D seems to be involved in the amelioration of the inflammatory response. In summary, compound 1 has potential to regulate inflammation, since it promotes a phenotypic change of macrophages, while compound 4 seems to have classic anti-inflammatory effects, reducing pro-inflammatory markers. These results confirm that both cyclophilins are involved in the inflammatory response in macrophages, and therefore, its modulation could be a novel therapeutic strategy for the treatment of diseases in which inflammation plays a key role.

Key words: inflammation, cyclophilins, furanoditerpenes, nitric oxide, interleukin 10, macrophages

Abreviaturas y acrónimos

CsA: ciclosporina A

CypA: ciclofilina A, del inglés “cyclophilin A”

CypD: ciclofilina D, del inglés “cyclophilin D”

Cyps: ciclofilinas, del inglés “cyclophilins”

DAMPs: patrones moleculares asociados a daño, del inglés “Danger Associated Molecular Patterns”

DMSO: dimetilsulfóxido

ELISA: estudio por inmunoadsorción ligado a enzimas, del inglés “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”

IFN- γ : interferón gamma

I κ B: subunidad B de la quinasa inhibidora del factor nuclear kappa B, del inglés “nuclear factor kappa B inhibitor kinase subunit B”

IKK2: quinasa inhibidora de la subunidad 2 de la quinasa inhibidora del factor nuclear kappa B, del inglés “inhibitor kinase of nuclear factor kappa B inhibitor kinase subunit 2”

IL-1 β : interleucina 1 beta

IL-4: interleucina 4

IL-6: interleucina 6

IL-10: interleucina 10

IL-13: interleucina 13

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible, del inglés “inducible nitric oxide synthase”

LPS: lipopolisacárido

mPTP: poro de transición de permeabilidad mitocondrial, del inglés “mitochondrial permeability transition pore”

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, del inglés “nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”

nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal, del inglés “neuronal nitric oxide synthase”

NO: óxido nítrico, del inglés “nitric oxide”

Nrf2: factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2, del inglés “nuclear factor erythroid 2-related factor 2”

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos, del inglés "Pathogen-associated molecular patterns)

ROS: especies reactivas de oxígenos, del inglés "reactive oxygen species"

SEM: error estándar de la media, del inglés "standard error of the mean"

STAT3: transductor de señales y activador de la transcripción 3, del inglés "signal transducer and activator of transcription 3"

TFG- β : factor de crecimiento transformante beta, del inglés "transforming growth factor beta"

PRRs: receptores de reconocimiento de patrones, del inglés "Pattern Recognition Receptors)

TLR: receptor tipo Toll, del inglés "Toll-like receptor"

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa, del inglés "tumoral necrosis factor alfa"

1. Introducción

1.1. Inflamación

La inflamación es un proceso esencial que forma parte de la defensa inmune de todos los mamíferos, y probablemente de todos los vertebrados e incluso invertebrados¹. Ha sido definida durante siglos como una respuesta ante infecciones y heridas que, según Aulus Cornelius Celsus (25 a.C.-50 d.C.), se caracteriza por presentar enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor; cuatro signos comunes a todos los procesos inflamatorios. Sin embargo, a día de hoy, esta definición está siendo reconsiderada debido al gran número de evidencias de que las moléculas y células asociadas con la inflamación se activan o expresan en alta concentración en ausencia de lesión tisular o infecciones². En este sentido, el concepto moderno de inflamación podría redefinirse como una respuesta protectora ante un estímulo nocivo en el que inevitablemente ocurre un coste para la función normal del tejido o como la respuesta inmune innata a estímulos dañinos como patógenos, heridas o estrés metabólico²⁻³.

La inflamación aguda es una respuesta rápida ante lesiones asociadas a la entrada de patógenos en la que se prepara una defensa anticipatoria¹. Las primeras alteraciones que se pueden observar durante la inflamación aguda son cambios en el flujo vascular con el objetivo de aumentar el flujo sanguíneo en la región afectada. Por su parte, el endotelio sufre alteraciones progresivas que potencian la permeabilidad de los pequeños vasos, lo que causa un escape de fluido hacia la zona extravascular. Dicho escape provoca que los leucocitos se adhieran al endotelio y se muevan a través de la pared vascular al tejido intersticial, en un proceso conocido como extravasación⁴. De esta forma, se consigue el objetivo de la respuesta inflamatoria aguda: suministrar al área dañada mediadores de la inflamación y leucocitos, que reconocen distintas estructuras presentes en los microorganismos como proteínas, lípidos o glúcidos que no se encuentran en las células hospedadoras. Esto provoca que se activen mecanismos de respuesta inespecíficos, incluidos mediadores no específicos altamente tóxicos, como las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés “reactive oxygen species”), que eliminan patógenos directamente, pero que provocan daños colaterales al afectar a las células sanas del individuo (Figura 1). Es por ello por lo que estos mecanismos necesitan ser controlados estrictamente por células del sistema inmune adaptativo, que desarrollan respuestas antipatogénicas específicas que confieren un control muy estrecho entre la respuesta del sistema inmune innato y el adaptativo¹.

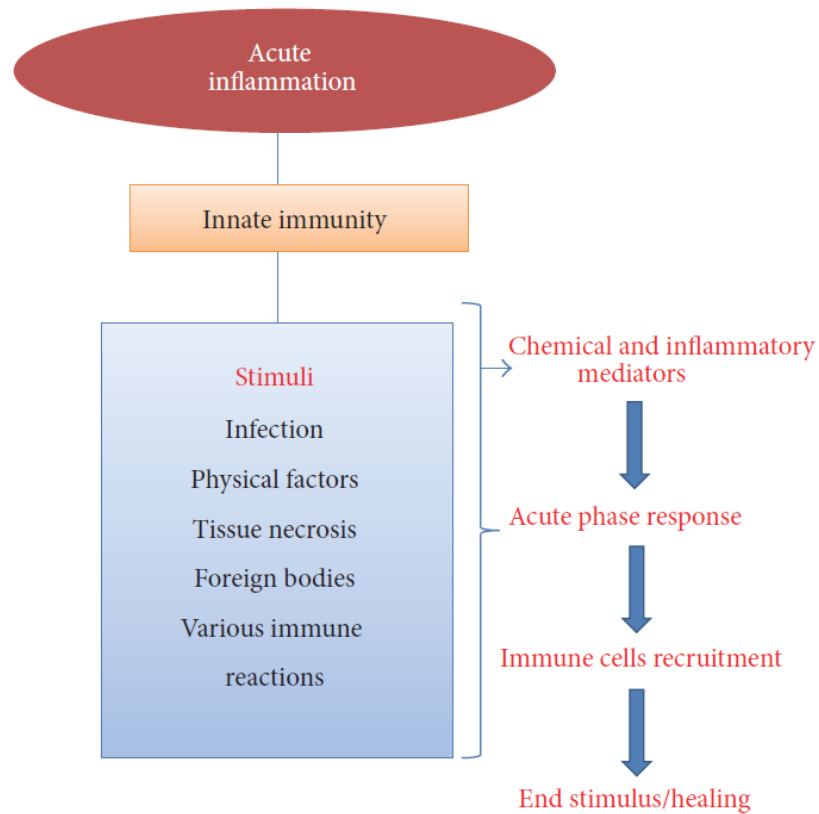


Figura 1. Proceso de activación y resolución de la inflamación aguda. Extraída de ⁴.

A pesar de que las respuestas inflamatorias son muy heterogéneas en términos de los tipos de células y mediadores moleculares involucrados, se pueden dividir en cuatro componentes comunes: inductores inflamatorios, sensores, mediadores y tejidos diana, los cuales convergen en una vía inflamatoria, pero se diferencian dependiendo del tipo de infección³⁻⁴. Una respuesta inflamatoria aguda eficaz resulta en la eliminación del foco de inflamación seguida de una reparación del tejido mediada por los macrófagos residentes del tejido¹.

Aunque la inflamación es una respuesta vital del sistema inmune humano, si persiste durante un periodo mayor de tiempo provocará un estado de inflamación crónica, lo cual puede suponer la potenciación del riesgo de padecer enfermedades o desórdenes crónicos ¹. La inflamación crónica de tejidos puede aparecer con la presencia o ausencia de estímulos inflamatorios, o de agentes físicos y químicos que no pueden ser eliminados o por exposición continua a los mismos, así como susceptibilidad genética. En el comienzo de este tipo de inflamación hay un predominio de la inmunidad adaptativa, pero a medida que esta avanza y la inflamación no se resuelve, se produce el cambio de la respuesta inmune desde la inmunidad adaptativa hacia la innata debido a la acción constante de los mediadores proinflamatorios, lo que daña las células y perpetúa la inflamación (Figura 2)^{1, 4}. Las consecuencias de las reacciones inmunes persistentes incluyen desde la aparición de tumores hasta enfermedades inflamatorias sistémicas como la obesidad, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas^{1, 3}.

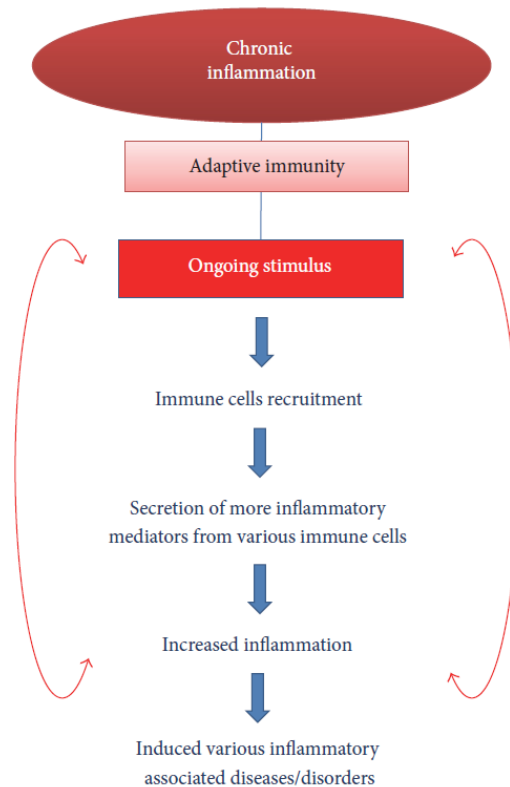


Figura 2. Progreso de la inflamación crónica y sus consecuencias. Extraída de ⁴.

Por otro lado, con el avance de la tecnología médica, la esperanza de vida media ha aumentado de forma significativa en los últimos años, sobre todo en los países desarrollados, lo que ha provocado un envejecimiento de la población. El envejecimiento es un proceso progresivo multifactorial caracterizado por el deterioro de órganos, tejidos, células a niveles moleculares⁵. A medida que los mamíferos envejecen, la homeostasis se ve comprometida, incluyendo un desequilibrio en el sistema inmune, que tiende hacia las respuesta innatas en lugar de las adaptativas. Por tanto, el envejecimiento es otra causa de inflamación crónica. En los humanos, esto se pone de manifiesto con un alto nivel de marcadores sistémicos inflamatorios en la población anciana en comparación con los jóvenes, lo que se conoce con el término inglés como “inflammaging”, formado por las palabras “inflammation” y “aging”, inflamación y envejecimiento, respectivamente¹. Es decir, “inflammaging” es un estado crónico de baja inflamación sistémica relacionado con la edad⁵.

Junto con el aumento de la esperanza de vida, la prevalencia de la obesidad ha ido incrementándose en los últimos años, siendo la quinta causa mundial de muerte en la actualidad. Además, se prevé que en 2030 el 57,8% de la población adulta presente sobrepeso u obesidad. La obesidad conlleva una disfunción metabólica e inflamación crónica, conocida como meta-inflamación, la cual puede progresar a través de patologías como la diabetes mellitus tipo II, la enfermedad del hígado graso no alcohólico, enfermedades cardiovasculares, cáncer, etc. Diversos estudios indican que un índice de masa corporal

elevado durante la adultez temprana y la mediana edad aumentan significativamente la posibilidad de hospitalización y mortalidad después de los 65 años⁵.

En definitiva, las respuestas inflamatorias desreguladas están presentes en numerosas enfermedades humanas, entre las que se incluyen no sólo infecciones y desórdenes autoinmunes, sino también enfermedades neurológicas, renales, hepáticas, cardiovasculares y neoplásicas. Es decir, la inflamación injustificada o irresuelta puede actuar como base de diversas enfermedades, y las respuestas inflamatorias descontroladas pueden agravar el curso de patologías originadas por señales no inflamatorias⁶.

1.2. Papel de los macrófagos en la inflamación

La primera línea de defensa del organismo es la inmunidad adaptativa, la cual está formada por basófilos, eosinófilos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos, macrófagos y células asesinas naturales⁷⁻⁸. Los macrófagos y los monocitos forman parte del sistema de fagocitos mononucleares y derivan de precursores embrionarios o de células madre hematopoyéticas de la médula ósea. Los precursores embrionarios son cruciales para el desarrollo de los macrófagos de los tejidos en el feto, mientras que las células madre hematopoyéticas mantienen las poblaciones de macrófagos circulantes ante demandas agudas o crónicas de los tejidos. Los macrófagos son la población inmunitaria más común y tienen un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis y la función de los tejidos en condiciones fisiológicas⁵. Además, son células presentadoras de antígenos no específicas⁸. En cuanto a los monocitos, se reclutan y diferencian a macrófagos ante lesiones, infecciones o inflamación. Ambos tipos celulares coexisten en el mismo tejido y trabajan de forma conjunta para mantener la homeostasis⁵.

Se han descrito diversos fenotipos de macrófagos que desempeñan distintos papeles para regular el medio interno gracias a su plasticidad, la cual les permite actuar ante señales agudas o crónicas mediante rápidos cambios fenotípicos a través de diversas respuestas, ejecutando funciones cruciales durante la invasión de patógenos o modulando el estrés crónico⁵. El modelo más extendido de polarización de macrófagos los divide en dos clases: M1 (activados de la forma clásica) y M2 (activados de la forma alternativa)^{5, 8}. Sin embargo, recientemente se han identificado hasta 29 fenotipos que difieren de los dos tipos clásicos⁸.

Los macrófagos se pueden polarizar a los fenotipos M1 o M2 en presencia de estímulos proinflamatorios o antiinflamatorios, respectivamente⁷ (Figura 3). Los macrófagos clásicos, M1, proinflamatorios y citotóxicos, se caracterizan por la activación de las vías inflamatorias canónicas y la secreción de mediadores proinflamatorios. Este fenotipo puede identificarse por la liberación de citocinas como el interferón gamma (IFN- γ), la interleucina 1 beta (IL-1 β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , del inglés “tumoral necrosis factor alfa”), interleucina 6 (IL-6), interleucina 12, interleucina 18,

interleucina 23, diferentes quimiocinas y óxido nítrico (NO, del inglés “nitric oxide”). Cuando la inflamación cesa, los macrófagos M1 transicionan al fenotipo M2 para contribuir a la reparación del tejido dañado⁸. Sin embargo, cuando esta polarización no ocurre y los macrófagos se mantienen en el fenotipo M1, puede producirse un estado de inflamación crónica que conllevará la disrupción de la homeostasis⁷⁻⁸.

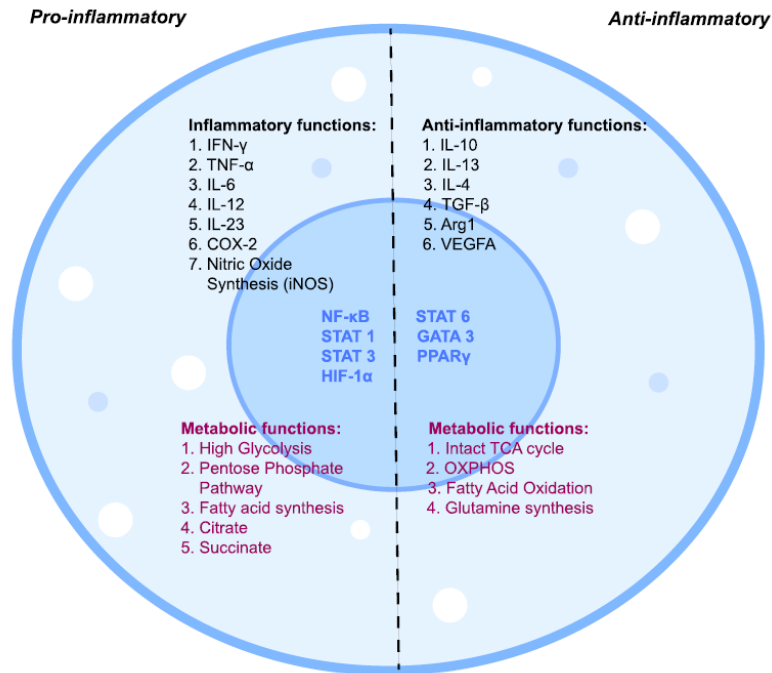


Figura 3. Diferencias en las rutas inflamatorias y funciones metabólicas en los macrófagos M1 y M2.

Extraída de ⁹.

Los macrófagos antiinflamatorios o M2 desempeñan un papel regulador en el remodelado de tejidos, angiogénesis, enfermedades alérgicas e infecciones parasitarias. Ciertos estímulos como la interleucina 4 (IL-4), la interleucina 10 (IL-10), la interleucina 13 (IL-13), el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β, del inglés “transforming growth factor beta”) y el factor de crecimiento endotelial vascular, pueden promover la polarización de macrófagos hacia este fenotipo durante las últimas fases de la respuesta inflamatoria en la que se resuelve la inflamación ⁸.

En condiciones de inflamación crónica y estrés como la obesidad y el envejecimiento, el tejido adiposo secreta ciertas adipocinas y quimiocinas, lo que provoca el reclutamiento de las células inmunes circulantes. Mientras que los macrófagos M2 son más abundantes en individuos jóvenes, en la obesidad y envejecimiento los macrófagos se polarizan preferentemente hacia el estado proinflamatorio, por lo que la producción de adipocinas y quimiocinas antiinflamatorias derivadas del tejido adiposo en condiciones fisiológicas, como la adiponectina, se reduce. En estas condiciones, la rápida activación de los macrófagos M1 provoca un fenómeno de reprogramación metabólica, es decir, cambios en el

metabolismo, lo que se evidencia con un incremento de la glucólisis, de la fosforilación oxidativa, de la ruta de las pentosas fosfato y de la síntesis de ácidos grasos. Este aumento da lugar a la producción excesiva de ROS, las cuales son una gran fuente de estrés celular, y la estabilización del factor 1 alfa inducible por hipoxia, que promueve la liberación de NO, lo que resulta en la producción de IL-1 β en los macrófagos, un importante mediador proinflamatorio⁵.

1.3. Rutas y mediadores inflamatorios en macrófagos

Debido a su gran plasticidad, los macrófagos son altamente susceptibles a transformaciones fenotípicas bajo diferentes estímulos del microambiente inmune⁸. La inflamación crónica se inicia generalmente por la activación continua de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés "Pattern Recognition Receptors"), que se expresan tanto en células inmunes como no inmunes. Estos PRRs son receptores tipo Toll (TLRs) y están presentes en las membranas celulares de los macrófagos, causando así la polarización hacia un fenotipo proinflamatorio cuando se activan. Esta activación se produce por la unión de moléculas virales y bacterianas, como el lipopolisacárido (LPS) y enzimas invasivas, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés "Pathogen-associated molecular patterns"), o por moléculas endógenas, como ácidos nucleicos, pequeños metabolitos como el ATP y proteínas, denominadas patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, del inglés "Danger Associated Molecular Patterns"). Bajo condiciones fisiológicas normales, los DAMPs no son capaces de activar la señalización de los PRRs porque no tienen acceso a los compartimentos subcelulares donde estos se localizan^{6, 10}.

La activación de los TLR, por PAMPs o DAMPs, o de los receptores de interleucinas proinflamatorias, como el receptor de IL-6, produce la activación de un factor de transcripción conocido como factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B, del inglés "nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells"), el principal regulador de la respuesta inflamatoria (Figura 4). La activación de los receptores TLR promueve la fosforilación de la quinasa inhibidora de la subunidad 2 de la quinasa del factor nuclear kappa B (IKK2, del inglés "inhibitor kinase of nuclear factor kappa B inhibitor kinase subunit 2"), lo que a su vez promueve la fosforilación de la subunidad B de la quinasa inhibidora del factor nuclear kappa B (I κ B, del inglés "nuclear factor kappa B inhibitor kinase subunit B"). Este último impide la translocación al núcleo de los monómeros que componen NF- κ B (RelA/p65, RelB, cRel, NF- κ B1/p50, NF- κ B2/p52) cuando no está fosforilado, pero al fosforilarse se degrada en el proteasoma, por lo que deja de ejercer su acción represiva sobre NF- κ B. Al degradarse I κ B, los monómeros de NF- κ B pueden dimerizarse y translocarse al núcleo, donde se unen a genes proinflamatorios, dando lugar a la expresión de altos niveles de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α e IL-6. La expresión y posterior liberación al medio de estos mediadores activa los receptores de citocinas, como el receptor de IL-6, lo que a su vez conlleva que se produzca una

retroalimentación positiva de la expresión de muchos genes asociados con el fenotipo proinflamatorio (Figura 4). Por tanto, se inhabilita la traducción de importantes moléculas antiinflamatorias, lo que se asocia con el desarrollo y persistencia de la inflamación crónica^{8, 11}.

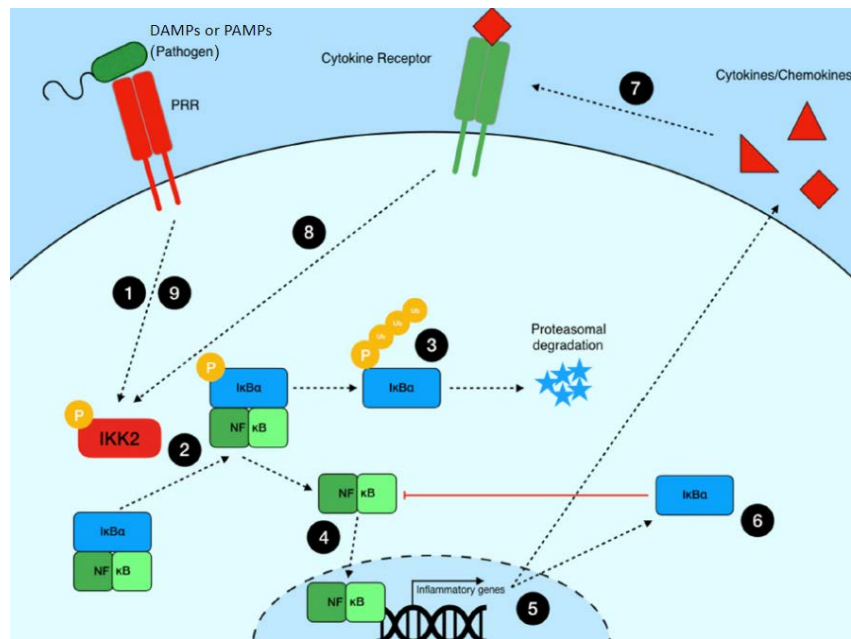


Figura 4. Expresión de los genes inflamatorios tras la activación de los PRRs o los receptores de citocinas y su relación con el factor de transcripción proinflamatorio NF-κB. Adaptada de ¹¹.

Una vez que el estímulo inflamatorio se elimina, el organismo entra en una fase de restauración. Por un lado, IκB deja de estar fosforilado y se une de nuevo con NF-κB, de tal forma que impide que éste se transloque al núcleo. Además, en contraposición a la ruta NF-κB, la ruta de señalización del factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2 (Nrf2, del inglés “nuclear factor erythroid 2–related factor 2”), actúa como protector ante el estrés oxidativo y es responsable de mantener la homeostasis y el balance redox en células y tejidos. Desde una perspectiva funcional, Nrf2 controla negativamente la ruta de señalización NF-κB por múltiples mecanismos. Por una parte, Nrf2 inhibe el estrés oxidativo mediado por la activación de NF-κB al disminuir los niveles de ROS y, por otro lado, también previene la degradación de IκB por el proteasoma e inhibe la traslocación de NF-κB al núcleo¹².

Por otra parte, las citocinas antiinflamatorias promueven la activación de los receptores de IL-10 (Figura 5), que provocan que STAT3 se transloque al núcleo, promoviendo en este caso una respuesta asociada con numerosos genes antiinflamatorios y factores de reparación como IL-13, IL-35 y la propia IL-10. Esa respuesta antiinflamatoria causa la expresión de, entre otros, represores transcripcionales de genes proinflamatorios, como los asociados a NF-κB, y reguladores metabólicos, además de la inhibición de la versión de STAT3 asociada al receptor de IL-6 y otros receptores proinflamatorios, por lo que en conjunto inhiben la respuesta inflamatoria^{8, 13}.

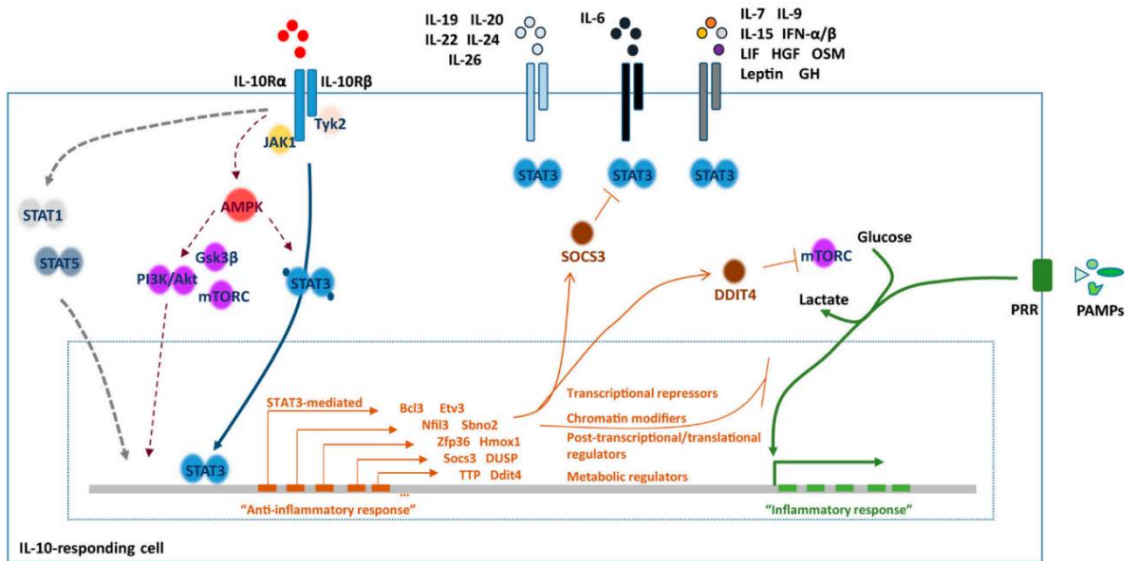


Figura 5. Respuesta antiinflamatoria corriente abajo iniciada por la IL-10. Extraída de ¹³.

Cabe resaltar que STAT3 es una proteína heterogénea que puede influenciar la polarización de los macrófagos en ambas direcciones, sin embargo, no hay estudios relevantes que expliquen este fenómeno paradójico, por lo que se necesita más información para conocer el rol específico de STAT3 en la polarización de los macrófagos¹⁴.

Además, los linfocitos T reguladores y otras células inmunes promueven la liberación de TGF-β1, una molécula antiinflamatoria que induce una retroalimentación positiva de producción de IL-10 a través de la fosforilación de Smad2 y Smad3 (Figura 6), lo que permite la activación de fibroblastos, la autorrenovación de células madre, la reparación de los tejidos dañados y la restauración de la función de los órganos⁸.

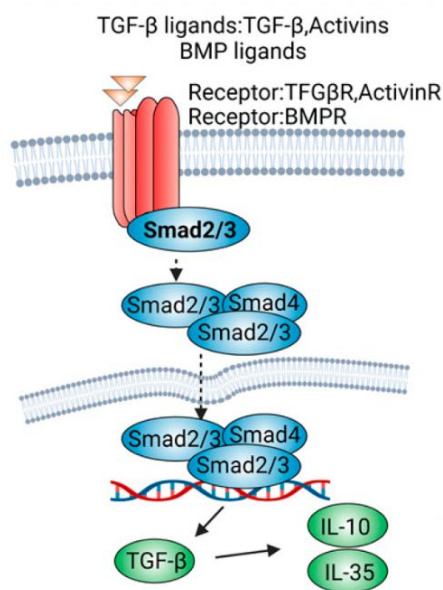


Figura 6. Participación de Smad2/3 y TGF-β1 en la retroalimentación positiva de IL-10. Extraída de ⁸.

En resumen, cuando los tejidos están siendo dañados por factores inflamatorios, los macrófagos se polarizan al fenotipo M1 con el objetivo de resolver la inflamación. Después de que la causa de la inflamación haya sido eliminada, los macrófagos M1 se convierten progresivamente a macrófagos M2, que producen mediadores para reducir la inflamación, atrayendo a linfocitos B y T reguladores e inhibiendo la respuesta inmune. El problema surge cuando el estímulo causante de la inflamación no puede ser eliminado, por lo que los macrófagos no pueden polarizarse a su forma antiinflamatoria, lo que causa que la inflamación continúe de forma indefinida⁸.

1.3.1. Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un radical libre diatómico que desempeña un papel fundamental en la homeostasis de los mamíferos, ya que es un mediador que interviene en un gran número de procesos fisiológicos, entre los que están incluidos la inflamación, vasodilatación, trombosis, inmunidad y neurotransmisión¹⁵⁻¹⁷.

Una de las grandes diferencias entre los fenotipos M1 y M2 de macrófagos es la ruta de metabolización de la arginina, en la que se produce un fenómeno de reprogramación metabólica. El metabolismo de la arginina desempeña un papel fundamental una vez los macrófagos están polarizados, debido a que este aminoácido es el precursor del NO. La enzima encargada de transformar la arginina en NO es la óxido nítrico sintasa (NOS). Existen tres isoformas de dicha enzima: óxido nítrico sintasa endotelial, óxido nítrico sintasa neuronal y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS del inglés, “inducible nitric oxide synthase”). Esta última está presente en macrófagos y otras células inflamatorias. Las tres isoenzimas difieren en estructura, distribución, regulación y capacidad de síntesis, pero todas ellas catalizan la misma reacción: la incorporación de oxígeno molecular a la arginina, la liberación de NO y la generación de citrulina como subproducto. Además, todas las isoformas pueden sintetizar el ion superóxido en ausencia de su sustrato, el NO, o de su cofactor, el BH₄. La transcripción del gen que codifica para la isoenzima iNOS puede ser iniciada por una gran variedad de citocinas proinflamatorias, como IL-1β, IFN-γ o TNF-α, productos microbianos como el LPS o por hipoxia. Por otro lado, su transcripción puede ser inhibida por citocinas antiinflamatorias como IL-4, IL-10 o TGF-β¹⁸.

En el caso de los macrófagos, la presencia de estímulos proinflamatorios o antiinflamatorios dirige a estas células hacia un fenotipo en el que domina el metabolismo de la arginina por la ruta del NO o por la de la arginasa, respectivamente (Figura 7).

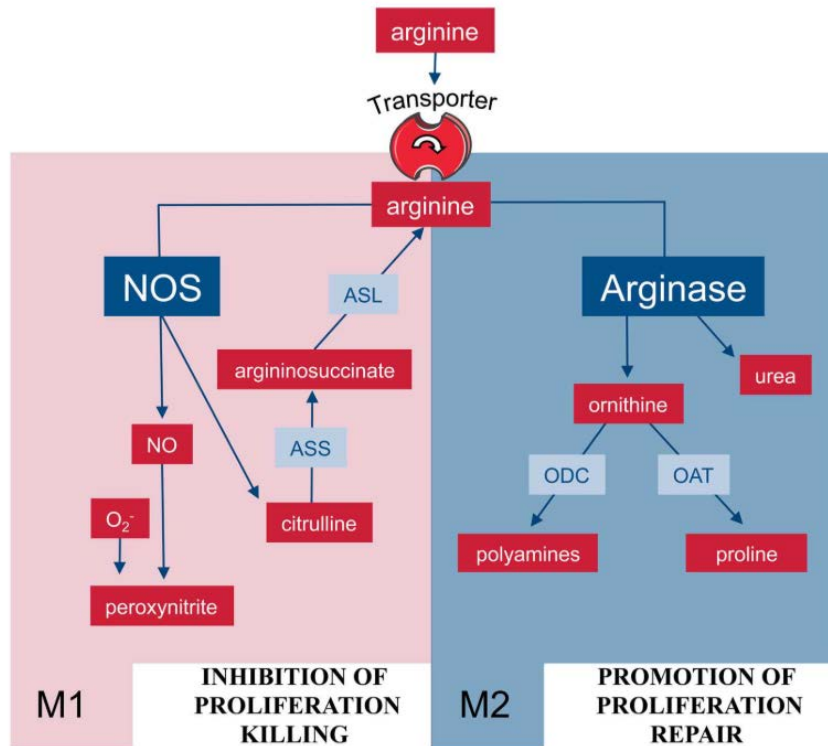


Figura 7. Diferencias entre el metabolismo de la arginina en los macrófagos M1 y M2. Extraída de ¹⁸.

En presencia de estímulos proinflamatorios, los macrófagos se polarizan a su estado citotóxico o M1, en el que la iNOS transforma la arginina en NO y citrulina. Esta última es convertida en argininosuccinato y de nuevo en arginina por las enzimas argininosuccinato sintasa y argininosuccinato liasa, respectivamente. La incorporación de la arginina de nuevo a la ruta es esencial para asegurar el suministro del sustrato de la síntesis de NO. Sin embargo, ante estímulos antiinflamatorios, los macrófagos M2 usan la arginina como sustrato de la arginasa, cuyos productos son la ornitina y la urea. La ornitina se cataboliza en poliaminas o en un precursor de la prolina por las enzimas ornitina descarboxilasa y ornitina aminotransferasa, respectivamente. Al contrario que el NO, dichos productos no son tóxicos para la célula¹⁸. Esta diferenciación de rutas de ambos fenotipos de macrófagos hace de especial interés la polarización de macrófagos hacia el tipo antiinflamatorio como estrategia terapéutica en enfermedades inflamatorias como puede ser la aterosclerosis⁷.

1.4. Ciclofilinas

La familia de las ciclofilinas (Cyps, del inglés “cyclophilins”) humanas consiste en más de 15 proteínas pertenecientes a las inmunofilinas ¹⁹⁻²³. Se diferencian entre sí en términos de localización subcelular, función y moléculas con las que interactúan²². Son proteínas bien conservadas y presentes en todos los procariontes y eucariotas²⁰. Una característica estructural compartida entre sus isoformas es un sitio activo con actividad peptidil-prolil isomerasa (PPIasa) superficial y altamente conservado, donde catalizan la isomerización cis-trans de los residuos de prolina, un paso limitante en el plegamiento de las

proteínas. Los inhibidores clásicos de las Cyps, como la ciclosporina A (CsA), se unen a ese sitio activo y, por lo tanto, inhiben de forma equipotente a todas las isoformas. Adyacente a este dominio se encuentra el bolsillo S2, cuyos residuos son más diversos entre las distintas isoformas de Cyps que los del sitio activo anterior, lo que da la oportunidad de unión a las isoformas de forma más selectiva²¹.

Aunque en primera instancia se creía que las Cyps sólo intervenían en el plegamiento de proteínas, a día de hoy está ampliamente aceptado que tienen una gran variedad de funciones en distintos procesos celulares, como la inflamación, la transcripción de genes, la transducción de señales, la maduración del ARN, la interacción patógeno-hospedador y la quimiotaxis²².

1.4.1. Ciclofilina A

La ciclofilina A (CypA, del inglés “cyclophilin A”) es una proteína que cataliza las interacciones entre proteínas, regula su maduración, e interviene en distintas funciones biológicas tanto como proteína intracelular como extracelular^{20, 23}.

Como proteína intracelular, se descubrió inicialmente que actuaba como diana de la CsA. El complejo formado por ambas inhibe a la proteína fosfatasa calcineurina, por lo que bloquea la activación de los linfocitos T en mamíferos. Posteriormente, se descubrió que también interviene en diversas funciones celulares como la inmunomodulación, la regulación de la señalización celular, la regulación transcripcional y el tráfico y plegamiento de proteínas^{20, 23}. Por otra parte, también puede ser secretada por las células bajo estímulos inflamatorios como hipoxia, infecciones o estrés oxidativo. Esta forma secretada puede mediar la comunicación intracelular, actuando como un factor autocrino o paracrino y regulando el crecimiento y la diferenciación celular^{20, 23}.

Debido a sus numerosas implicaciones en procesos celulares, esta proteína se ha asociado con numerosas enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, infecciones virales, envejecimiento y degeneración del sistema nervioso, entre otras^{19-20, 23}. De hecho, su forma intracelular estimula las señales proinflamatorias en las células endoteliales, en la musculatura lisa vascular y en macrófagos. En estos últimos actúa como un mediador en la producción de citocinas proinflamatorias al aportar estabilidad al complejo NFκB-p65, promover su translocación al núcleo y su consiguiente activación transcripcional, lo que resulta en la producción de IL-1β. Bajo estímulos inflamatorios, la IL-1β es capaz de inducir una cascada de señalización que conlleva el reclutamiento de mediadores inflamatorios como NFκB por la unión al receptor de interleucina 1, además de la producción de IL-6 y TNF-α. Sin embargo, aún no está claro el rol que desempeña la CypA en otras fases de la inflamación^{20, 23 24}. Además, tiene un potente efecto quimiotáctico en leucocitos, monocitos y linfocitos²⁰.

Una de las enfermedades donde la CypA desempeña un papel importante es la aterosclerosis, una patología caracterizada por la inflamación crónica de las paredes arteriales. En la Figura 8 se observa

como a medida que la aterosclerosis progresa, la inflamación y ROS promueven la liberación de la CypA por las células de la musculatura lisa vascular, las células endoteliales y los macrófagos.

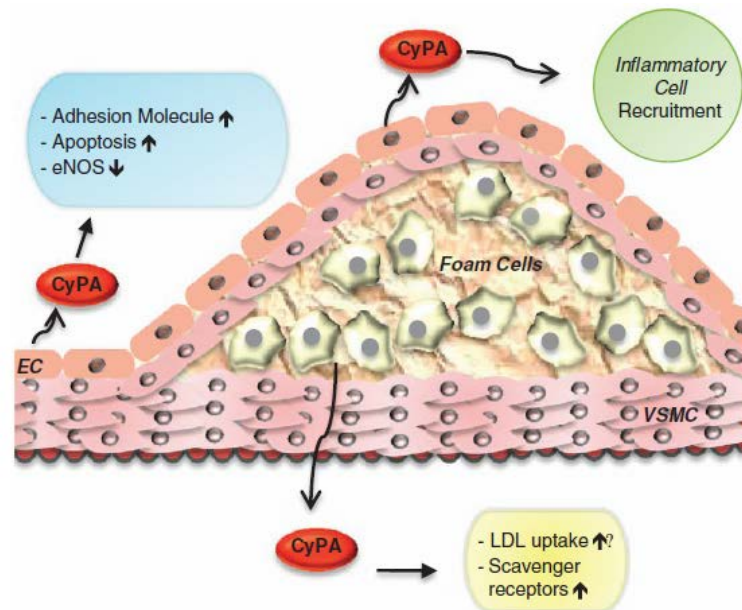


Figura 8. Implicación de la CypA en la aterosclerosis. Extraída de ²⁰.

En primer lugar, los estímulos inflamatorios y el consecuente estrés oxidativo provocan que la CypA estimule la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, lo que, sumado a la captación de lipoproteínas de baja densidad por los macrófagos, produce la conversión de los macrófagos a células espumosas. Esta conversión de los macrófagos provoca la formación e inestabilidad de la placa aterosclerótica^{20, 25}. Después, la forma extracelular de la CypA aumenta el crecimiento de las células de la musculatura lisa vascular al incrementar la síntesis de ácido desoxirribonucleico e inhibir su apoptosis, por lo que intensifica la inflamación. Por otro lado, la CypA liberada por las células espumosas incrementa la activación e inflamación de las células endoteliales disminuyendo la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial, y promoviendo su apoptosis. Además, la CypA extracelular estimula el reclutamiento de células inflamatorias a la pared vascular al aumentar la expresión de moléculas de adhesión (E-selectina, molécula de adhesión celular vascular 1), lo que cronifica la inflamación. Además, hay estudios que sugieren que la CypA puede tener un papel importante en otras fases de la aterosclerosis como la ruptura de la placa y trombosis²⁰.

1.4.2. Ciclofilina D

La ciclofilina D (CypD, del inglés “cyclophilin D”) es la única isoforma mitocondrial y regula el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP, del inglés “mitochondrial permeability transition pore”), un canal transitorio no específico dependiente de calcio que se abre bajo condiciones de estrés oxidativo (Figura 9)^{21, 26}.

1.5.2. Estudio por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

El estudio por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés “enzyme-linked immunosorbent assay”) se usa para cuantificar antígenos o anticuerpos y es simple, sensible, rápido, fiable y versátil. Dichas características son debidas al poder de los anticuerpos para reconocer un gran número de estructuras antigénicas, por lo que la aplicación del ELISA para la medición de analitos es casi ilimitada. Entre los analitos que se pueden medir se encuentran distintos mediadores inflamatorios como las citocinas, entre ellas la IL-10. Aunque existen varios tipos de ELISA, para detectar la IL-10 se ha usado el ELISA en sándwich. Este experimento consiste en la adición de un antígeno de captura que se inmoviliza en la placa, para posteriormente añadir la muestra a cuantificar con IL-10 y, por último, el anticuerpo de detección conjugado con una enzima (Figura 11). Entre cada paso del proceso de preparación del ELISA la placa se lava con una solución tampón para minimizar las uniones inespecíficas. Finalmente, la adición del sustrato produce una señal de color provocada por la acción de la enzima peroxidasa de rábano, lo que indica la presencia del antígeno buscado en la muestra. Para la cuantificación del antígeno se lleva a cabo la medida de la absorbancia, la cual es proporcional a la cantidad del mismo en la muestra³¹⁻³².

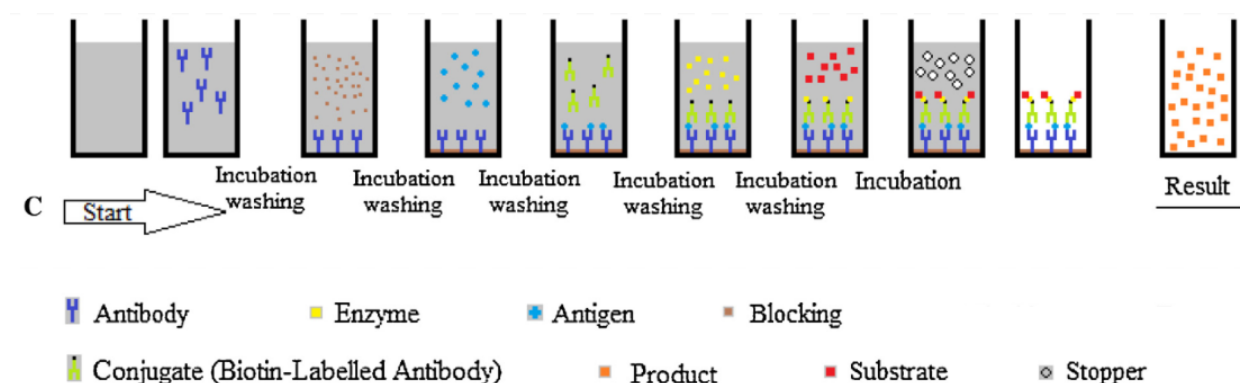


Figura 11. Proceso de realización de un ELISA en sándwich. Adaptada de ³².

1.6. Compuestos marinos con actividad antiinflamatoria

El océano cubre el 70% de la superficie del planeta y presenta una gran diversidad en cuanto a organismos y los productos naturales que éstos pueden producir. Estudios recientes estiman que las especies que habitan los océanos van desde las setecientas mil hasta el millón, pero a día de hoy, las estudiadas por sus posibles moléculas bioactivas representan sólo un pequeño porcentaje³³. Muchos organismos marinos son invertebrados, sésiles y sin defensas físicas, por lo que han desarrollado la habilidad de sintetizar compuestos o metabolitos que usan como defensa ante depredadores³⁴. Además de las moléculas con roles defensivos, las especies marinas producen una gran cantidad de compuestos que intervienen en la comunicación en el ambiente natural y que podrían tener bioactividades aplicables para la salud humana. Además, la biodiversidad de los productos marinos es mayor que la de los de

origen terrestre, lo que ha llamado la atención de numerosos investigadores y compañías para prevenir y tratar distintas patologías³³.

Entre 1965 y 1995, la prevalencia de las enfermedades relacionadas con el sistema inmune era de un 3,2%, mientras que actualmente se ha detectado un incremento, con un 7,6-9,4% de la población mundial afectada³⁵. La disfunción del sistema inmune lleva al desarrollo de desórdenes autoinmunes, alergias, inflamación crónica y cáncer. Esto ha promovido la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos de fuentes naturales con la capacidad de aumentar o suprimir la respuesta inmune a través de distintos programas de búsqueda y desarrollo de fármacos en todo el mundo. Entre esos compuestos se encuentran los antiinflamatorios y los inmunomoduladores, que se dividen en inmunoestimuladores e inmunosupresores. La inmunomodulación incluye procesos que tienen por objetivo modificar y/o regular la respuesta inmune por motivos terapéuticos³³.

Según la base de datos Marine Pharmacology, hay 15 fármacos derivados de compuestos marinos en el mercado, 6 en fase III, 17 en fase II y 10 en fase I de ensayos clínicos³⁶. Entre los compuestos marinos con aplicaciones terapéuticas se encuentran polisacáridos, alcaloides, polifenoles, esteroides, vitaminas, proteínas, péptidos, diferentes clases de lípidos, pigmentos, etc. Éstos son producidos por diferentes especies de hongos, bacterias, microalgas, macroalgas, esponjas, moluscos, corales y peces entre otros³³.

Uno de los productores de compuestos marinos con más importancia farmacéutica son las esponjas, ya que son el organismo más estudiado para el descubrimiento de nuevas moléculas²⁶. Para sobrevivir en los ecosistemas marinos, estos organismos producen una gran cantidad de metabolitos secundarios, que representan una abundante reserva de compuestos con actividades inmunomodulatorias, antiinflamatorias y anticancerígenas³³.

1.6.1. Furanoditerpenos de *Spongia (Spongia) tubulifera*

Las esponjas del género *Spongia* han sido ampliamente estudiadas debido a la gran variedad de compuestos bioactivos obtenidos de distintas especies. Se han descrito furanoterpenos, esteroides o macrólidos con actividades antiinflamatorias, antitumorales o antivirales³⁷.

Los furanoditerpenos 1-5 (Figura 12) se aislaron de la esponja *Spongia (Spongia) tubulifera*, recolectada en el Caribe Mexicano y han mostrado prometedoras propiedades relacionadas con la inflamación y el estrés oxidativo, que han sido protegidas por una patente^{26, 37-38}.

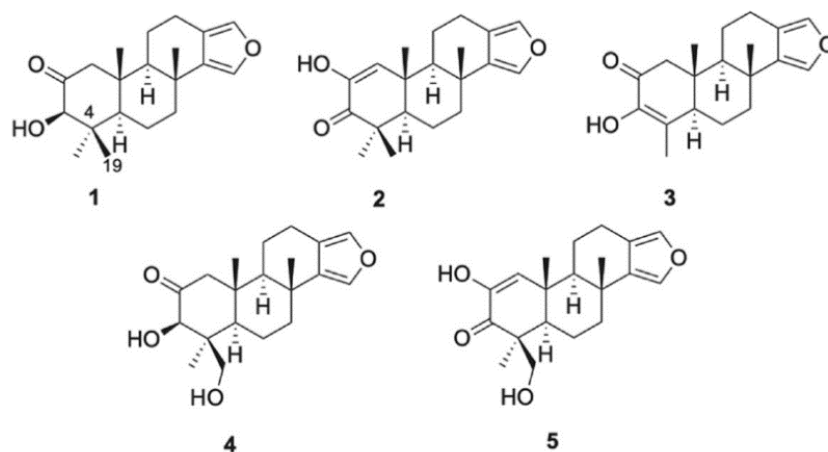


Figura 12. Estructuras químicas de los furanoditerpenos 1-5.

Hasta el momento, se ha testado la citotoxicidad de estos compuestos en distintas líneas celulares tumorales, en las que mostraron una escasa actividad tóxica, con concentraciones inhibitorias 50 en el rango micromolar. Asimismo, se ha descrito actividad antiviral para el compuesto 4, también denominado epispongiadiol^{26, 37, 39}. Por otro lado, se realizaron estudios en un modelo de estrés oxidativo en la línea neuronal humana SH-SY5Y, observándose una mejora en la supervivencia celular en presencia de los furanoditerpenos. La protección conferida por estos compuestos estaba mediada por su capacidad para reducir la concentración de ROS, debida principalmente a una mejora en la función mitocondrial²⁶.

Esta capacidad neuroprotectora de los metabolitos de *Spongia tubulifera* se debe a su inhibición de la Cyps, ya que reducen su expresión y se unen a las diferentes isoformas con distintas afinidades. En concreto, el compuesto 1 presenta afinidad selectiva por la CypA y es el único capaz de reducir su expresión intracelular. En cuanto al compuesto 4, tiene afinidad tanto por la CypA como por la CypD, pero solo reduce la expresión intracelular de la isoforma mitocondrial, produciendo además el bloqueo de la apertura del mPTP²⁶.

Debido a estas diferencias en la afinidad y selectividad por la Cyps A y D, se seleccionaron los furanoditerpenos 1 y 4 para testar su capacidad antiinflamatoria en una línea celular de macrófagos. La modulación de las distintas isoformas de Cyps permite estudiar la implicación de cada una de ellas en la respuesta inflamatoria, para así definir cuál de estas proteínas podría ser una diana de utilidad terapéutica para el tratamiento de patologías asociadas con la inflamación y el estrés oxidativo, como las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas²⁶.

2. Objetivos

La inflamación es un mecanismo fundamental para el mantenimiento de la homeostasis, sin embargo, bajo ciertas circunstancias puede descontrolarse y volverse crónica, alterando el correcto funcionamiento del organismo y pudiendo llegar a provocar distintas patologías. Las Cyps, especialmente la CypA, son proteínas que se han relacionado con la inflamación, pero se desconoce el papel exacto de cada isoforma debido a la escasez de compuestos con afinidad selectiva por cada una. Por tanto, su modulación con compuestos selectivos puede aportar nuevos datos sobre la función de cada Cyp en la respuesta inflamatoria. En este contexto, los objetivos de este TFG son:

- Estudiar la implicación de las Cyps A y D en la inflamación crónica utilizando dos moduladores selectivos, los furanoditerpenos 1 y 4
- Analizar la citotoxicidad de los furanoditerpenos 1 y 4 en la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7
- Determinar los efectos de los metabolitos de *Spongia (Spongia) tubulifera* en la respuesta inflamatoria y el fenotipo de los macrófagos mediante la medida de la liberación de NO y la IL-10

3. Material y métodos

3.1. Reactivos y soluciones

- Los furanoditerpenos 1 y 4 fueron proporcionados por el Prof. Carlos Jiménez, de la Universidad de A Coruña. Dichos metabolitos se obtuvieron de la esponja *S. tubulifera*, recogida en la costa del Caribe Mexicano²⁶. La solución stock de cada compuesto se preparó a 10 mM en DMSO y se mantuvo a -80 °C.
- La CsA (pureza >99%) se obtuvo en Abcam (Cambridge, Reino Unido). La solución stock se preparó a 20 mM en DMSO justo antes de cada experimento debido a su inestabilidad en disolución.
- El LPS se obtuvo en Merck (Madrid, España). La solución stock se preparó a 1 mg/mL en tampón fosfato estéril y se mantuvo a -20 °C.
- La saponina, toxina derivada de la planta *Quillaja saponaria* usada como control de muerte, se compró en Merck. Se preparó una solución stock a 40 mg/mL en agua Milli-Q estéril, que se mantuvo a -20 °C.
- El medio de cultivo celular utilizado para el mantenimiento de la línea celular fue el Eagle modificado de Dulbecco alto en glucosa (Thermo Fischer Scientific, Madrid, España).
- Solución de Locke: tampón usado para realizar los lavados del medio de cultivo en los pocillos de las placas y para disolver el MTT. La solución de Locke está compuesta por NaCl a 150 mM, NaHCO₃ a 3'6 mM, KCl a 5'6 mM, CaCl₂ a 1'3 mM, MgCl₂ a 1'0 mM, glucosa a 5'0 mM y HEPES a 10'0 mM, pH 7'2-7'4. Todos los reactivos se obtuvieron en Merck.
- Sodio dodecil sulfato: se preparó al 5% para disolver los cristales de formazán que se forman tras la reducción del MTT. Se obtuvo en Merck (pureza 98%).
- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT): sustrato de las enzimas oxidorreductasas dependientes de NADH o NADPH mitocondriales. Se obtuvo en Merck y se preparó a 500 µg/mL en solución de Locke.
- Reactivo de Griess: agente usado para determinar la concentración de nitrito. Está compuesto por sulfanilamida al 1% en ácido fosfórico al 2'5% y diclorhidrato de N-(1-naftil) etilenediamina al 0'1%. Todos los reactivos se obtuvieron en Merck.
- NaNO₂, utilizado para preparar la recta patrón usada para cuantificar la concentración de nitrito, e indirectamente de NO, en las muestras. La solución stock se preparó a 1 mM en agua MilliQ. El reactivo se compró en Merck.

3.2. Cultivo celular

La línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 se obtuvo de la colección americana de cultivos tipo, número TIB-71.

Las células se cultivaron en flasks tratados de 75 cm² en medio Eagle modificado de Dulbecco con 4'5 gramos de D-glucosa, sin piruvato, con glutamina a 2 mM, rojo fenol, 1% de solución antibiótica penicilina-estreptomina y 10% (v/v) de suero fetal bovino, en una atmósfera humidificada con 5% de dióxido de carbono, a 37°C. Se realizaron dos subcultivos celulares semanalmente.

3.3. Análisis de la viabilidad celular

Las células RAW 264.7 se sembraron en placas tratadas de 96 pocillos (Jet Biofil, Guangzhou, China) a una densidad de $7'5 \cdot 10^4$ células/pocillo. Tras 24 horas, se procedió al tratamiento con los compuestos. Las células se trataron con saponina a diferentes concentraciones (0'005, 0'01, 0'05, 0'1, 0'5 y 1 mg/mL), o con los furanoditerpenos 1 y 4 (0'001, 0'01, 0'1, 1 μ M) durante 24 horas. En el caso de los experimentos con metabolitos de la esponja, se incluyó un control con DMSO (el disolvente de las soluciones stock de los furanoditerpenos) a la concentración más alta utilizada. Después de la incubación, se testó la viabilidad de las células mediante el método MTT. En primer lugar, se realizaron tres lavados de los pocillos con el tampón de Locke. Después se les añadió MTT a 500 μ g/mL disuelto en dicho tampón. Para favorecer la penetración del MTT en las mitocondrias y, por lo tanto, la reacción enzimática en las células, se incubó la placa en un agitador a 300 revoluciones por minuto y 37°C durante 1 hora. Tras finalizar la hora de incubación, se lavó el exceso de MTT de los pocillos y se añadió sodio dodecil sulfato al 5% para disolver los cristales formazán y poder leer su absorbancia a 595 nm en un lector de placas (BioTek, Agilent Technologies, Santa Clara, EE UU). Los experimentos se realizaron por triplicado en tres réplicas independientes.

3.4. Medida de liberación de NO

Para determinar el efecto de los furanoditerpenos sobre la liberación de NO, un importante indicador de la inflamación, las células RAW 264.7 se activaron utilizando LPS. Las células se sembraron en placas tratadas de 24 pocillos (Jet Biofil) a $5 \cdot 10^5$ células/pocillo en medio de cultivo sin rojo fenol. Tras 24 horas, se pretrataron con los compuestos 1 y 4 (0'001, 0'01, 0'1, 1 μ M) durante 1 hora. Pasada esa hora, las células se activaron con LPS (1 μ g/mL) durante 24 horas⁴⁰. Como control antiinflamatorio se utilizó la CsA a 1 μ M. Pasadas las 24 horas de incubación, se transfirieron 150 μ L del sobrenadante de la placa de 24 pocillos a una placa de 96 pocillos para realizar la medición. Para cuantificar los niveles de nitrito se utilizó el método de Griess, por lo que se añadieron 50 μ L de reactivo de Griess a cada pocillo, y se realizó una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se midió la

absorbancia a 546 nm en un lector de placas (BioTek). Para cuantificar el nitrito liberado por las células, se realizó una recta patrón con nitrito de sodio a distintas concentraciones (100, 80, 60, 40, 20, 10,1 y 0 μ M). Los experimentos se realizaron por triplicado en tres réplicas independientes.

3.5. Determinación de los niveles de IL-10

Para medir los niveles de la citocina antiinflamatoria IL-10, las células RAW 264.7 se sembraron en placas de 24 pocillos, tal como se describió para la cuantificación de NO. Tras 24 horas, las células se pretrataron con los furanoditerpenos 1 y 4 (0'001, 0'01, 0'1, 1 μ M) durante 1 hora. Pasada esa hora, las células se estimularon con LPS (1 μ g/mL) durante 24 horas. A continuación, se retiró el sobrenadante, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, y se conservó a -80 °C hasta su análisis.

La cuantificación de los niveles de IL-10 se realizó usando un kit ELISA para ratón (Thermo Fisher Scientific), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los estudios se realizaron por duplicado en tres réplicas independientes.

3.6. Análisis estadístico

Los datos se expresan como media \pm SEM (error estándar de la media, del inglés "standard error of the mean") de tres réplicas realizadas de forma independiente. Las diferencias estadísticas entre grupos se determinaron mediante el test One-way ANOVA seguido del test post-hoc de Dunnett's. El nivel de significación estadística se consideró en 0'05 ($p < 0'05$). Los análisis se realizaron con el software GraphPad v8.0 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, EE UU).

4. Resultados y discusión

4.1. Resultados

4.1.1. Estudio de la viabilidad de macrófagos murinos tratados con saponina

Antes de comenzar los estudios de viabilidad con los furanoditerpenos, fue necesario establecer un control de muerte como referencia con la que poder comparar la viabilidad de las células tras ser tratadas con los compuestos. Se eligió como control de muerte el compuesto saponina, una toxina obtenida de la corteza de la planta *Quillaja saponaria*. Además, se utilizó este compuesto para determinar el tiempo de incubación y la densidad de células adecuada para realizar los estudios con los compuestos. Los macrófagos se trataron con diferentes concentraciones de saponina (0, 0'005, 0'01, 0'05, 0'1, 0'5 y 1 mg/mL) y se dejaron incubando 24 horas. Para comprobar que la toxicidad no se debía al disolvente utilizado (agua MilliQ), en este caso se trataron los controles con la concentración más alta empleada (2'5%).

Tras las 24 horas de incubación, se realizó el ensayo de viabilidad celular MTT. La viabilidad celular se define como el número de células vivas en una cierta población, por lo que el número de células viables se usa como un indicador de vida o muerte para testar la acción de fármacos o compuestos químicos. Un fármaco puede tener efectos citotóxicos o citostáticos, es decir, ser tóxico y matar células o inhibir el crecimiento celular, respectivamente. Por lo tanto, se necesitan estudios de proliferación celular y citotoxicidad para determinar la viabilidad de las células tratadas⁴¹. El ensayo MTT se basa en la conversión del MTT a cristales de formazán insolubles por la acción las enzimas oxidorreductasas mitocondriales dependientes de NADH o NADPH. En condiciones normales, estas enzimas tienen la capacidad de realizar dicha reacción. Por lo tanto, este ensayo nos permite relacionar la actividad mitocondrial con la viabilidad celular. Así, una mayor actividad mitocondrial estará relacionada con una mayor cantidad de cristales de formazán, los cuales se cuantifican midiendo su absorbancia. De este modo, una mayor absorbancia a 570 nm indica un mayor número de células vivas debido a que su capacidad metabólica está intacta. Es decir, las células viables poseen un mayor ratio de conversión de MTT, mientras que las células muertas o con un crecimiento limitado muestran niveles menores en su reducción⁴¹⁻⁴².

La Figura 13 muestra los resultados obtenidos tras el tratamiento con saponina. Al ser una toxina, la saponina afecta de forma negativa al metabolismo de las células, lo que se ve reflejado en una menor acción de las enzimas mitocondriales que transforman el MTT a cristales de formazán.

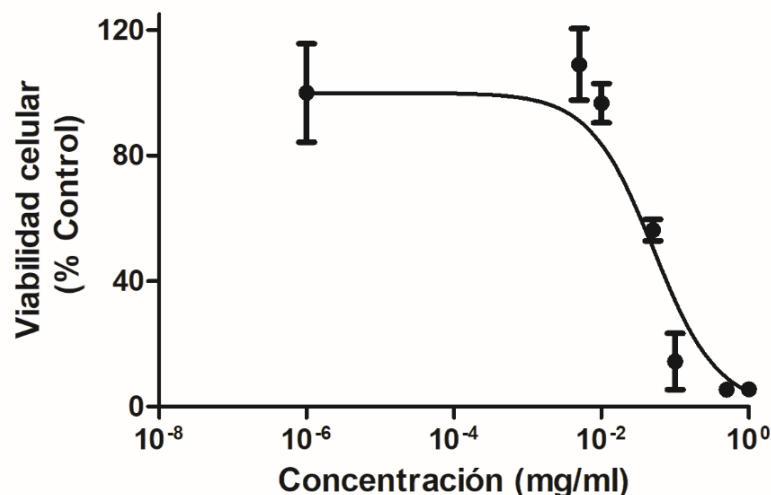


Figura 13. Curva dosis-respuesta del efecto de la saponina sobre la viabilidad de macrófagos murinos. La viabilidad celular de la línea RAW 264.7 se calculó como porcentaje del control. Los valores que se representan son la media \pm SEM de tres réplicas realizadas por triplicado.

La viabilidad de los macrófagos no disminuyó con las concentraciones más bajas (0'005 y 0'01 mg/mL). Sin embargo, al aplicar una concentración de 0'05 mg/mL de saponina, se produjo un descenso drástico de la viabilidad celular. Este descenso se acrecentó hasta alcanzar prácticamente la muerte total de las células con las concentraciones de saponina de 0'1, 0'5 y 1 mg/mL. En consecuencia, se eligió la concentración de 1 mg/mL como control de muerte.

4.1.2. Estudio de la viabilidad de macrófagos murinos tratados con furanoditerpenos derivados de esponjas marinas

Una vez establecida la concentración de saponina a utilizar como control de muerte, la densidad celular adecuada y el tiempo de incubación, se testó el efecto de los furanoditerpenos en la viabilidad celular de la línea RAW 264.7. Para ello, se usó el método MTT y se siguió el mismo protocolo que en el ensayo anterior, pero en este caso se trató las células con los compuestos 1 y 4 a las concentraciones de 0'001, 0'01, 0'1 y 1 μ M durante 24 horas. Tal como se estableció anteriormente, se utilizó como control de muerte el tratamiento con saponina a 1 mg/mL. De nuevo, para determinar si el disolvente de las soluciones de los compuestos (DMSO) producía citotoxicidad, éste se añadió como control al 0'05%, la concentración más alta utilizada, observándose que no afectaba a la viabilidad celular.

Como se puede observar en la Figura 14, ni el furanoditerpeno 1 ni el 4 afectaron significativamente a la viabilidad de los macrófagos murinos. En el caso del compuesto 1, sólo a 0'1 μ M se produjo un leve descenso de la viabilidad celular, siendo este inferior al 10% (Figura 14a). Por otro lado, el compuesto 4 sólo disminuyó en un 5% la viabilidad de los macrófagos a 0'1 μ M. Además, a las concentraciones de

0'001 y 1 μM se produjo un ligero aumento en la viabilidad celular, siendo este más notorio a 0,001 μM (Figura 14b).

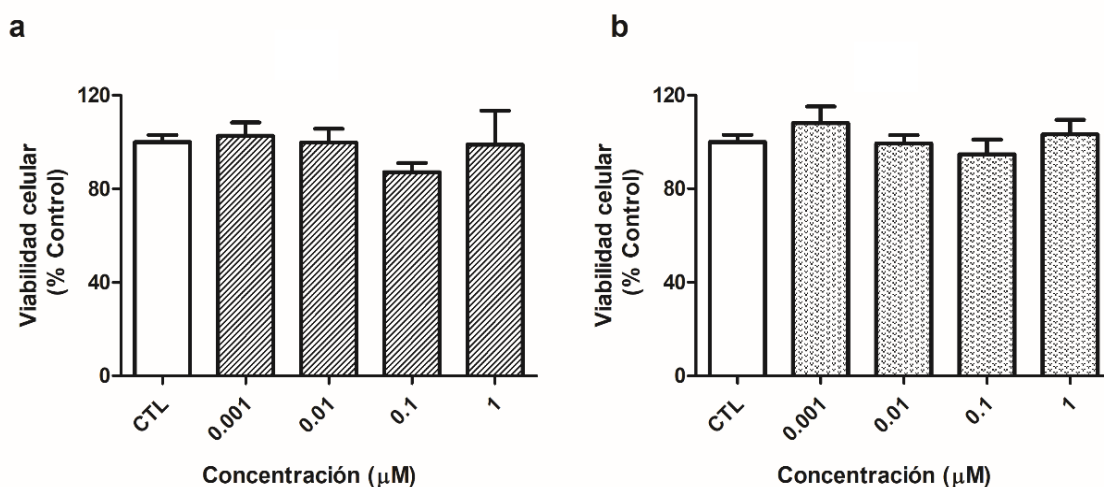


Figura 14. Efecto de los compuestos de *S.tubulifera* sobre la viabilidad celular. Las células RAW 264.7 se trataron durante 24 horas con los furanoditerpenos y su citotoxicidad se analizó con el ensayo MTT. (a) Viabilidad celular de macrófagos murinos tras ser tratadas con el compuesto 1, (b) viabilidad celular tras ser tratadas con el compuesto 4. Los resultados se expresan en porcentaje del control de DMSO (0'05%). Los valores representados son la media \pm SEM de tres réplicas en las que se llevaron a cabo triplicados.

4.1.3. Estudio del efecto de los furanoditerpenos en la respuesta inflamatoria de macrófagos murinos

Una vez demostrado que los furanoditerpenos no presentaban efectos citotóxicos en la línea celular RAW 264.7, se evaluó su implicación en la respuesta proinflamatoria mediante la medida de liberación del NO y en la respuesta antiinflamatoria a través de la cuantificación de los niveles de IL-10. Con este objetivo, los macrófagos se pretrataron con los compuestos (0'001, 0'01, 0'1 y 1 μM) durante 1 hora y se activaron con la toxina LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 horas. Dicha toxina procede de la membrana externa de bacterias gran negativas y produce la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo proinflamatorio o M1, lo que permite analizar los efectos de distintos fármacos⁴³.

En primer lugar, se cuantificó la liberación del NO mediante el método de Griess, que mide los niveles de nitrito en el medio extracelular, por lo que permite determinar indirectamente la liberación del gas¹⁵⁻¹⁶. El efecto de los furanoditerpenos 1 y 4 sobre los niveles de NO se representa en la Figura 15. Se puede observar que la liberación de NO en condiciones fisiológicas es nula. Sin embargo, al someter a los macrófagos a LPS, se activan las vías proinflamatorias, lo que genera una gran producción de NO.

En el caso del furanoditerpeno 1, su presencia provocó la disminución de la liberación de NO a todas las concentraciones, siendo mayor a 0'001 y 0'01 μM , aunque estos resultados no son estadísticamente significativos. No obstante, su acción en la disminución de NO no fue tan potente como la de la CsA a 1 μM , utilizada como control positivo (Figura 15a).

Por su parte, el furanoditerpeno 4 provocó una disminución de la liberación del NO de forma dosis-dependiente, en la que la concentración de NO fue menor cuanto mayor era la concentración del compuesto. Asimismo, los resultados fueron significativos a 0'1 y 1 μM ($p < 0'05$), con una reducción del 50% a la concentración más alta en comparación con el control de LPS. Además, a esa misma concentración, la disminución de NO fue cercana a la provocada por la CsA a 1 μM (Figura 15b).

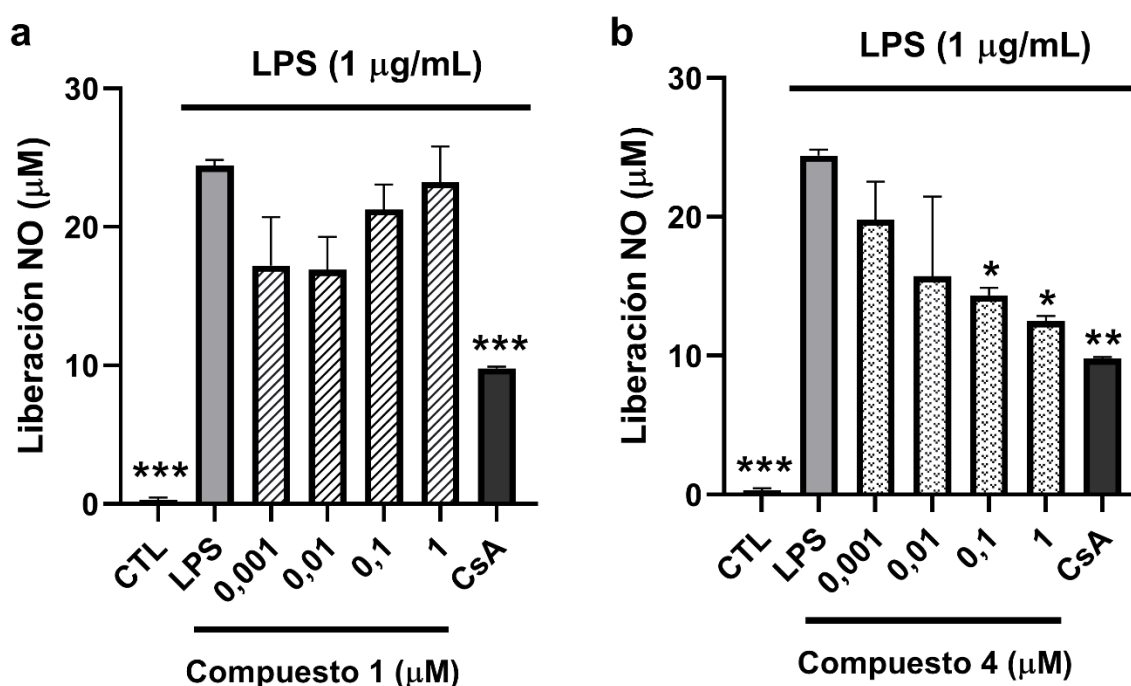


Figura 15. Efectos de los furanoditerpenos 1 y 4 en la liberación de NO en la línea celular RAW 264.7. Se trató a las células con distintas concentraciones de los compuestos durante 1 hora, seguido de la estimulación con LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 horas. La CsA (1 μM) se utilizó como control positivo. (a) Liberación de NO tras someter a los macrófagos murinos a un tratamiento con el furanoditerpeno 1, (b) Niveles de NO tras el tratamiento con el furanoditerpeno 4. Los resultados se expresan en μM y son la media \pm SEM de tres réplicas realizadas por triplicado. El análisis estadístico se realizó con la prueba One Way ANOVA seguido del test post hoc de Dunnett (* $p < 0'05$, ** $p < 0'01$, *** $p < 0'001$, comparados con el control de LPS)

A continuación, se cuantificó la liberación de la citocina antiinflamatoria IL-10 para analizar si los compuestos tenían capacidad de modular el fenotipo de los macrófagos. Para ello se utilizó un ELISA en

sándwich tras pretratar las células de la línea RAW 264.7 con los compuestos 1 y 4 (0'001, 0'01, 0'1 y 1 μ M) durante una hora y posteriormente someterlas a LPS (1 μ g/mL) durante 24 horas.

Los resultados sobre la liberación de IL-10 se presentan en la Figura 16 tanto para el furanoditerpeno 1 como para el 4. Se puede observar que la liberación de IL-10 bajo condiciones fisiológicas es muy baja. El furanoditerpeno 1 a la concentración más alta (1 μ M) incrementó de forma significativa la liberación de IL-10 al compararlo con el tratamiento con LPS solo ($p < 0'05$). Sin embargo, al resto de concentraciones, la liberación de IL-10 fue más baja que en el control de LPS (Figura 16a).

En el caso del furanoditerpeno 4, a la concentración de 0'001 μ M se produce un ligero aumento en la liberación de IL-10, sin embargo, dicho incremento no es significativo. A 0'1 μ M la liberación de la citocina se mantiene igual que en el caso del tratamiento con LPS, mientras que a 0'01 y 1 μ M la liberación disminuye (Figura 16b).

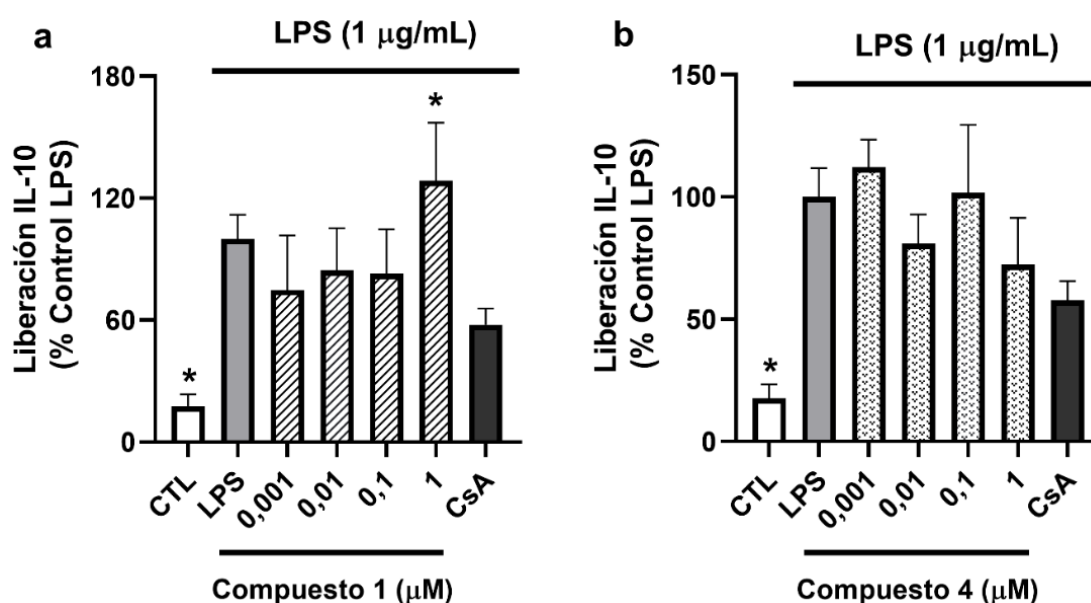


Figura 16. Efectos de los furanoditerpenos 1 y 4 en la liberación de IL-10 en la línea celular RAW 264.7. Se trató a las células con distintas concentraciones de los compuestos durante 1 hora y después se las sometió a LPS (1 μ g/mL) durante 24 horas. La CsA a 1 μ M se utilizó como control positivo. (a) Liberación de IL-10 tras someter a los macrófagos murinos a un tratamiento con el furanoditerpeno 1, (b) liberación de IL-10 tras tratar con el furanoditerpeno 4 a los macrófagos murinos. Los valores representados son la media \pm SEM de tres réplicas en las que se llevaron a cabo triplicados. El análisis estadístico se realizó con la prueba One Way ANOVA seguido del test post hoc de Dunnett ($*p < 0'05$, comparado con el control de LPS)

4.2. Discusión

Los macrófagos tienen un amplio rango de TLRs en la membrana citoplasmática que les permiten expresar una gran gama de proteínas, incluidas citocinas y quimiocinas, en respuesta a diferentes estímulos patogénicos. El LPS es un PAMP encontrado en las paredes de las bacterias Gram-negativas que activa la respuesta inflamatoria al unirse al TLR CD14 de los macrófagos. Cuando CD14 se activa, promueve la fosforilación del complejo IKK2, lo que a su vez conlleva la fosforilación y posterior degradación de I κ B por el proteasoma. En consecuencia, I κ B deja de ejercer su acción represora sobre NF- κ B, el cual actúa como un factor de transcripción y activa efectores proinflamatorios como la IL-1 β , el TNF- α o el IFN- γ . Esas citocinas proinflamatorias activan la transcripción de iNOS, lo que provoca la producción de NO, que interviene en la amplificación del proceso proinflamatorio^{8, 18}. Además, los numerosos mediadores proinflamatorios activados por NF- κ B también estimulan la producción de ROS en la mitocondria, lo que da lugar a la apertura del mPTP mediada por la CypD, la consiguiente liberación de más ROS y la expresión de la CypA, lo que exacerba todavía más la respuesta inflamatoria. Este proceso contribuye a la perpetuación del bucle de retroalimentación positiva de la inflamación, que aumenta la producción de NO²².

En este sentido, los resultados obtenidos muestran que el compuesto 1 no disminuyó de forma significativa la concentración de NO, pero sí aumentó la liberación de IL-10 a 1 μ M. El furanoditerpeno 1 sólo presenta afinidad por la CypA, por lo que se une a ella de forma específica. Además, la presencia de este compuesto inhibe la expresión de la CypA en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y²⁶. Por tanto, este metabolito de *S.tubulifera* podría ejercer sus efectos al inhibir la unión de la CypA a sus dianas, como p65, una proteína de NF- κ B que ante estímulos inflamatorios promueve la actividad de la IL-1 β , lo que explicaría el descenso de concentración del NO observado tras el tratamiento con este compuesto²⁴. Este efecto podría explicar resultados anteriores con este mismo compuesto, ya que se había observado que el tratamiento con el furanoditerpeno 1 disminuye la expresión de la CypD en la línea celular SH-SY5Y, lo que sugería la unión del compuesto con algún modulador de la proteína²⁶. Recientemente se ha demostrado que p65 también es un regulador transcripcional de la CypD, por lo que la unión directa del furanoditerpeno 1 con la CypA conllevaría la inhibición de la unión de CypA a p65, lo que disminuiría su traslocación al núcleo y, por tanto, la transcripción de la CypD^{24, 28}. Por otra parte, el aumento de la liberación de IL-10 producido por este compuesto puede parecer incongruente. Sin embargo, este fenómeno puede explicarse por la existencia de un fenotipo de macrófagos conocido como M2b, el cual se diferencia del fenotipo M2 clásico por la liberación de mediadores proinflamatorios, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 y NO. Este fenotipo interviene en la expresión de distintos perfiles de citocinas que controlan la intensidad de la respuesta inmune y la reacción inflamatoria^{9, 44}. Además, se ha relacionado la activación de la vía de señalización PI3K/Akt con la transición de los

macrófagos del fenotipo M1 al M2b, donde se observa un aumento en la liberación de IL-10 y en la expresión de iNOS y, por lo tanto, de NO⁴⁵. Este patrón concuerda con los resultados encontrados tras el tratamiento con el furanoditerpeno 1: el mantenimiento del marcador del fenotipo inflamatorio (NO), y el aumento del marcador del fenotipo antiinflamatorio (IL-10). Asimismo, como el furanoditerpeno 1 se une a la CypA e inhibe sus funciones, parece que la inhibición de esta Cyp está asociada con la transición al fenotipo M2b de los macrófagos en lugar del M2 clásico. Esto podría deberse al posible papel de la CypA en la resolución de la respuesta inflamatoria donde degrada pro-IL-1 β redundante ²⁴. Es decir, la inhibición de la CypA en la fase de resolución de la inflamación no permitiría que la pro-IL-1 β fuese degradada y, por lo tanto, seguiría activando mediadores inflamatorios como el NO, lo que no permitiría su disminución de un modo más efectivo.

Por otro lado, el furanoditerpeno 4 disminuyó la liberación de NO a todas sus concentraciones y no aumentó los niveles de IL-10 de forma significativa. Este compuesto se une a ambas Cyps y parece producir efectos diferentes²⁶. Por una parte, la unión a la CypD impediría la apertura del poro, lo que no permitiría la liberación de ROS, lo que a su vez impediría la perpetuación del ciclo de producción de mediadores de la inflamación, como el NO²². Por otra parte, su capacidad de unión a la CypA impediría los efectos proinflamatorios de p65²⁸. El hecho de que el compuesto se una a ambas Cyps podría explicar su efecto más potente y dosis-dependiente, ya que al tener más dianas necesitaría más concentración para poder ocuparlas todas. Además, podría interpretarse como que la inhibición de ambas Cyps imposibilita el cambio al fenotipo M2 por algún mecanismo desconocido o que quizás este débil aumento podría deberse a que los macrófagos se encontraban iniciando el cambio de fenotipo, por lo que podría ser interesante repetir el experimento y cuantificar la IL-10 a las 48 horas. En consecuencia, a las 24 horas, este compuesto inhibe la señalización inflamatoria, pero no promueve el cambio hacia el fenotipo M2, con lo que no estaría contribuyendo a la reparación de los tejidos dañados.

El menor potencial del furanoditerpeno 1 en comparación con el 4 en la disminución de los niveles de NO podría explicarse por su ausencia de unión a la CypD²⁶. La unión del compuesto 4 a la CypD impide la apertura patológica del poro mitocondrial, lo que no permite la liberación de ROS. Como el aumento de ROS está asociado a la expresión de la CypA y, por lo tanto, al resto de mediadores inflamatorios como el NO, este bloqueo de la liberación de ROS podría finalizar el bucle de retroalimentación característico de la inflamación crónica^{20, 22, 26}. Entonces, la inhibición de la CypD sumado a la inhibición de la CypA podría dar lugar a una acción sinérgica de ambas, lo que explicaría la mayor actividad del furanoditerpeno 4. Por otro lado, el cambio de fenotipo provocado por el furanoditerpeno 1 podría deberse por la inhibición única de la CypA, ya que parece estar asociada con la polarización al fenotipo M2b por su diferente implicación en las distintas fases de la inflamación, al contrario que con el furanoditerpeno 4, que inhibe ambas Cyps.

Asimismo, la diferencia en las actividades de los furanoditerpenos podría estar relacionada con su estructura. Si se observan las estructuras del furanoditerpeno 1 (Figura 17) y del furanoditerpeno 4 (Figura 18) se puede apreciar como su única diferencia estructural reside en el grupo hidroxilo (-OH) del carbono 19. Es ese grupo el que les confiere sus distintas afinidades a las Cyps y, en consecuencia, su ausencia en el furanoditerpeno 1 provoca la selectividad por la CypA y ausencia de unión a la CypD.

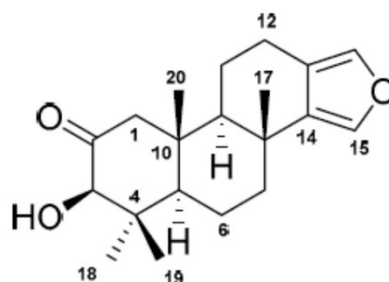


Figura 17. Estructura del furanoditerpeno 1.

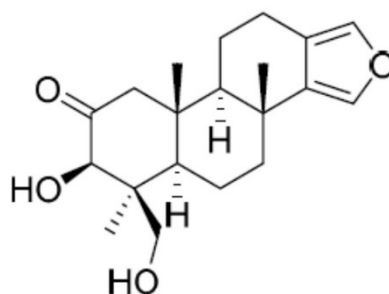


Figura 18. Estructura del furanoditerpeno 4.

En definitiva, el compuesto 1 parece ser más interesante si lo que se busca es provocar un cambio de fenotipo de los macrófagos hacia su fenotipo M2, en concreto M2b. Por su parte, el compuesto 4 presenta mejores características si lo que se pretende es disminuir los marcadores inflamatorios, pero no ayudar a la recuperación de tejido dañado. Además, estos resultados confirman la importancia de las Cyps A y D en la inflamación, por lo que su modulación podría ser de gran interés para abordar nuevas estrategias terapéuticas en enfermedades con base inflamatoria que hoy en día no tienen cura, como la enfermedad de Alzheimer o la aterosclerosis.

4. Conclusiones

1. Los furanoditerpenos 1 y 4 no afectan a la viabilidad de la línea celular de macrófagos RAW 264.7
2. El furanoditerpeno 1, que se une selectivamente a la CypA, aumenta la liberación de la IL-10 y disminuye ligeramente los niveles de NO
3. El furanoditerpeno 4, que se une a las Cyps A y D, disminuye los niveles de NO, pero no afecta a la citocina antiinflamatoria IL-10
4. El furanoditerpeno 1 presenta capacidad inmunomoduladora, ya que polariza a los macrófagos hacia el fenotipo M2, mientras que el furanoditerpeno 4 bloquea la respuesta inflamatoria
5. La modulación de las Cyps A y D afecta a la regulación de la inflamación en macrófagos, por lo que estas proteínas podrían ser nuevas dianas terapéuticas para enfermedades con base inflamatoria

6. Bibliografía

1. Pawelec, G.; Goldeck, D.; Derhovanessian, E., Inflammation, ageing and chronic disease. *Curr Opin Immunol* **2014**, *29*, 23-8.
2. Antonelli, M.; Kushner, I., It's time to redefine inflammation. *FASEB J* **2017**, *31* (5), 1787-1791.
3. Okin, D.; Medzhitov, R., Evolution of inflammatory diseases. *Curr Biol* **2012**, *22* (17), R733-40.
4. Arulsevan, P.; Fard, M. T.; Tan, W. S.; Gothai, S.; Fakurazi, S.; Norhaizan, M. E.; Kumar, S. S., Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxid Med Cell Longev* **2016**, *2016*, 5276130.
5. Qu, L.; Matz, A. J.; Karlinsey, K.; Cao, Z.; Vella, A. T.; Zhou, B., Macrophages at the Crossroad of Meta-Inflammation and Inflammaging. *Genes (Basel)* **2022**, *13* (11).
6. Marchi, S.; Guilbaud, E.; Tait, S. W. G.; Yamazaki, T.; Galluzzi, L., Mitochondrial control of inflammation. *Nat Rev Immunol* **2023**, *23* (3), 159-173.
7. Ajith, T. A., Macrophage Polarization: An Ideal Therapeutic Strategy Remains to be Explored in Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Journal of Advanced Health Research & Clinical Medicine* **2024**, *1* (1), 3-12.
8. Ni, R.; Jiang, L.; Zhang, C.; Liu, M.; Luo, Y.; Hu, Z.; Mou, X.; Zhu, Y., Biologic Mechanisms of Macrophage Phenotypes Responding to Infection and the Novel Therapies to Moderate Inflammation. *Int J Mol Sci* **2023**, *24* (9).
9. Dash, S. P.; Gupta, S.; Sarangi, P. P., Monocytes and macrophages: Origin, homing, differentiation, and functionality during inflammation. *Heliyon* **2024**.
10. Kawai, T.; Akira, S. In *TLR signaling*, Seminars in immunology, Elsevier: 2007; pp 24-32.
11. Dorrington, M. G.; Fraser, I. D., NF- κ B signaling in macrophages: dynamics, crosstalk, and signal integration. *Frontiers in immunology* **2019**, *10*, 443978.
12. Saha, S.; Buttari, B.; Panieri, E.; Profumo, E.; Saso, L., An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation. *Molecules* **2020**, *25* (22), 5474.
13. Saraiva, M.; Vieira, P.; O'garra, A., Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *Journal of Experimental Medicine* **2019**, *217* (1), e20190418.
14. Xia, T.; Zhang, M.; Lei, W.; Yang, R.; Fu, S.; Fan, Z.; Yang, Y.; Zhang, T., Advances in the role of STAT3 in macrophage polarization. *Frontiers in immunology* **2023**, *14*, 1160719.
15. Sun, J.; Zhang, X.; Broderick, M.; Fein, H., Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors* **2003**, *3* (8), 276-284.
16. Bryan, N. S.; Grisham, M. B., Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med* **2007**, *43* (5), 645-57.

17. Förstermann, U.; Xia, N.; Li, H., Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation research* **2017**, *120* (4), 713-735.
18. Rath, M.; Müller, I.; Kropf, P.; Closs, E. I.; Munder, M., Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Frontiers in immunology* **2014**, *5*, 532.
19. Liao, Y.; Luo, D.; Peng, K.; Zeng, Y., Cyclophilin A: a key player for etiological agent infection. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2021**, *105*, 1365-1377.
20. Nigro, P.; Pompilio, G.; Capogrossi, M. C., Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death Dis* **2013**, *4* (10), e888.
21. Peterson, A. A.; Rangwala, A. M.; Thakur, M. K.; Ward, P. S.; Hung, C.; Outhwaite, I. R.; Chan, A. I.; Usanov, D. L.; Mootha, V. K.; Seeliger, M. A., Discovery and molecular basis of subtype-selective cyclophilin inhibitors. *Nature Chemical Biology* **2022**, *18* (11), 1184-1195.
22. Coluccino, G.; Muraca, V. P.; Corazza, A.; Lippe, G., Cyclophilin D in Mitochondrial Dysfunction: A Key Player in Neurodegeneration? *Biomolecules* **2023**, *13* (8).
23. Dawar, F. U.; Xiong, Y.; Khattak, M. N. K.; Li, J.; Lin, L.; Mei, J., Potential role of cyclophilin A in regulating cytokine secretion. *Journal of leukocyte biology* **2017**, *102* (4), 989-992.
24. Yang, W.; Bai, X.; Luan, X.; Min, J.; Tian, X.; Li, H.; Li, H.; Sun, W.; Liu, W.; Fan, W., Delicate regulation of IL-1 β -mediated inflammation by cyclophilin A. *Cell reports* **2022**, *38* (11).
25. Kong, P.; Cui, Z.-Y.; Huang, X.-F.; Zhang, D.-D.; Guo, R.-J.; Han, M., Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention. *Signal transduction and targeted therapy* **2022**, *7* (1), 131.
26. Alvarino, R.; Alfonso, A.; Pech-Puch, D.; Gegunde, S.; Rodriguez, J.; Vieytes, M. R.; Jimenez, C.; Botana, L. M., Furanoditerpenes from *Spongia* (*Spongia*) *tubulifera* Display Mitochondrial-Mediated Neuroprotective Effects by Targeting Cyclophilin D. *ACS Chem Neurosci* **2022**, *13* (16), 2449-2463.
27. Endlicher, R.; Drahotka, Z.; Štefková, K.; Červinková, Z.; Kučera, O., The mitochondrial permeability transition pore—Current knowledge of its structure, function, and regulation, and optimized methods for evaluating its functional state. *Cells* **2023**, *12* (9), 1273.
28. Yu, C.; Sautchuk, R.; Martinez, J.; Eliseev, R. A., Mitochondrial permeability transition regulator, cyclophilin D, is transcriptionally activated by C/EBP during adipogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **2023**, *299* (12).
29. Alam, M. R.; Baetz, D.; Ovize, M., Cyclophilin D and myocardial ischemia–reperfusion injury: a fresh perspective. *Journal of molecular and cellular cardiology* **2015**, *78*, 80-89.
30. Probes, M., Griess reagent kit for nitrite determination G-7921. Retrieved April **2003**, *13*, 2011.
31. Crowther, J., Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Molecular biotechnology handbook* **2008**, 657-682.

32. Aydin, S., A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* **2015**, *72*, 4-15.
33. Montuori, E.; de Pascale, D.; Lauritano, C., Recent Discoveries on Marine Organism Immunomodulatory Activities. *Mar Drugs* **2022**, *20* (7).
34. Gegunde, S.; Alfonso, A.; Alonso, E.; Alvarino, R.; Botana, L. M., Gracilin-Derivatives as Lead Compounds for Anti-inflammatory Effects. *Cell Mol Neurobiol* **2020**, *40* (4), 603-615.
35. Rubtsova, K.; Rubtsov, A. V.; Thurman, J. M.; Mennona, J. M.; Kappler, J. W.; Marrack, P., B cells expressing the transcription factor T-bet drive lupus-like autoimmunity. *The Journal of clinical investigation* **2017**, *127* (4), 1392-1404.
36. Marine Pharmacology. <https://www.marinepharmacology.org> (accessed 18/05/2024).
37. Pech-Puch, D.; Rodríguez, J.; Cautain, B.; Sandoval-Castro, C. A.; Jiménez, C., Cytotoxic furanoditerpenes from the sponge *Spongia tubulifera* collected in the Mexican Caribbean. *Marine drugs* **2019**, *17* (7), 416.
38. Botana, L. M.; Alfonso, A.; Alvarino, R.; Jimenez, C.; Rodriguez, J.; Pech-Puch, D. Furanoditerpenes for use in the prevention and/or treatment of diseases 2023.
39. Kohmoto, S.; Mcconnell, O. J.; Wright, A.; Cross, S., Isospongiadiol, a cytotoxic and antiviral diterpene from a Caribbean deep water marine sponge, *Spongia* sp. *Chemistry Letters* **1987**, *16* (9), 1687-1690.
40. Silva, J.; Alves, C.; Pinteus, S.; Susano, P.; Simões, M.; Guedes, M.; Martins, A.; Rehfeldt, S.; Gaspar, H.; Goettert, M., Disclosing the potential of eleganolone for Parkinson's disease therapeutics: Neuroprotective and anti-inflammatory activities. *Pharmacological Research* **2021**, *168*, 105589.
41. van Meerloo, J.; Kaspers, G. J.; Cloos, J., Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol* **2011**, *731*, 237-45.
42. Adan, A.; Kiraz, Y.; Baran, Y., Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr Pharm Biotechnol* **2016**, *17* (14), 1213-1221.
43. Rossol, M.; Heine, H.; Meusch, U.; Quandt, D.; Klein, C.; Sweet, M. J.; Hauschildt, S., LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Critical Reviews™ in Immunology* **2011**, *31* (5).
44. Shapouri-Moghaddam, A.; Mohammadian, S.; Vazini, H.; Taghadosi, M.; Esmaeili, S. A.; Mardani, F.; Seifi, B.; Mohammadi, A.; Afshari, J. T.; Sahebkar, A., Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of cellular physiology* **2018**, *233* (9), 6425-6440.
45. Zhao, X.; Dai, J.; Xiao, X.; Wu, L.; Zeng, J.; Sheng, J.; Su, J.; Chen, X.; Wang, G.; Li, K., PI3K/Akt signaling pathway modulates influenza virus induced mouse alveolar macrophage polarization to M1/M2b. *PloS one* **2014**, *9* (8), e104506.