

Tesis Doctoral

Mecanismos moleculares involucrados en la secreción de IL-1 β por los neutrófilos humanos

Gabelloni, María Laura

2012-03-09

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Gabelloni, María Laura. (2012-03-09). Mecanismos moleculares involucrados en la secreción de IL-1 β por los neutrófilos humanos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Gabelloni, María Laura. "Mecanismos moleculares involucrados en la secreción de IL-1 β por los neutrófilos humanos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012-03-09.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Mecanismos moleculares involucrados en la secreción de IL-1 β por los neutrófilos humanos

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área: **Ciencias Biológicas**

Lic. María Laura Gabelloni

Directora: Dra. Analía S. Trevani
Consejero de estudios: Dr. Omar Coso

Laboratorio de Inmunología Oncológica
Instituto de Medicina Experimental (IMEX) - CONICET
Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires

Buenos Aires, diciembre de 2011

Mecanismos moleculares involucrados en la secreción de IL-1 β por los neutrófilos humanos

La interleuquina-1 β (IL-1 β) es una citoquina proinflamatoria central en procesos fisiopatológicos, sintetizada como un precursor (proIL-1 β) que debe ser procesado proteolíticamente para la generación de su forma activa. En esta Tesis determinamos que los neutrófilos humanos altamente purificados liberan IL-1 β en respuesta a estímulos infecciosos como el lipopolisacárido (LPS) y estériles, como los cristales de urato monosódico (MSU), así como también frente al primado con LPS y posterior estimulación con ATP. Los efectos de inhibidores específicos y la capacidad de los agonistas de inducir la activación de la caspasa-1 sugirieron que la secreción de IL-1 β es dependiente de caspasa-1 y de las serinproteasas elastasa y/o proteinasa 3. Nuestros hallazgos realizados con neutrófilos de pacientes incapaces de activar a la enzima generadora de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) NADPH oxidasa, con una línea celular neutrofílica carente de actividad de esta enzima, y con un inhibidor específico de la misma, sugirieron que el evento de secreción de IL-1 β madura de la célula requiere de la actividad de la NADPH oxidasa. Sin embargo, el procesamiento de la proIL-1 β es regulado negativamente por los IRO, los cuales ejercen un efecto inhibitorio sobre la caspasa-1. Esta compleja regulación de la secreción de IL-1 β que depende del estado redox celular podría constituir un mecanismo fisiológico de control de procesos inflamatorios dependientes de IL-1 β donde el neutrófilo cumple un papel destacado.

Palabras clave: neutrófilo, IL-1 β , caspasa-1, inflamación, inmunidad innata, ATP, ácido úrico

Molecular mechanisms involved in IL-1 β secretion by human neutrophils

Interleukin-1 β (IL-1 β) is a major pro-inflammatory cytokine involved in pathophysiological processes. It is synthesized as a precursor (pro-IL-1 β) which must be cleaved to become biologically active. In this work we determined that highly purified human neutrophils release IL-1 β in response to infectious and sterile stimuli, like LPS or monosodium urate crystals, respectively, and also to LPS-priming plus ATP stimulation. By using specific inhibitors and monitoring caspase-1 activation induced by the above-mentioned agonists, we determined that IL-1 β secretion is dependent on caspase-1 and the serine-proteases elastase and/or proteinase-3. Our findings with neutrophils from patients lacking NADPH oxidase activity, as well as with both, a NADPH oxidase-deficient neutrophilic cell line and a specific inhibitor of this enzyme, showed that the event of mature IL-1 β release requires the activity of the NADPH oxidase. However, pro-IL-1 β processing is negatively regulated by reactive oxygen species, which inhibit caspase-1 activity. These findings show a complex redox regulation of IL-1 β secretion that could constitute a physiological mechanism to control IL-1 β -dependent inflammatory processes where neutrophils play a pivotal role.

Key words: neutrophil, IL-1 β , caspase-1, inflammation, innate immunity, ATP, uric acid

Agradecimientos

A Analía

A Jeremías

A Juan y a Flor

A Martus

A mis compañeros del laboratorio de Inmunología Oncológica

A mí familia
A Jeremías

Abreviaturas

BSO: butioninsulfoximina

DMF: dimetilformamida

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

EGC-X: Enfermedad granulomatosa crónica ligada al X

FITC: isotiocianato de fluoresceína

FSC: parámetro dispersión hacia adelante (*forward scatter*)

IL-1 β : Interleuquina-1 beta

IL-1Ra: Antagonista del receptor de IL-1

Ig: inmunoglobulina

IRO: Intermediarios reactivos del oxígeno

LPS: lipopolisacárido

NETs: trampas extracelulares de los neutrófilos

NF- κ B: factor nuclear κ B

NLR: Receptor tipo NOD (*Nod-like receptor*)

MLC: Microscopía Láser Confocal

MDP: muramildipéptido

MPO: mieloperoxidasa

MSU: (cristales de) urato monosódico

PAF: factor activador plaquetario

PE: ficoeritrina

PFA: paraformaldehído

PMA: ácido forbolmirístico

PMAP: patrones moleculares asociados a patógenos

PMAD: patrones moleculares asociados a daño

PR3: Proteinasa 3

RRP: Receptores de reconocimiento de patrones

RE: retículo endoplasmático

SOD: superóxido dismutasa

SSC: parámetro dispersión lateral (*side scatter*)

X/XO: Xantina-xantina oxidasa

Índice

Introducción	9
1. Rol de los neutrófilos en la respuesta inmune	12
1.1 Migración de los neutrófilos al foco inflamatorio	12
1.2 Mecanismos microbicidas de los neutrófilos	13
1.2.1 Mecanismos microbicidas independientes del oxígeno.....	13
1.2.2 Mecanismos microbicidas dependientes del oxígeno	15
1.2.3 Mecanismos microbicidas extracelulares: trampas extracelulares de neutrófilos .	20
1.3 Producción de citoquinas por los neutrófilos	21
2. Citoquinas de la familia de Interleuquina-1	23
2.1 Actividad biológica de IL-1 β	25
2.2 Procesamiento de IL-1 β	26
2.2.1 Mecanismo de procesamiento de IL-1 β dependiente de caspasa-1	27
2.2.2 Mecanismos de procesamiento de IL-1 β independientes de caspasa-1.....	34
2.2.3 Mecanismos de procesamiento de IL-1 β en los neutrófilos.....	35
2.3 Mecanismos propuestos para explicar la liberación de IL-1 β de las células.....	36
Objetivos	38
Materiales y Métodos	39
Purificación de neutrófilos humanos	40
Citometría de flujo	41
Líneas celulares	41
Determinación de la producción de IRO	42
Estimulación de los neutrófilos	42
Evaluación de la viabilidad celular	43
Detección de la IL-1 β intra- y extracelular por ELISA.....	43
Microscopía láser confocal.....	44
Determinación del porcentaje de células con caspasa-1 activada.....	45

Análisis por Western blot de IL-1 β y de NALP3	45
Análisis estadístico	46
Resultados	47
Los neutrófilos humanos producen y secretan IL-1 β cuando son estimulados con LPS o MSU, e incrementan la secreción de la misma cuando son tratados primero con LPS y luego estimulados con ATP o MSU	48
La liberación de IL-1 β por neutrófilos involucra la participación de caspasa-1	54
Participación de las proteasas del neutrófilo en la secreción de IL-1 β	57
Los IRO producidos por la NADPH oxidasa son requeridos para la liberación de IL-1 β por los neutrófilos	60
Los IRO también ejercen un rol regulatorio negativo sobre la liberación de IL-1 β por neutrófilos	67
Efecto de la IL-1 β liberada por los neutrófilos sobre la propia secreción de IL-1 β	73
Rol de los cambios en las concentraciones de potasio intracelular en el mecanismo que conduce a la liberación de IL-1 β	74
Discusión	79
Referencias	93

Introducción

La respuesta inflamatoria en el contexto del sistema inmune

Los seres vivos multicelulares habitan un ambiente poblado de agentes microbianos capaces de invadirlos, provocarles trastornos patológicos y eventualmente, su muerte. Como consecuencia de la fuerte presión ocasionada por los microorganismos infectantes, a lo largo de la evolución de los vertebrados fue seleccionado positivamente un sistema inmunológico altamente eficiente que involucra mecanismos innatos y adaptativos. La inmunidad adaptativa ejecuta respuestas dirigidas específicamente a entidades moleculares expresadas por cada patógeno (antígenos). Estas respuestas pueden ser de naturaleza humoral (dominadas por la producción de anticuerpos) o celular (con predominio de la acción de linfocitos T). La inmunidad innata, por otro lado, no sólo provee la primera línea de defensa del organismo, sino que además controla el inicio de las respuestas adaptativas y determina la naturaleza de la respuesta efectora a ponerse en marcha (1, 2).

La respuesta inflamatoria juega un rol principal en la defensa del huésped, siendo las infecciones los estímulos más importantes desencadenantes de inflamación. El sistema inmune innato reconoce a una vasta variedad de estructuras moleculares asociadas con los patógenos a través de un número limitado de moléculas conocidas como receptores de reconocimiento de patrones (RRP) (3, 4). Los ligandos de los RRP, llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP), se caracterizan por ser estructuras moleculares compartidas por grandes grupos de patógenos y por ser esenciales para la sobrevivencia o patogenicidad de los microorganismos. En consecuencia, los PMAP están muy conservados evolutivamente. Debido a que los PMAP están presentes en los patógenos pero ausentes en sus huéspedes, son determinantes para la discriminación entre lo propio y lo extraño (1). El reconocimiento del microorganismo invasor a través de este conjunto de receptores conduce al desarrollo de una serie orquestada de eventos que constituye la respuesta inflamatoria. Entre ellos se encuentra la liberación de quimioattractantes y moléculas vasoactivas, la secreción de citoquinas proinflamatorias y el reclutamiento de neutrófilos y monocitos, entre otros (5). A través

de estos mediadores, la inflamación cumple un papel crítico en la resolución o, en su defecto, en la contención de la infección.

Además de los PMAP, existe un conjunto de estímulos no infecciosos o estériles que también son capaces de inducir respuestas inflamatorias, entre los que podemos mencionar al trauma mecánico, la isquemia, algunos minerales, cristales y agentes químicos (6). Dentro de este grupo, algunos de los estímulos son endógenos y se encuentran asociados a daño tisular, por lo que son llamados patrones moleculares asociados a daño (PMAD) (6, 7). A pesar de que los estímulos inflamatorios estériles son muy diversos estructuralmente, existen cada vez más evidencias de que el sistema inmune innato puede reconocerlos a través de mecanismos comunes. Todos estos estímulos, sean infecciosos o no, llevan en última instancia a las mismas manifestaciones vasculares y celulares de inflamación, a pesar de que los eventos iniciales que las desencadenan sean diferentes (6).

Aunque la respuesta inflamatoria es esencial para la defensa del huésped, puede resultar un arma de doble filo. Los mecanismos efectores utilizados por el sistema inmune innato para erradicar a los microorganismos invasores son extremadamente potentes y pueden dañar de forma colateral a los tejidos del huésped. En el caso de infección, el daño tisular es aceptable si se busca contener una situación que pone en riesgo la vida del huésped. Además, como las infecciones suelen ser resueltas rápidamente por los propios mecanismos del sistema inmune, la duración de la respuesta inflamatoria y del daño tisular asociado a ella es limitada. Sin embargo, en los casos de inflamación estéril, como el estímulo *per se* no es perjudicial para el huésped, la relación costo-beneficio de montar una respuesta inflamatoria puede ser elevada (6).

1. Rol de los neutrófilos en la respuesta inmune

Los neutrófilos son células fagocíticas profesionales que forman parte del sistema inmune innato. En los humanos adultos estas células constituyen más de la mitad de los leucocitos circulantes y median las fases más tempranas de las respuestas inflamatorias. Ellos son actores claves en la defensa frente a infecciones causadas por bacterias y hongos, pero son también células inflamatorias cuya activación desmedida puede ocasionar un extenso daño de tejidos (8).

El rol crucial que desempeñan los neutrófilos en la inmunidad antiinfecciosa se pone en evidencia en pacientes que sufren desórdenes funcionales o numéricos de neutrófilos, tales como enfermedad granulomatosa crónica (EGC, detallada más adelante), deficiencia en la adhesión leucocitaria de tipo 1 (LAD1) o diversas formas de neutropenia, los cuales se caracterizan por padecer una severa susceptibilidad a infecciones de naturaleza bacteriana y fúngica que amenazan su sobrevivencia (9).

1.1 Migración de los neutrófilos al foco inflamatorio

Ante la presencia de estímulos proinflamatorios producidos como consecuencia de infecciones bacterianas o fúngicas o por daño tisular, el endotelio de los vasos que irrigan al tejido inflamado sufre modificaciones en el patrón de expresión de moléculas de adhesión. Este cambio constituye una señal que desencadena la adhesión de los neutrófilos al endotelio, los cuales posteriormente se extravasan en respuesta a sustancias quimiotácticas (8, 10). Estos acontecimientos ocurren en vasos donde el flujo sanguíneo es lento, como en las vénulas postcapilares o en los capilares pulmonares, y están favorecidos por la vasodilatación que acompaña a la inflamación. El proceso de extravasación comprende tres etapas muy bien definidas: (a) la etapa de adherencia transitoria o de *rolling* mediada por las selectinas, (b) la etapa de adherencia estable mediada por integrinas como LFA-1 (CD11a/CD18) y Mac-1 (CD11b/CD18), cuya activación es desencadenada por quimiocinas como la interleuquina-8 (IL-8) o por el factor activador plaquetario (PAF) inmovilizados a la cara luminal del endotelio vascular; y (c) la etapa de migración transendotelial (8). Durante la transmigración el neutrófilo se

deforma de manera notable, remodelando su citoesqueleto y extendiéndose en un pseudópodo para poder penetrar mediante movimientos ameboides entre las células endoteliales. En este pasaje la célula recibe estímulos de las células endoteliales inflamadas que modularán su actividad en el foco de infección. Tras atravesar la membrana basal, el neutrófilo se abre paso en el espacio intersticial siguiendo gradientes de quimioattractantes hasta llegar al foco infeccioso. Quimioattractantes como el C5a, el LTB₄, el PAF, los péptidos formilados y las quimiocinas, como la IL-8, cumplen un papel relevante en este proceso (11).

1.2 Mecanismos microbicidas de los neutrófilos

Una vez en el foco de infección, los neutrófilos reconocen a los organismos invasores a través de RRP o de receptores para componentes del complemento activado o para la porción Fc de las inmunoglobulinas G cuando el agente invasor se encuentra opsonizado. Este reconocimiento usualmente desencadena la fagocitosis del microorganismo (8, 12). Cuando el microorganismo es fagocitado, es sometido a dos sistemas microbicidas de distinta naturaleza: un sistema independiente de la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) y otro dependiente de los mismos (8). No obstante, el reconocimiento de los microorganismos también puede conducir al neutrófilo a liberar estructuras extracelulares constituidas por cromatina y proteínas granulares asociadas llamadas “trampas extracelulares de neutrófilos” o NETs (de *neutrophil extracellular traps*) (13), que atrapan al microorganismo y conducen a su destrucción extracelular.

1.2.1 Mecanismos microbicidas independientes del oxígeno

Los neutrófilos cuentan con un vasto número de péptidos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas para destruir a los microorganismos invasores. Los mismos se encuentran localizados en el interior de vesículas o gránulos citoplasmáticos, los cuales difieren en su contenido, en las proteínas que expresan en sus membranas y en su propensión a ser secretados (14). Estos gránulos pueden ser clasificados en función del contenido de la enzima mieloperoxidasa (MPO), en peroxidasa positivos y peroxidasa

negativos. Los primeros son los gránulos azurófilos o primarios, mientras que los peroxidasa negativos incluyen a los gránulos secundarios o específicos (definidos en función de su contenido de lactoferrina) y a los gránulos de gelatinasa (definidos por su alto contenido de gelatinasa, una metaloproteasa) (14). Existe un grupo adicional de gránulos conocidos como vesículas secretorias cuyo origen parece ser endocítico, debido a que su único contenido intravesicular conocido es el plasma. Estas vesículas constituyen estructuras intracelulares rápidamente movilizables y son particularmente importantes debido al alto contenido de receptores en sus membranas (14). La movilización de las vesículas secretorias ocasiona el aumento en la expresión de moléculas de adhesión y de receptores de quimioattractantes durante la extravasación del neutrófilo. De esta forma, el neutrófilo pasa de ser una célula generalmente pasiva, apropiada para la circulación, a una célula que presenta integrinas de tipo $\beta 2$ en superficie, altamente respondedora y preparada para la migración a los tejidos.

El resto de los gránulos de los neutrófilos también se fusiona con la membrana plasmática o con la membrana de la vacuola fagocítica bajo la acción de determinados estímulos que disparan la degranulación. Esta degranulación ocurre de manera secuencial y ordenada, y pareciera estar ajustada a los distintos roles que cumplen estas organelas en el tránsito del neutrófilo desde la circulación hasta el foco inflamatorio. Probablemente, la exocitosis de los gránulos de gelatinasa sea un requisito para la migración de los neutrófilos a través de la membrana basal, debido a que el colágeno tipo IV, principal constituyente de la membrana basal y el colágeno tipo V, de tejidos intersticiales, son sustratos de la gelatinasa (14). No obstante, la membrana de los gránulos de gelatinasa y la de los gránulos específicos estarían implicadas, además, en el desarrollo de mecanismos microbicidas debido a que son depósitos de Mac-1 (CD11b/CD18 o receptor del complemento 3) y del citocromo b558 (componente de membrana de la enzima NADPH oxidasa, descrita más adelante).

Los gránulos específicos poseen lactoferrina y la metaloproteasa colagenasa (MMP-8), entre otras proteínas. La lactoferrina (proteína que une hierro) posee un dominio N-terminal antimicrobiano que es liberado al ser cortado por la pepsina, mientras que la colagenasa es guardada en forma latente y es activada cuando los gránulos son liberados. Aun cuando se desconoce el mecanismo de activación, se ha demostrado que tanto el hipoclorito como las serinproteasas pueden activar a la colagenasa, la cual contribuiría a la

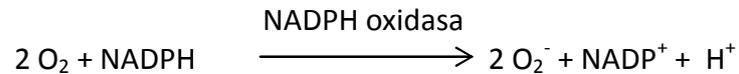
migración del neutrófilo en los tejidos merced a su capacidad de degradar colágeno tipo I (14).

Los gránulos azurófilos, por último, contienen gran parte de las proteínas antimicrobianas liberadas al fagolisosoma. Ellos contienen además de MPO, marcador de estos gránulos y participante fundamental en los mecanismos microbicidas dependientes del oxígeno, a la proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad (BPI). La BPI, merced a su capacidad de unirse a un fragmento N-terminal del LPS bacteriano, es una proteína relevante en la defensa frente a infecciones ocasionadas por bacterias Gram-negativas (8). Los gránulos azurófilos también contienen serinproteasas (llamadas así por la presencia de histidina, aspartato y serina en su sitio activo) como la catepsina G, la elastasa, la proteinasa 3 (PR3) y la azurocidina o CAP-37, enzimáticamente inactiva. La elastasa y la PR3 cortan a la elastina insoluble y a una variedad de proteínas de la matriz como fibronectina, laminina, vitronectina y colágeno tipo IV, y es por ello que más allá de su acción sobre los componentes de los microorganismos, están implicadas en el daño a tejidos inflamados. Su actividad debe ser estrictamente regulada por la acción de inhibidores intracelulares o extracelulares como la α -1-antitripsina y la α -2-macroglobulina, las cuales a su vez son inactivadas por los IRO producidos por la propia activación del neutrófilo. Por otra parte, *in vitro* se ha demostrado que tanto la catepsina G como la proteinasa 3 y la azurocidina poseen capacidad antimicrobiana independiente de su actividad enzimática contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, levaduras y hongos (8). La mayor parte de los gránulos azurófilos contienen también defensinas. Estos son péptidos antibióticos pequeños, altamente catiónicos, activos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas que actúan induciendo permeabilización de la membrana microbiana. Además de este papel antimicrobiano se les ha adjudicado la capacidad de regular el desarrollo de la respuesta inflamatoria al unirse a inhibidores de proteasas como la α -1-antitripsina y la α -1-antiquimotripsina (8).

1.2.2 Mecanismos microbicidas dependientes del oxígeno

En el neutrófilo, los IRO son generados por reducción parcial del oxígeno molecular mediante la activación del metabolismo oxidativo a través de un proceso que se denomina estallido respiratorio. Este proceso se inicia con la activación del complejo

enzimático de la NADPH oxidasa, que cataliza la reducción univalente del oxígeno molecular utilizando NADPH como dador de electrones (figura 1), según la siguiente reacción:



El anión superóxido (O_2^-) constituye el sustrato para todos los IRO producidos por el neutrófilo, incluyendo el peróxido de hidrógeno, los radicales libres, los halógenos oxidados, las cloraminas y el oxígeno singlete (15).

La enzima NADPH oxidasa comprende cinco componentes: tres de ellos están presentes como un complejo citosólico (p40^{phox}, p47^{phox} y p67^{phox}), mientras que dos (p22^{phox} y gp91^{phox}) están localizados en la membrana de las vesículas secretorias y de los gránulos específicos del neutrófilo como una flavohemoproteína heterodimérica conocida como citocromo b558. La separación física de sus componentes garantiza la inactividad de la enzima en condiciones en las que el neutrófilo se encuentra en reposo. Cuando la célula es estimulada por agonistas proinflamatorios, los componentes citosólicos se translocan a la membrana plasmática y a la membrana del endosoma naciente (a las cuales han contribuido con sus membranas las vesículas secretorias y los gránulos específicos), y se asocian al citocromo b558 generando una oxidasa activa.

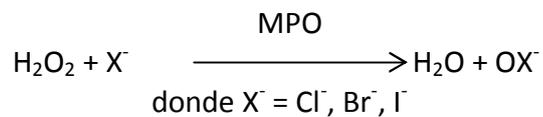
El O_2^- producido, aun cuando es capaz de reaccionar con un amplia variedad de sustratos biológicos, no cumpliría *per se* un papel relevante en las respuestas citotóxicas desarrolladas hacia microorganismos y/o células propias del huésped debido fundamentalmente a su escaso potencial oxidante y a su alta tasa de dismutación (16). Prácticamente todo el O_2^- generado sería dismutado a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en forma espontánea o enzimática por la superóxido dismutasa (SOD, figura 1) según la siguiente reacción:



El H_2O_2 es un oxidante capaz de ejercer efectos tóxicos profundos en distintos sistemas biológicos (16). No obstante, el propio fagocito posee sistemas detoxificantes

del H₂O₂ como la catalasa y/o la glutatión peroxidasa (16), que contribuyen a disminuir el daño oxidativo que pueda ocasionar la generación de peróxido de hidrógeno.

En consecuencia, otros IRO generados a expensas de reacciones posteriores que involucran al O₂⁻ y al H₂O₂ serían aquéllos relevantes en las respuestas citotóxicas mediadas por neutrófilos. Estos IRO incluyen a los oxidantes halogenados generados a través de la MPO, al oxígeno singlete y las cloraminas (16). La MPO es una hemoproteína presente en los gránulos azurófilos de los neutrófilos que se libera al fagolisosoma al fusionarse dichos gránulos en respuesta a distintos estímulos inflamatorios. Esta enzima cataliza la oxidación de haluros (Cl⁻, Br⁻ y/o I⁻) por el H₂O₂, generando aniones hipohalitos (figura 1) según la siguiente reacción:



Debido a las concentraciones plasmáticas del ion cloruro, el principal producto de la MPO es el hipoclorito, que posee una capacidad oxidante extremadamente alta. Una vez producido, interactúa rápidamente con una variedad de moléculas biológicamente relevantes, como ser aminas, aminoácidos, tioles, tioéteres, nucleótidos y hemoproteínas (16). Los efectos citotóxicos atribuibles al hipoclorito incluyen la oxidación y/o decarboxilación de proteínas de membrana, lo que conduce al incremento de la permeabilidad celular, la oxidación de componentes de la cadena respiratoria bacteriana y la peroxidación de membranas (16). El hipoclorito puede también reaccionar en forma espontánea con aminas primarias o secundarias dando origen a otras especies oxidantes conocidas como cloraminas, los llamados oxidantes de larga vida media, puesto que algunas de ellas pueden ser recuperadas de sobrenadantes de neutrófilos luego de 16 horas de ocurrida la activación celular (16).

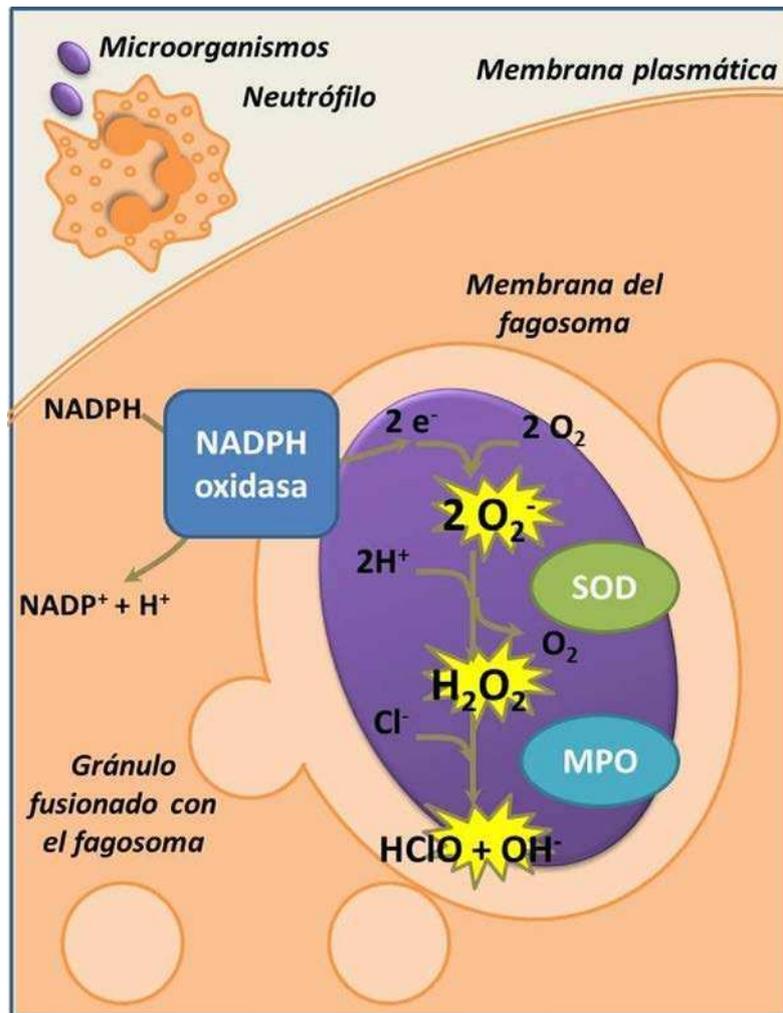


Figura 1 - Mecanismos microbicidas dependientes del oxígeno en el neutrófilo: el estallido respiratorio. Como consecuencia del reconocimiento de los microorganismos se desencadena su fagocitosis, con la consecuente activación de la NADPH oxidasa. La reducción del oxígeno molecular por la NADPH oxidasa genera anión superóxido, que puede ser dismutado por la SOD a peróxido de hidrógeno. Éste a la vez es sustrato de la MPO, generando distintas especies reactivas, como el hipoclorito.

La importancia de los mecanismos microbicidas dependientes del oxígeno se pone en manifiesto en los pacientes que sufren EGC. La EGC es una inmunodeficiencia caracterizada por infecciones recurrentes por un espectro acotado de bacterias y hongos (generalmente *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens*, *Salmonella*, Bacilo Calmette-Guerin (BCG), *Micobacterium tuberculosis*, *Nocardia* y *Aspergillus*) (17). A su vez, los pacientes con EGC presentan complicaciones de tipo inflamatorias, que son más prominentes en el tracto gastrointestinal y genitourinario (17).

La EGC es causada por mutaciones en alguna de las subunidades de la NADPH oxidasa que ocasionan una pérdida parcial o total de actividad enzimática. Los fagocitos logran fagocitar a los microorganismos invasores, pero no pueden destruirlos. De todos los componentes de la enzima, la subunidad gp91^{phox} es la única que es específica de fagocitos y se encuentra ligada al cromosoma X (17). La deficiencia en gp91^{phox} ocasiona pérdida total de la actividad enzimática y en consecuencia, la incapacidad de las células de estos pacientes (a cuya enfermedad nos referiremos como EGC-X) de producir IRO derivados de la NADPH oxidasa (17).

A pesar de que la tasa de mortalidad de los pacientes con EGC era extremadamente elevada cuando fue descrita en los años 1950, la supervivencia general se ha incrementado enormemente gracias al diagnóstico precoz, las terapias profilácticas con antibióticos y el desarrollo de agentes antimicóticos efectivos (17). Dado que se trata de una enfermedad genética que se manifiesta en células del linaje hematopoyético, el trasplante de médula ósea es una posibilidad que se lleva a cabo con éxito, pero que requiere de la disponibilidad de donantes compatibles.

Cabe mencionar que además de su rol en los mecanismos microbicidas del neutrófilo, los IRO han sido implicados en una amplia variedad de procesos fisiológicos de señalización (18, 19). En este sentido, los IRO cuentan con algunos prerequisites importantes para ser segundos mensajeros: son moléculas pequeñas, difusibles y ubicuas, que pueden sintetizarse y destruirse rápidamente, confiriendo especificidad espacial y temporal a los eventos de señalización (19). Sin embargo, debido a su toxicidad, existe un rango acotado de concentraciones en el cual los IRO pueden actuar efectivamente como segundos mensajeros. Además de la NADPH oxidasa, existen otras fuentes de IRO, como la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, el metabolismo del ácido araquidónico y las sintetasas de óxido nítrico (18).

Como los IRO son potentes agentes oxidantes, pueden afectar el balance de óxido-reducción (llamado estado redox) del citoplasma en forma local o general (18). Existe una gran cantidad de evidencia indicando que las modificaciones en el estado redox celular regulan los procesos de señalización en distintos niveles, incluyendo el funcionamiento de receptores, la actividad enzimática y de factores de transcripción y la

expresión génica (19) (20). En particular, se probó que los IRO activan al factor nuclear κ B (NF- κ B) (20). En el neutrófilo se ha demostrado que tanto los IRO como los intermediarios reactivos del nitrógeno (IRN) modulan la actividad de quinasas y fosfatasa (21-23), de receptores de membrana involucrados en la fagocitosis y en la secreción de gránulos (24) y también la apoptosis (25, 26).

1.2.3 Mecanismos microbicidas extracelulares: trampas extracelulares de neutrófilos

Además de los mecanismos efectores clásicos mencionados anteriormente, estudios realizados en los últimos años demostraron que los neutrófilos pueden eliminar microorganismos extracelulares al capturarlos en estructuras formadas por cromatina y proteínas granulares que reciben el nombre de NETs (13, 27). Las NETs se forman y liberan por estimulación de los neutrófilos con agonistas como el LPS, la IL-8, C5a, el ácido forbolmirístico (PMA) y también por microorganismos, todos factores que conducen a una forma de muerte a la cual se denomina NETosis. La NETosis es un proceso activo en el cual el núcleo pierde su forma polilobulada, la eu- y la heterocromatina se homogenizan, la envoltura nuclear y las membranas granulares se desintegran y el material nuclear toma contacto directo con los componentes de los gránulos. Finalmente, la membrana celular se rompe y las NETs son liberadas en forma concomitante con la muerte celular (28). Se ha reportado que el ADN mitocondrial también puede servir como fuente de ADN para la formación de NETs en neutrófilos que permanecen viables (29).

Diversos patógenos como *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y el hongo *Candida albicans* inducen la formación de NETs y son atrapados por ellas. (13, 27). Las NETs degradan factores de virulencia y matan a bacterias Gram positivas y negativas así como también hongos unicelulares, posiblemente debido a que exponen a los patógenos a altas concentraciones locales de proteínas antimicrobianas como la elastasa, la proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad y las histonas (13, 30).

1.3 Producción de citoquinas por los neutrófilos

Por muchos años los neutrófilos fueron considerados células terminalmente diferenciadas y con una capacidad biosintética limitada. Sin embargo, a partir de los años '90 el desarrollo de nuevas herramientas para obtener preparaciones altamente puras de neutrófilos y el uso de estrategias basadas en *microarrays* permitió ampliar el conocimiento de la capacidad biosintética de los neutrófilos. Así, numerosos estudios han demostrado que estas células pueden ser inducidas a producir importantes mediadores inflamatorios y antiinflamatorios, entre los que se encuentra una amplia variedad de citoquinas (31).

Teniendo en cuenta que los neutrófilos son las primeras células convocadas a los sitios de infección o daño tisular y dado que la respuesta que desarrollan es específica del estímulo que detectan, su capacidad de producir citoquinas no sólo condiciona la respuesta inflamatoria sino que también podría condicionar la evolución de la respuesta adaptativa subsiguiente (31).

Los monocitos y los linfocitos constituirían la mayor fuente de citoquinas entre los leucocitos. Sin embargo, dado que los neutrófilos son reclutados en forma masiva a los focos de infección o de daño, constituyen una fuente relevante de citoquinas y quimiocinas capaces de modular su propio reclutamiento y el de otras poblaciones inmunes (32). Resaltando la importancia que cobra el neutrófilo en los fenómenos inflamatorios se encuentra el hecho que durante la etapa aguda de la fase celular en el foco inflamatorio la proporción monocito:neutrófilo es aproximadamente 1:100 (33).

Se ha demostrado que los neutrófilos pueden producir, en forma constitutiva o luego de recibir la estimulación apropiada, una amplia variedad de citoquinas. Distintos trabajos han demostrado que los neutrófilos humanos y/o murinos producen citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral- α (TNF α), interleuquina-1 α (IL-1 α), IL-1 β e IL-12, así como también citoquinas antiinflamatorias, como el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Asimismo, estudios recientes han demostrado que los neutrófilos son una fuente importante de citoquinas cruciales para la supervivencia, la maduración y la diferenciación de los linfocitos B. Estas moléculas incluyen al BAFF (34) y al ligando inductor de la proliferación (APRIL) (35). Los neutrófilos también sintetizan y liberan quimiocinas, como la IL-8 y la proteína

inflamatoria de macrófagos-1 α (MIP-1 α) y MIP-1 β , y otras citoquinas como el interferón α (IFN α), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y el factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF). En consecuencia, los neutrófilos no sólo regularían la respuesta inmune, sino que también podrían influenciar otros procesos, como la hematopoyesis, la reparación de tejidos y la angiogénesis (36).

2. Citoquinas de la familia de Interleuquina-1

La familia de citoquinas de IL-1 se encuentra fuertemente asociada a la inflamación aguda y crónica. Al día de hoy se han descrito once miembros de la “súper familia del gen de IL-1” y se cree que ellos surgieron por duplicación de un gen ancestral común, dado que poseen una estructura génica conservada, incluyendo posiciones idénticas de ciertos intrones, y una más modesta preservación de secuencias de aminoácidos claves que permiten un plegamiento particular de las proteínas (37). Cuatro de los miembros de esta familia, IL-1 α , IL-1 β , IL-18 y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra), han sido estudiados en profundidad. Otros miembros descritos más recientemente son IL-33, IL-36 α , β y γ , IL-36Ra, IL-37 e IL-38. La IL-37, al igual que IL-1Ra e IL-36Ra y a diferencia del resto de las citoquinas de la familia, cumple una función antiinflamatoria. A su vez, existe una variedad de receptores para esta familia de citoquinas, incluyendo correceptores, receptores tipo señuelo (o *decoy*), proteínas de unión y receptores inhibitorios (37).

Para ejercer su actividad biológica, tanto IL-1 α como IL-1 β (a las que nos referiremos simplemente como IL-1 cuando tratemos a ambas citoquinas en forma indistinta) se unen al receptor de IL-1 de tipo I (IL-1RI). Seguidamente, la proteína accesoria (IL-1RAcP) se asocia con IL-1RI formando un complejo. La señalización se inicia con el reclutamiento de la proteína adaptadora MyD88 al dominio TIR (de *Toll-Interleukin-1 Receptor*) de IL-1RI. Este evento desencadena una cascada de fosforilación de quinasas que lleva a la traslocación del factor nuclear κ B (NF- κ B) al núcleo, el cual activa la expresión de una gran variedad de genes proinflamatorios (38, 39). Dado que los receptores de tipo Toll (del inglés *Toll like receptors*, TLR, un tipo de RRP) también poseen dominios citoplasmáticos TIR y señalizan a través de la molécula MyD88, ambos receptores comparten sus mecanismos de transducción de la señal. Por esta razón, tanto la IL-1 como una amplia variedad de productos microbianos desencadenan manifestaciones inflamatorias similares (37).

La actividad biológica de IL-1 puede ser contrarrestada por dos mecanismos (38, 39). Uno de ellos involucra a IL-1Ra, el cual se une al receptor IL-1RI y bloquea la acción

de IL-1 α e IL-1 β (37, 38). El otro mecanismo involucra al receptor de IL-1 tipo II (IL-1RII). El mismo es incapaz de señalizar al interior de la célula porque carece de dominio TIR, hecho que impide la asociación de MyD88 y en consecuencia la transducción de la señal. Este receptor es expresado en la superficie de células de linaje mielomonocítico (40) y de linfocitos B. IL-1RII actúa como un receptor señuelo, dado que une a la IL-1 β con mayor afinidad que el IL-1RI, y de esta forma la secuestra, impidiendo a la misma ejercer sus efectos biológicos.

Por su parte, IL-18 se une a su propio receptor y correceptor, IL-18R α e IL-18R β , generando una cascada de señalización que lleva también a la activación de genes proinflamatorios. IL-36 α , β y γ se unen a un mismo receptor y su actividad es antagonizada por IL-36Ra en forma similar a lo que ocurre con IL- α y β y IL-1Ra. Se desconocen los receptores para IL-37 y 38, mientras que la IL-33 señala a través del receptor ST2, que al igual que IL-1RI, utiliza a la proteína accesoria IL-1RAcP y estimula la función de los mastocitos y las respuestas de tipo Th2 (41).

Todos los miembros de la familia de IL-1, con la excepción de IL-1Ra, son sintetizados como precursores o proformas que se convierten en sus formas maduras luego del procesamiento por proteasas específicas que remueven su extremo N-terminal. A pesar de tratarse de proteínas sintetizadas para su liberación, no poseen un péptido señal evidente para la vía canónica de secreción de proteínas retículo endoplasmático (RE)-aparato de Golgi, y ninguna de ellas ha sido encontrada en estos compartimentos. A diferencia del precursor de la IL-1 β , las proformas de otros miembros de la familia de IL-1 como IL-1 α , IL-36Ra, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ e IL-33, exhiben actividad biológica, a pesar de que la misma es menor que la de las formas carentes del extremo N-terminal (42). Por su parte, IL-1 α e IL-33 tienen una doble función, ya que además de unirse a sus receptores de superficie, sus precursores intracelulares pueden translocarse al núcleo e influenciar la transcripción de genes proinflamatorios (41).

Dado que en el presente trabajo de tesis nos centraremos en el estudio de la producción y liberación de IL-1 β por los neutrófilos, continuaremos describiendo las características salientes de esta citoquina en particular.

2.1 Actividad biológica de IL-1 β

Una amplia variedad de células es capaz de producir IL-1 β , incluyendo monocitos, macrófagos, linfocitos, células NK, neutrófilos, células de la glía y queratinocitos. A su vez, existe una vasta literatura acerca de los efectos ejercidos por esta citoquina (36).

Tanto IL-1 α como IL-1 β son citoquinas pleiotrópicas que afectan tanto al sistema inmune innato como al adaptativo. A pesar de que los ratones *knockout* para cualquiera de ellas poseen un fenotipo normal en su desarrollo, crecimiento, homeostasis, reproducción y resistencia a la flora microbiana normal, los efectos de la carencia de estas citoquinas se evidencian cuando se los enfrenta a estímulos inflamatorios de distinta naturaleza (38). Los ratones deficientes en IL-1 β , a diferencia de sus controles, no desarrollan destrucción de las articulaciones luego de la inyección de componentes de la membrana de *Streptococcus* (43). Tampoco desarrollan fiebre, anorexia o respuestas de fase aguda frente a la administración de turpentina, un inductor de inflamación estéril, hecho que ha sugerido que la IL-1 β podría cumplir un rol no redundante en el desarrollo de respuestas inflamatorias estériles (44, 45).

Por otra parte, los ratones *knockout* para IL-1Ra poseen una reproducción anormal, exhiben una tasa de crecimiento reducida y, en el contexto de ciertas cepas, son propensos a desarrollar enfermedades espontáneas como la artritis reumatoidea o la arteritis fatal, evidenciando la necesidad de control de los efectos de IL-1 (46, 47).

La IL-1 β es capaz de estimular a la ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2), a la fosfolipasa A tipo 2 y a la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS). Por esta razón, tanto las células expuestas como animales tratados con IL-1 producen una gran cantidad de prostaglandina-E2 (PGE2), factor activador plaquetario (PAF) y óxido nítrico (38).

La IL-1 β actúa sobre monocitos, macrófagos y otros tipos celulares, estimulando la liberación de otras citoquinas proinflamatorias, como el TNF- α y la IL-6. IL-1 β regula negativamente la producción de IFN- γ a través de la inducción de la producción de PGE2, contribuyendo a la polarización de la respuesta adaptativa a un perfil Th17 (7). Además, IL-1 β coestimula las funciones de los linfocitos T en presencia de un antígeno o de un agente mitógeno (41).

Por otro lado, la IL-1 β aumenta la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina en células endoteliales, promoviendo la infiltración de tejidos con células inflamatorias (48-50). La IL-1 β puede también actuar como factor angiogénico porque aumenta la expresión de VEGF (51-53).

A nivel sistémico, la IL-1 β estimula la liberación de corticotrofinas por el hipotálamo, ocasionando en última instancia la liberación de corticosteroides por la glándula adrenal (54). Además, junto con TNF- α e IL-6, es un mediador fundamental de la respuesta de fase aguda, que incluye la estimulación de la síntesis de proteínas específicas de esta fase por el hígado, el reajuste del termostato hipotalámico que dispara la respuesta febril, la anorexia y la somnolencia (55). A su vez, IL-1 β tiene efectos tóxicos sobre las células β productoras de insulina en los islotes de Langerhans. Por último, la IL-1 β también actuaría estimulando a los precursores de médula ósea para su diferenciación en el linaje mieloide durante la etapa aguda de una infección o inflamación (55).

2.2 Procesamiento de IL-1 β

Dado que la IL-1 β es una citoquina proinflamatoria multifuncional, no resulta extraño que sea expresada en bajos niveles en condiciones normales, que requiera de inducción transcripcional y que posea también modulación a nivel traduccional (42, 56). Diversos componentes microbianos, conducen a la activación del factor de transcripción NF- κ B a través de la estimulación de TLR, induciendo la síntesis del precursor de IL-1 β , la proIL-1 β , que se acumula dentro de la célula (figura 2). Los pasos siguientes, es decir, su procesamiento y liberación, también son procesos altamente controlados.

El interés en el procesamiento y la liberación de IL-1 β se ha incrementado desde el descubrimiento de un conjunto de síndromes autoinflamatorios que responden específicamente al bloqueo del receptor de IL-1 con IL-1Ra (comercializado por la industria farmacéutica como Anakinra) o a la neutralización de IL-1 β utilizando anticuerpos monoclonales anti-IL-1 β (57). A pesar de que casi todas las enfermedades autoinmunes tienen un componente inflamatorio, algunas enfermedades parecen ser básicamente inflamatorias, puesto que suelen ser desencadenadas en forma periódica y no desarrollarse crónicamente, no se asocian a ciertos haplotipos de moléculas MHC de

clase II y se encuentran fuertemente vinculadas a estímulos disparadores exógenos. Estas enfermedades autoinflamatorias se deben a mutaciones específicas en proteínas que regulan la actividad de IL-1 β e incluyen a la enfermedad multiinflamatoria de inicio neonatal (*neonatal-onset multi-inflammatory disease*, NOMID), al síndrome Muckle-Wells, al síndrome de hiper IgD, a la fiebre mediterránea familiar y a la gota, entre otras (41).

Como mencionamos anteriormente, IL-1 β es sintetizada en forma de un precursor inactivo de 31 kDa (269 aa) que carece de un péptido señal de inicio de la traslocación a retículo endoplasmático (58). Por esta razón, su procesamiento debe tener lugar en el citoplasma, a menos que ocurra su traslocación a algún tipo de vesícula (ver más adelante *Modelos de secreción de IL-1 β*). El mecanismo mejor estudiado que conduce al procesamiento de este precursor involucra a la enzima caspasa-1. Ésta es una proteasa citoplasmática que corta un fragmento N-terminal de IL-1 β de 166 aa, convirtiendo al precursor en su forma activa de 17 kDa (41). Aún cuando este mecanismo es el universalmente aceptado, numerosos trabajos evidenciaron la existencia de mecanismos de procesamiento independientes de caspasa-1, aunque la naturaleza de los mismos y su contribución al desarrollo de las respuestas inflamatorias es aún controvertida (41, 42, 59-64).

2.2.1 Mecanismo de procesamiento de IL-1 β dependiente de caspasa-1

Las caspasas son una familia de cisteinoproteasas intracelulares que cortan un número limitado de sustratos luego de un residuo de ácido aspártico (65). La función de las caspasas ha sido extensamente estudiada en el proceso de apoptosis, en el cual son esenciales para la activación e implementación de este programa de muerte celular. Sin embargo, existen caspasas, incluidas las caspasas 1, 4 y 5 humanas y las caspasas 1, 11 y 12 murinas, que no participan de la apoptosis, sino que están involucradas en el procesamiento y secreción de moléculas proinflamatorias (65). Por este motivo son llamadas caspasas proinflamatorias. A su vez, la caspasa-1 se encuentra involucrada en otro tipo de muerte celular programada denominado piroptosis (66, 67).

La caspasa-1 fue la primera caspasa en ser identificada (68, 69). Se trata de una enzima citoplasmática sintetizada como un zimógeno de 45 kDa. Para su activación requiere de un procesamiento proteolítico, el cual ocurre generalmente en forma autocatalítica. Cuando las células son estimuladas con una variedad de agonistas proinflamatorios, como estímulos infecciosos, estímulos estériles o señales endógenas de daño, se produce la activación de receptores tipo NOD (*Nod-like receptors*, NLR, descritos más adelante) presentes en el citoplasma. Dicha activación conduce a su oligomerización y al reclutamiento de procaspasa-1, llevando a la formación de amplios complejos multiproteicos citoplasmáticos que reciben el nombre de inflamomasas (figura 2). Una vez en estos complejos, la procaspasa-1 se activa por autoproteólisis, generando una enzima activa compuesta por una subunidad de 10 y otra de 20 kDa. De esta forma, la caspasa-1 media el procesamiento de la proIL-1 β en su forma biológicamente activa (65).

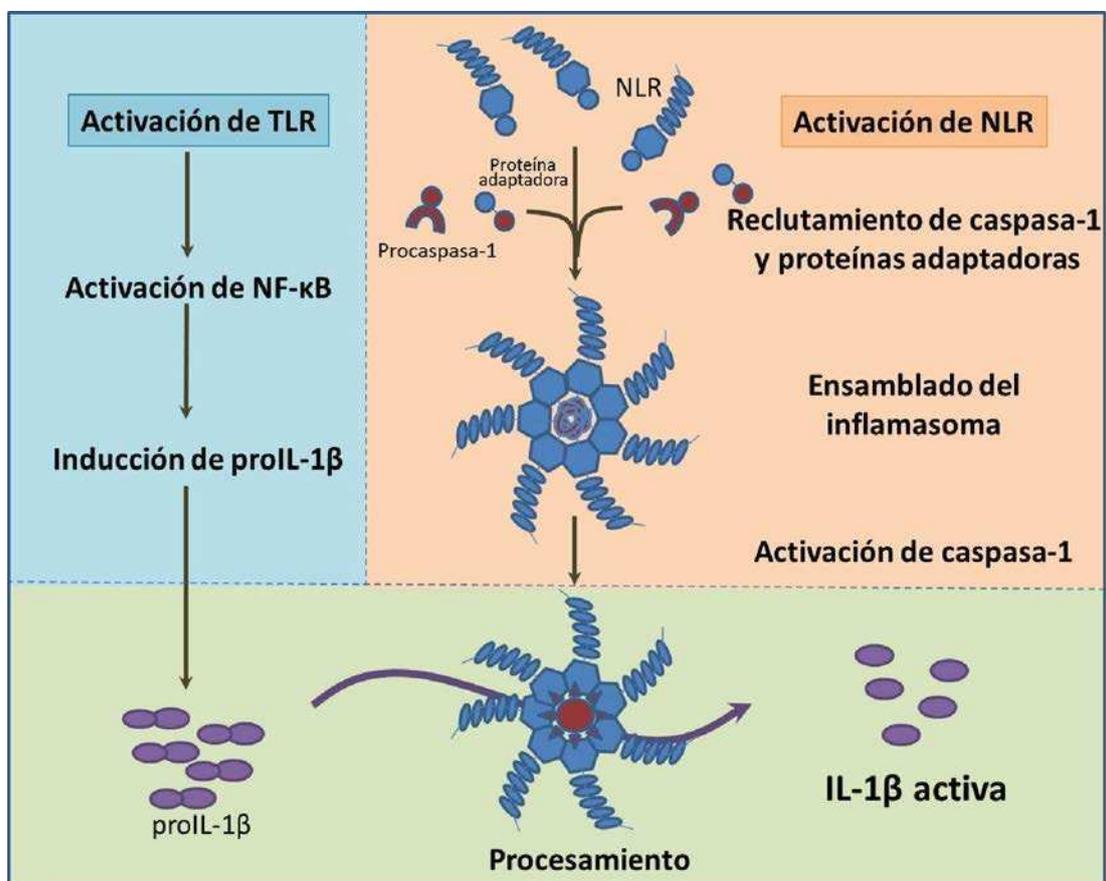


Figura 2 – Mecanismos implicados en la generación de IL-1 β con actividad biológica. La estimulación de TLR lleva a la activación de NF- κ B e inducción de proIL-1 β . La activación de NLR conduce al ensamblado del inflamosoma y activación de caspasa-1. La caspasa-1 activada media el procesamiento de la proIL-1 β generando una isoforma con actividad biológica.

Estudios recientes conducidos en células de linaje mieloide demostraron que los mecanismos que controlan la secreción de IL-1 β difieren entre monocitos y macrófagos humanos (70). En los primeros, la caspasa-1 se encuentra activada constitutivamente. Por lo tanto, estímulos como el LPS y otros PMAPs que estimulan a TLR y activan NF- κ B, inducen la transcripción del gen de proIL-1 β y disparan la liberación de la forma activa de esta citoquina. Por el contrario, en macrófagos y otros tipos celulares se requiere tanto de la inducción génica como de la activación del inflamasoma por ciertos estímulos disparadores como el ATP extracelular para mediar la activación de la caspasa-1 y la consecuente liberación de IL-1 β (figura 2) (70).

2.2.1.1 Los receptores tipo NOD (NLR) y su activación

Los receptores de tipo NOD constituyen una familia de RRP citoplasmáticos (71, 72). Todos ellos poseen una estructura de tres dominios característica, que consiste en un dominio C-terminal con repeticiones ricas en leucinas (LRR), un dominio central de unión a nucleótido/oligomerización (NOD, también conocido como NACHT) y un dominio efector o de interacción proteína-proteína N-terminal, que de acuerdo a su naturaleza permite clasificar a los NLR en 5 subfamilias: la subfamilia NLRA, cuyos integrantes poseen un dominio de transactivación ácido; la subfamilia NLRB, integrada por miembros que poseen un dominio BID (*baculovirus inhibitor domain*); la subfamilia NLRC, integrada por receptores que contienen un dominio N-terminal para reclutamiento de caspasa o CARD; la subfamilia NLRP que posee un dominio N-terminal pirina (PYD) y la NLRX que posee integrantes con un dominio N-terminal sin una fuerte homología con alguno de los dominios N-terminales de las otras subfamilias (71, 72).

Las LRR mediarían el reconocimiento de una señal específica de activación, ocasionando un cambio conformacional que expondría a los dominios NOD y llevaría a la oligomerización de los receptores por sus dominios NACHT. Se cree que las LRR mantienen a los NLR en un estado de autoinhibición. Los dominios CARD o PYD median interacciones homofílicas con otras proteínas que poseen dominios CARD o PYD. La caspasa-1, que posee dominios CARD, se asocia en forma directa al NLR si éste posee un dominio CARD (como en el caso de IPAF, un NLRC, figura 3), o lo hace a través de la proteína adaptadora

ASC, que posee dominios PYD y CARD (como ocurre con NALP3, un NLRP, figura 3) (7, 57, 65, 73). De este modo se conforma un inflamasoma donde se activa la caspasa-1, pudiendo mediar el procesamiento de la proIL-1 β .

Hasta el presente se han descrito cuatro inflamasomas diferentes de acuerdo al tipo de NLR que los integra (figura 3). El inflamasoma formado por NALP1 (también llamado NLRP1) es activado por ligandos de origen bacteriano, como el muramildipéptido (MDP) o la toxina del ántrax; el inflamasoma de IPAF (también conocido como NLRC4) es activado por flagelinas; el inflamasoma AIM2, que es capaz de reclutar a caspasa-1 cuando es activado por ADN intracitoplasmático (65, 73), y el inflamasoma NALP3 (o NLRP3), que ha sido el más extensamente estudiado. Éste último se encuentra involucrado en la respuesta a una gran variedad de estímulos inflamatorios: algunos de ellos son PMAPs, como el MDP, el ARN bacteriano y el ARN doble cadena; otros son PMADs, como el ATP extracelular, los cristales de urato monosódico (MSU), la proteína amiloide- β , o los cristales de colesterol; y otros son estímulos inflamatorios estériles exógenos, como los cristales de sílice o de asbesto, y las sales de aluminio administradas como adyuvantes en formulaciones vacunales (57).

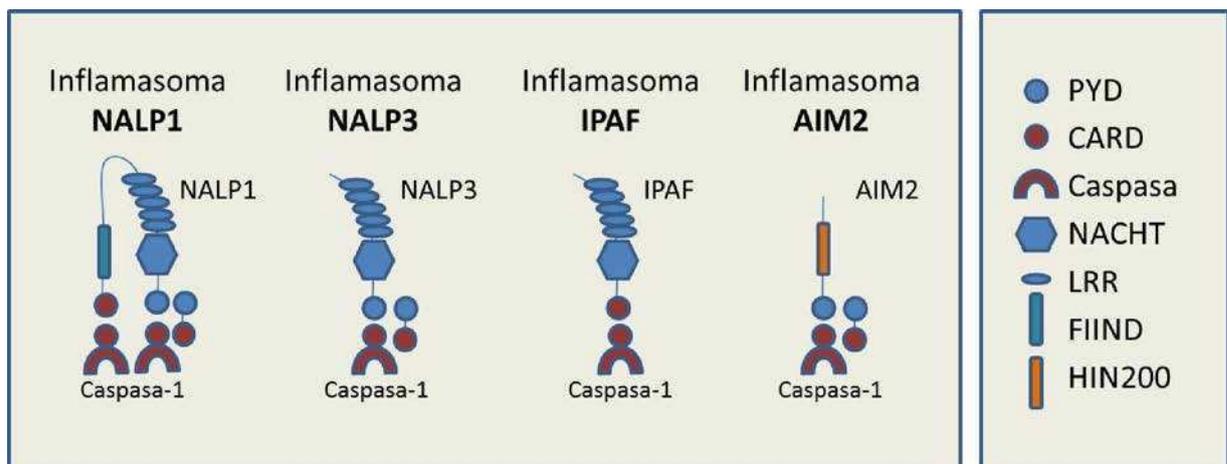


Figura 3 - Los cuatro complejos inflamasomas descritos hasta el momento. Se detallan los dominios que componen a las moléculas que conforman cada tipo de inflamasoma.

Esta capacidad de NALP3 de ser activado por agonistas exógenos y endógenos tan diversos desafía el concepto de que se trate de un receptor clásico. No obstante, la

hipótesis más aceptada al presente sostiene que NLRP3 detecta cambios en el microambiente celular producidos como consecuencia de la presencia del agonista en cuestión. En este contexto, se propusieron tres mecanismos a través de los cuáles éstos agonistas podrían actuar (74): un mecanismo que involucra la producción de IRO, otro mecanismo que implica la desestabilización de lisosomas y liberación de su contenido al citoplasma, y otro mecanismo que involucra un descenso en el nivel de K^+ intracelular (figura 4).

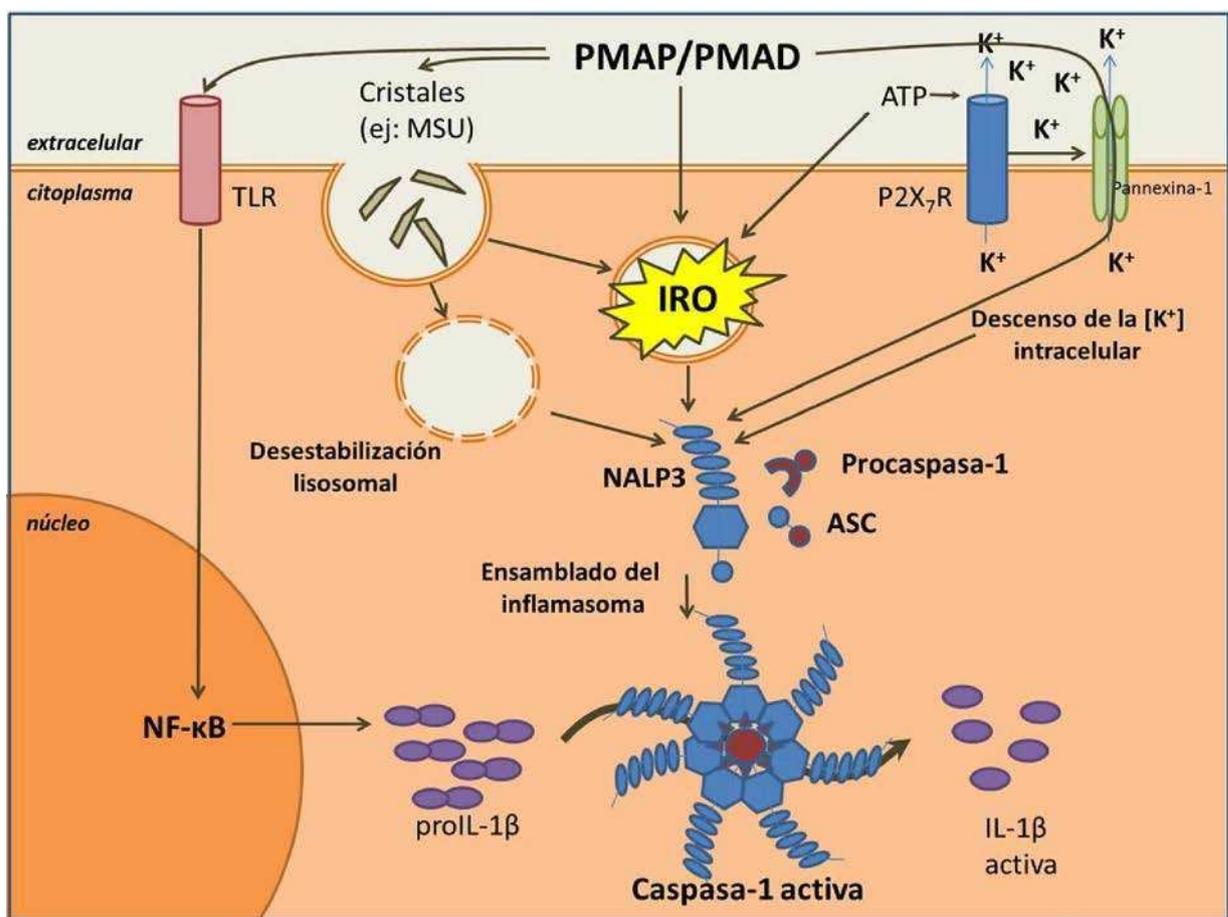


Figura 4 - Mecanismos postulados que llevarían a la activación del inflamasoma NALP3.

En relación al primero de los mecanismos, se postuló que estímulos como el ATP extracelular y algunos cristales y toxinas podrían conducir a la producción de IRO, los cuales actuarían como segundos mensajeros y serían los agonistas detectados por NALP3 (74, 75). A favor de esta hipótesis, la estimulación de macrófagos alveolares con ATP incrementó la concentración de IRO en el interior de las células y la estimulación de

células de la línea mieloide THP-1 con asbesto también indujo la producción de IRO (75, 76). Asimismo, se observó que el tratamiento con *scavengers* de IRO bloquea la activación de NALP3 en respuesta a varios agonistas (76, 77). En particular, se propuso que la activación del inflamasoma dependía de la producción de IRO por la NADPH oxidasa (76). Sin embargo, estudios realizados con monocitos de pacientes con EGC, deficientes en distintas subunidades de la NADPH oxidasa, revelaron que éstos producen una cantidad incrementada de IL-1 β en forma dependiente de caspasa-1 respecto de la observada en monocitos provenientes de donantes sanos, sugiriendo que, al menos en este tipo celular, los IRO regularían negativamente la actividad de caspasa-1 (78, 79). Esta posibilidad está sustentada por hallazgos realizados en monocitos provenientes de ratones deficientes en la enzima SOD, los que presentan una actividad disminuida de caspasa-1 debido a su oxidación y glutationilación (80).

Recientemente se ha propuesto que los IRO producidos por la actividad mitocondrial podrían activar a NALP3 (81). Los autores encontraron que la inhibición de los complejos I o III de la cadena respiratoria, que genera IRO por escape de electrones y reducción parcial del oxígeno, ocasionó la activación de NALP3. Es ampliamente reconocido que además de su función bioenergética, la mitocondria tiene un rol crucial en mecanismos de señalización, como los implicados en la muerte celular por apoptosis (82), por lo que no resultaría extraño que participe en otros procesos como el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, al día de hoy el rol de los IRO en la activación del inflamasoma NALP3 y de caspasa-1 continúa siendo materia de debate y requiere de nuevas investigaciones.

Otro de los mecanismos propuestos para la activación del inflamasoma sostiene que algunos estímulos podrían provocar la desestabilización de las membranas lisosomales, de modo que el inflamasoma NALP3 sería sensible al daño interno de la célula (83). En base a hallazgos realizados en macrófagos murinos y en células mononucleares humanas con estímulos estériles particulados (cristales de sílice y sales de aluminio) se propuso que al ser fagocitados, inducirían la ruptura de los fagolisosomas y la liberación de proteasas activas (como la catepsina-B) al citoplasma. Las proteasas a su vez cortarían un ligando endógeno de NALP3 que permitiría su activación (6, 83). Sin embargo, la identidad de tal sustrato es aún desconocida.

El tercer mecanismo propuesto a través del cual estímulos estructuralmente disímiles podrían activar al inflamasoma NALP3 involucra la activación de flujos de K^+ que conduzcan a un descenso en la concentración de K^+ intracelular, siendo ésta la señal detectada por el inflamasoma (71). Esta posibilidad es sustentada por estudios que demuestran que el descenso en los niveles de potasio intracelular constituye un disparador de la activación de inflamasomas conteniendo NALP1 y NALP3 en distintos tipos celulares. La incubación de células en medios con alto contenido de potasio inhibe la activación de caspasa-1 y la secreción de IL-1 β estimuladas por distintos agonistas, como el péptidoglicano, el ATP y el MSU (71, 77, 84). Además, diversas toxinas bacterianas como la nigericina, la aerolisina, la maitotoxina y la gramicidina, son potentes activadores del inflamasoma NALP3, siendo todas ellas canales de K^+ que provocan un marcado descenso del K^+ intracelular (65, 71).

Para el caso particular del ATP se ha propuesto una variación de este último mecanismo conocido como el “modelo del canal”. Las altas concentraciones de ATP extracelular presentes en los sitios de daño tisular o necrosis actuarían estimulando al receptor purinérgico y canal iónico P2X₇R, llevando al eflujo de K^+ y al reclutamiento del hemicanal panexina-1 (74, 75, 85, 86). Panexina-1 formaría poros en la membrana plasmática, o en membranas endosomales permitiendo la salida de más K^+ y la entrada de PMAPs o PMADs que activarían a NALP3 (86, 87).

A raíz de la existencia de distintos modelos de activación de NALP3 han surgido modelos unificadores que interrelacionan a los tres mecanismos, otorgándole un rol central a algún elemento de los detallados anteriormente. Uno de los modelos más fervorosamente defendidos es el que postula que todas las vías de activación convergen en los IRO como activadores del inflamasoma (74). En sustento a este modelo, se ha observado que la fagocitosis de ciertas partículas no sólo activa la vía de desestabilización lisosomal (6) sino que además genera IRO, y que la producción de IRO se encuentra asociada con la salida de K^+ de la célula (86). No obstante, como hemos detallado anteriormente, existe evidencia experimental que no parece sustentar este modelo y tampoco se conoce la conexión precisa entre la producción de IRO y la activación de NALP3.

2.2.2 Mecanismos de procesamiento de IL-1 β independientes de caspasa-1

Existe una serie de estudios que sugieren que la caspasa-1 y la activación del inflammasoma no serían indispensables para el desarrollo de inflamación en modelos experimentales dependientes de la producción de IL-1 β . En modelos animales de inflamación inducida por turpentina, un estímulo estéril, se observó que los ratones deficientes en el gen de IL-1 β se encuentran protegidos de la inflamación exacerbada, mientras que los ratones deficientes en caspasa-1 no lo están (45, 88). Por otro lado, caspasa-1 parecería ser redundante en la defensa contra cierto tipo de microorganismos como *Chlamydia*, a pesar de que se mostró que IL-1 β se encuentra involucrada en la respuesta inducida por esta bacteria (89, 90). Asimismo, los ratones deficientes en caspasa-1 no se encuentran completamente protegidos contra la artritis y otras enfermedades inflamatorias dependientes de IL-1 β (91-93). En conjunto, estos estudios evidenciaron la existencia de mecanismos independientes de caspasa-1 para el procesamiento de proIL-1 β y generación de su forma activa.

Estudios bioquímicos revelaron que además de la caspasa-1 algunas metaloproteasas y serinoproteasas son capaces de cortar a la proIL-1 β y generar formas con actividad biológica (94-96). Se ha descrito que las metaloproteasas de la matriz como la estromolisina-1, las gelatinasas A y B, y la quimasa, una proteasa presente en mastocitos, pueden procesar al precursor de IL-1 β en formas biológicamente activas (64, 97).

La serinoproteasa catepsina G y la metaloproteasa colagenasa, por su parte, logran cortar al precursor de IL-1 β en formas de un tamaño y actividad similar a la IL-1 β madura de 17 kDa obtenida a partir de monocitos activados (95), mientras que la elastasa genera un fragmento de mayor tamaño con actividad biológica reducida (94). Asimismo se ha demostrado que la PR3, presente predominantemente en neutrófilos, es una de las proteasas más potentes capaz de procesar *in vitro* a la proIL-1 β y generar un fragmento de IL-1 β activo (59, 96). En conclusión, estos estudios muestran que las proteasas del neutrófilo son capaces de procesar a la IL-1 β . Estos hallazgos plantean interrogantes sobre cuál podría ser el contexto fisiopatológico en el que las proteasas ejercieran su capacidad de procesar a la proIL-1 β y cuál sería su relevancia. Dado que muchas

respuestas inflamatorias ocurren en forma localizada y varias poblaciones celulares se concentran en esos focos, es posible especular que la proIL-1 liberada por distintos tipos celulares pueda ser procesada extracelularmente. A favor de esta posibilidad, se conoce que los monocitos en cultivo liberan una cantidad significativa del precursor de IL-1 β (98). Entonces, en sitios de inflamación donde se hallan neutrófilos y monocitos, la proIL-1 β secretada por monocitos podría ser procesada por las enzimas proteolíticas liberadas por los neutrófilos activados (57). En sustento de esta posibilidad, se observó que el líquido sinovial recolectado de pacientes con artritis y el fluido de lavados bronqueoalveolares de pacientes con sarcoidosis procesaron a la IL-1 β en forma similar a lo que lo hicieron la elastasa, la catepsina G o la colagenasa purificadas, mientras que no ocurrió con líquido sinovial ni lavados bronqueoalveolares controles (95). Estos trabajos plantean que en ciertas situaciones inflamatorias las proteasas de los neutrófilos pueden contribuir al procesamiento de IL-1 β . No obstante, en ningún caso se determinó cuál es la contribución del propio neutrófilo a la proIL-1 β producida.

2.2.3 Mecanismos de procesamiento de IL-1 β en los neutrófilos

Una lectura detallada de las revisiones de la literatura acerca del procesamiento de IL-1 β señala un consenso general indicando que los neutrófilos procesan proIL-1 β a través de un mecanismo extracelular independiente de caspasa-1 y dependiente de proteasas (41, 57). Esto se debe en gran medida a que la mayoría de los estudios previos con neutrófilos se focalizaron en la contribución de sus proteasas al procesamiento extracelular de la proIL-1 β liberada por otros tipos celulares en los focos inflamatorios, como se detalló en el apartado anterior (7, 57). Sin embargo, al día de hoy no existen evidencias de que los neutrófilos liberen proIL-1 β y se desconoce si el procesamiento extracelular dependiente de proteasas tiene lugar en poblaciones de neutrófilos puros.

Los mecanismos que conducen a la producción y liberación de IL-1 β por los propios neutrófilos aún no han sido exhaustivamente estudiados y la funcionalidad de un mecanismo de procesamiento de IL-1 β dependiente de caspasa-1 en los neutrófilos es materia de debate. En favor de dicho mecanismo se ha demostrado que los neutrófilos

humanos expresan a la caspasa-1 (99-101) y que estímulos como el LPS y el GM-CSF incrementan su expresión (99). También se ha determinado que los neutrófilos expresan a los NLR NALP1, NALP6 y NALP3 (102-106). A su vez, existen reportes de que los neutrófilos podrían procesar a la proIL-1 β en forma dependiente de caspasa-1 (101, 107). En uno de ellos, la estimulación de neutrófilos de ratones deficientes en caspasa-1 con LPS mostró una secreción de IL-1 β disminuida respecto de la observada en ratones salvajes (107). En otro trabajo, también fue propuesto un procesamiento extracelular de la proIL-1 β mediado por la caspasa-1 de los neutrófilos (101). A pesar de estas evidencias que sugieren que en los neutrófilos podría tener lugar un mecanismo de procesamiento de la proIL-1 β dependiente de caspasa-1, hasta hoy ningún estudio ha aportado información sobre su relevancia ni ha investigado los mecanismos que subyacen a la secreción de IL-1 β dependiente de caspasa-1.

2.3 Mecanismos propuestos para explicar la liberación de IL-1 β de las células

Como mencionamos anteriormente, la proIL-1 β carece de péptido señal para su secreción por la vía canónica. A diferencia de lo que ocurre con las proteínas que son secretadas de las células, cuya síntesis transcurre en el RE rugoso, y son exportadas vía aparato de Golgi, la síntesis de la proIL-1 β tiene lugar en el citoplasma. Por esta razón, drogas como la brefeldina A, que bloquea el egreso del RE de proteínas secretorias, o la monensina, que bloquea el transporte a través del Golgi, no inhiben la secreción de IL-1 β (108).

Resulta sorprendente que a pesar de ser una citoquina tan ampliamente estudiada, los mecanismos implicados en la secreción de IL-1 β sean tan pobremente comprendidos. A partir de experimentos realizados con monocitos, macrófagos o células dendríticas preincubados con LPS y estimulados con ATP se propusieron distintos modelos para explicar la forma en que la IL-1 β es secretada de las células (109). Uno de ellos involucra la exocitosis de lisosomas secretorios. Según este modelo, el procesamiento de proIL-1 β tendría lugar dentro de las mismas vesículas que van a ser secretadas, en las cuales también se localizaría la caspasa-1 (108, 110, 111). Este

mecanismo utilizaría la red de microtúbulos e involucraría la movilización de Ca^{2+} y la activación de la fosfolipasa A_2 para la secreción. Como la movilización de Ca^{2+} se encuentra asociada a los eflujos de K^+ estimulados por el ATP (110), este nucleótido podría cumplir un rol no sólo en el procesamiento de IL-1 β como vimos anteriormente, sino también en su liberación. Otro de los mecanismos propuestos involucra la liberación de microvesículas de membrana plasmática conteniendo IL-1 β , proIL-1 β y caspasa-1, además de otros componentes citoplasmáticos (112-114). Todavía no está claro el mecanismo que mediaría la salida de la IL-1 β de las microvesículas al medio extracelular, pero algunas observaciones sugieren que el ATP se encontraría involucrado en este paso (113, 114). Estudios adicionales sugirieron que la exocitosis de exosomas podría ser otro mecanismo de liberación de IL-1 β . Éste involucraría la fusión de cuerpos multivesiculares y la subsiguiente liberación de exosomas conteniendo IL-1 β en su interior y LAMP-1 (marcador lisosomal) y moléculas de MHCII en la superficie (115). Otro mecanismo propuesto para la liberación de IL-1 β es la exportación utilizando transportadores de membrana de tipo ABC (116). Los estudios que sustentan este modelo fueron realizados empleando inhibidores farmacológicos y *knockdown* de estos transportadores. Sin embargo, no es posible descartar que los transportadores modulen la liberación de IL-1 β en lugar de mediarla directamente (109). Un último mecanismo propuesto sostiene que el filtrado del contenido de células en las que se hubiese perdido la integridad de membranas podría contribuir a la liberación de IL-1 β (117, 118).

La gran variedad de mecanismos propuestos para la liberación de IL-1 β podría deberse a diferencias funcionales en las células estudiadas. Es posible que la IL-1 β sea secretada por dos o más vías en paralelo. Así, dependiendo del tipo o la fuerza del estímulo se podrían reclutar mecanismos adicionales para lograr una liberación eficiente de IL-1 β (109).

Objetivos

Los objetivos de esta tesis consistieron en:

- 1) determinar la capacidad de neutrófilos humanos altamente purificados de producir y secretar IL-1 β en respuesta a estímulos infecciosos y estímulos inflamatorios estériles, e
- 2) identificar los mecanismos moleculares involucrados en la liberación de IL-1 β por neutrófilos.

Materiales y Métodos

Los estudios llevados a cabo en este trabajo fueron evaluados y aprobados por los Comités de Ética y Docencia de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires.

Purificación de neutrófilos humanos

Las muestras de sangre de dadores sanos o de pacientes con EGC-X fueron obtenidas bajo consentimiento informado por punción de la vena del antebrazo. Los neutrófilos fueron aislados a partir de sangre heparinizada mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Triyosom (GE Healthcare, EEUU y Justesa Imagen, Argentina) de 1,077 g/ml de densidad y sedimentación con Dextrán (GE Healthcare) 1,5%, de acuerdo a lo previamente descrito (119). Los eritrocitos contaminantes fueron removidos por lisis hipotónica. Luego de un lavado con solución fisiológica, las células (>97% de granulocitos neutrófilos determinado por citometría de flujo) fueron resuspendidas en medio completo: RPMI 1640 (HyClone Laboratories, Logan, UT, EEUU) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco-Invitrogen, EEUU), penicilina 100 unidades/ml y estreptomycin 100 µg/ml (Invitrogen, EEUU).

Todas las preparaciones de neutrófilos fueron incubadas con un anticuerpo anti-CD14 conjugado a firoeritrina (PE, de BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU) y analizadas mediante citometría de flujo para garantizar que la contaminación con monocitos fuera menor al 0,5% y que los parámetros dispersión hacia adelante y hacia los costados (FSC y SSC) fueran compatibles con los de células no activadas (figura 5).

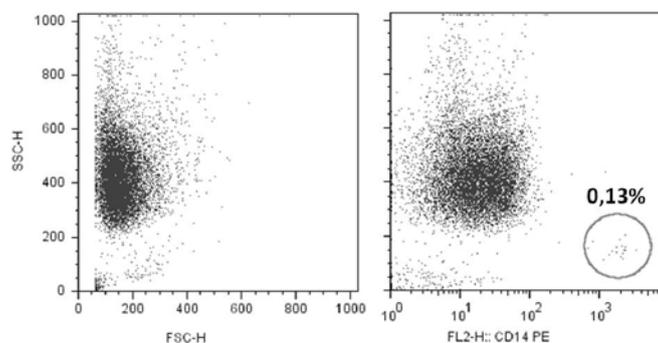


Figura 5 - Caracterización de la población de neutrófilos con la que se trabajó en la presente Tesis. El gráfico de la izquierda muestra un *dot plot* de los parámetros FSC y SSC que exhibe una población de neutrófilos humanos altamente purificada. El gráfico de la derecha muestra un *dot plot* de los parámetros SSC vs. fluorescencia emitida por células que han unido un anticuerpo anti-CD14-PE. La población con alta expresión de CD14 que se encuentra encerrada con un círculo corresponde a los monocitos CD14⁺ contaminantes.

Con el fin de minimizar la activación espontánea de los neutrófilos, las células fueron utilizadas inmediatamente luego de la purificación.

Todos los materiales empleados fueron estériles y libres de endotoxinas.

Citometría de flujo

Los estudios que involucraron citometría de flujo fueron realizados empleando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). La información recolectada fue analizada utilizando el software FlowJo, Tree Star Inc.

Líneas celulares

En el presente trabajo se utilizaron las líneas mielocíticas humanas PLB-985, la misma línea *knockout* (KO) para la subunidad gp91^{phox} de la enzima NADPH oxidasa (PLB 3.3, a la que nos referiremos como PLB-KO) y la línea recuperada con una copia funcional del gen (PLB 3.3/01WTPEFpac-HA91WT, a la que denominaremos PLB-91). La línea PLB-KO posee el locus correspondiente a la subunidad gp91^{phox} de la NADPH oxidasa interrumpido por recombinación homóloga. Estas células son incapaces de sintetizar la proteína, por lo que los neutrófilos derivados de esta línea son incapaces de realizar estallido respiratorio y constituyen un modelo *in vitro* de la EGC-X (120). A su vez, la transfección estable del ADN copia de la gp91^{phox} en las PLB-91 restableció su capacidad de generar O₂⁻ luego de ser diferenciadas a neutrófilos (120). Estas líneas fueron gentilmente cedidas por la Dra. Mary C. Dinauer de la *Washington University School of Medicine*, St. Louis, MO, EEUU.

Las líneas PLB fueron cultivadas en medio completo suplementado con glutamina 2 mM en una estufa humidificada a 37° C y en una atmósfera de CO₂ 5% y 95% de aire. A la línea PLB-91 se la cultivó en el mismo medio conteniendo puromicina 1 µg/ml para mantener la presión de selección de células conteniendo el plásmido transfectado.

Para diferenciar las líneas PLB a granulocitos neutrófilos se expuso a las células en crecimiento exponencial a dimetilformamida (DMF) 0,5% por 5-6 días. La diferenciación fue monitoreada en las tres líneas por la ganancia de la expresión del marcador CD11b con un anticuerpo anti-CD11b-PE (Immunotech-Beckman Coulter, República Checa) y

citometría de flujo, y por la adquisición de la capacidad de producir de IRO en respuesta a PMA detectada con DHR123 y citometría de flujo en células PLB-985 y PLB-91.

Determinación de la producción de IRO

Los neutrófilos fueron incubados a una densidad de $1,5 \times 10^6$ /ml en medio completo con $10 \mu\text{M}$ dihidrorodamina 123 (DHR 123, Invitrogen) durante 5 min. Luego fueron estimulados con los agonistas indicados e incubados durante 30 min a 37°C . Como control positivo de la producción de IRO se utilizó PMA 100 ng/ml . Las muestras se transfirieron a un baño con hielo y se analizó inmediatamente la fluorescencia en el canal FL-1 por citometría de flujo.

Estimulación de los neutrófilos

Los neutrófilos purificados de sangre periférica fueron resuspendidos en medio completo a 5×10^6 /ml. Los neutrófilos diferenciados de las líneas PLB fueron resuspendidos en medio completo fresco sin DMF a una densidad de 2×10^6 /ml.

Los neutrófilos fueron preincubados durante 30 min a 37°C con los distintos inhibidores o sustancias a ensayar: el Ac-YVAD-CMK y el Inhibidor I de Catepsina G fueron adquiridos de Calbiochem (Merk, Darmstadt, Alemania); el Elafín de AnaSpec (Fremont, CA, EEUU), la apocinina, la xantina, la butioninsulfoximida, la carbenoxolona, la iberiotoxina, la apamina y la glibenclamida fueron de Sigma Aldrich (Saint Louis, Missouri, CA, EEUU); la xantina oxidasa de Roche (Basilea, Suiza) y el IL-1Ra fue de Abcam (Cambridge, Reino Unido). Luego fueron estimulados o no con LPS proveniente de *Escherichia coli* cepa O111:B4 (Sigma) 200 ng/ml por 2 h. Posteriormente se los incubó con ATP (Sigma Aldrich) $2,5 \text{ mM}$ o cristales de urato monosódico (MSU, Sigma Aldrich) $200 \mu\text{g/ml}$, preparados como se describió previamente (121) y testeados para probar la ausencia de endotoxinas, durante 4 ó 16 h adicionales.

En los experimentos donde se estudió el impacto del flujo de potasio sobre la secreción de IL- 1β se incubó a los neutrófilos en buffer HSSB (NaCl 140 mM , KCl 5 mM , CaCl_2 $1,25 \text{ mM}$, MgCl_2 $0,6 \text{ mM}$, Na_2HPO_4 $0,3 \text{ mM}$, KH_2PO_4 $0,4 \text{ mM}$, NaHCO_3 $4,2 \text{ mM}$,

glucosa 5 mM, pH 7,4) o con un buffer HSSB modificado, en donde todo el contenido de Na^+ fue reemplazado por K^+ , ambos con 5% SFB (122).

Evaluación de la viabilidad celular

Para determinar la viabilidad de las células sometidas a distintos tratamientos se utilizaron dos técnicas. En una de ellas, las células estimuladas luego de 18 h fueron incubadas con el colorante 7-aminoactinomicina D (7-AAD, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Calbiochem), el cual es permeable a través de las membranas de las células no viables, es decir, aquéllas que sufrieron apoptosis o necrosis. La incorporación de 7-AAD fue monitoreada a través de la detección de la emisión de fluorescencia en el canal FL-3 por citometría de flujo. Se observaron histogramas de 2 picos, uno de baja intensidad de fluorescencia, correspondiente a las células que no incorporaron 7-AAD y otro de alta intensidad, correspondiente a células no viables que sí lo hicieron, sobre el cual se determinó el porcentaje de células correspondiente.

La viabilidad de los neutrófilos a las 18 h de cultivo también fue evaluada por microscopía de fluorescencia mediante el empleo de los agentes intercalantes naranja de acridina y bromuro de etidio (ambos 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se contaron al menos 200 células para determinar el porcentaje de las mismas que había sufrido rasgos morfológicos de apoptosis y necrosis.

Detección de la IL-1 β intra- y extracelular por ELISA

Luego de la estimulación apropiada, los sobrenadantes de 6 ó 18 h de cultivo de neutrófilos fueron recolectados. En algunos casos, se prepararon extractos de los pellets celulares para la detección de IL-1 β utilizando un *buffer* conteniendo Tritón 0,1% e inhibidores de proteasas (Aprotinina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Pepstatina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 Leupeptina $\mu\text{g}/\text{ml}$, AEBSF 1 mM y PMSF 1 mM). En dichas muestras se determinó la concentración de IL-1 β mediante un kit de ELISA (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) específico para IL-1 β (OptEIA, BD Biosciences).

Inmunomarcaciones intracitoplasmáticas de IL-1 β y NALP3

Los neutrófilos estimulados fueron fijados con una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en *buffer* fosfato salino (PBS) toda la noche a 4° C. Luego fueron permeabilizados utilizando *buffer* saponina (saponina 0,05% y BSA 0,5% en PBS para IL-1 β o suero no inmune de cabra 1% para NALP3) durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se bloquearon los grupos aldehído libres que pudieran haber resultado del tratamiento con PFA con glicina 0,1 M durante 10 min a temperatura ambiente. Las muestras donde se procedería a marcar NALP3 se incubaron 30 min adicionales con *buffer* saponina 10% suero de cabra. Todas las incubaciones posteriores con anticuerpos fueron realizadas con el *buffer* saponina correspondiente durante una hora a temperatura ambiente. Para IL-1 β , las células fueron incubadas con un anticuerpo anti-IL-1 β conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) hecho en ratón o con el control de isotipo correspondiente (ambos de BD Biosciences). Luego fueron incubadas con un anticuerpo anti-ratón conjugado a Alexa488 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EEUU) para incrementar la fluorescencia de las muestras positivas. Para NALP3 se incubó con un anticuerpo anti-NALP3 hecho en conejo o con el control de isotipo correspondiente (Epitomics, Burlingame, CA, EEUU) y luego con un anticuerpo anti-IgG de conejo-DyLight488 hecho en cabra (Jackson ImmunoResearch). Se analizó la expresión intracitoplasmática de IL-1 β y NALP3 por citometría de flujo y por microscopía láser confocal (MLC). Para la MLC los neutrófilos marcados con el anticuerpo anti-IL-1 β -FITC fueron lavados con PBS e incubados con yoduro de propidio para teñir el ADN y así visualizar los núcleos. Luego, fueron transferidos a un portaobjetos mediante citocentrifugación. Finalmente, se montaron los preparados utilizando Fluoromont (Sigma Aldrich).

Microscopía láser confocal (MLC)

Los preparados se observaron en un microscopio confocal invertido Olympus Fluoview (Olympus, Tokio, Japón) equipado con un objetivo Plapon 60X/1.42. Las imágenes fueron analizadas mediante el software Olympus FV10-ASW.

Determinación del porcentaje de células con caspasa-1 activada

Los neutrófilos preincubados o no con xantina/xantina oxidasa (X/XO) fueron tratados o no con LPS por 2 h. Luego fueron estimulados o no con ATP o MSU en presencia de un péptido inhibitorio de caspasa-1 acoplado a un derivado de la fluoresceína llamado Flica (Immunochemistry Technologies, MN, EEUU) según las indicaciones del fabricante. Este reactivo se une solamente a la forma activada de la caspasa-1. Luego de 4 h de incubación, los neutrófilos fueron lavados 3 veces con PBS con albúmina sérica humana al 0,5% espaciando los lavados 10 min para quitar el excedente de reactivo. Posteriormente se detectó la emisión de fluorescencia en el canal FL-1 por citometría de flujo, determinándose el porcentaje de células con caspasa-1 activada en condiciones basales y en respuesta a los agonistas. También se analizó la presencia de caspasa-1 activada por MLC. Para ello, las células fueron cultivadas en cámaras con base de borosilicato de 170 μm (Lab-Tek, Nunc, Dinamarca) tratadas con poli-L-lisina 0,01%, y estimuladas como se detalló anteriormente. Luego de la incubación se realizó una marcación de superficie con un anticuerpo anti-CD11b-PE para delimitar la membrana plasmática de los neutrófilos. Finalmente se fijó el preparado con PFA 4% durante la noche a 4° C. Los neutrófilos fueron lavados, incubados con la sonda ToPro 3 (Invitrogen) para teñir el ADN y observados al microscopio confocal.

Análisis por *Western blot* de IL-1 β y de NALP3

Los neutrófilos fueron estimulados como se indica en cada caso. Para la IL-1 β intracitoplasmática y para NALP3 se obtuvieron extractos celulares totales con *buffer* Laemmli (SDS 2%, glicerol 10% y cantidades traza de azul de bromofenol en Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8 final) con β -mercaptoetanol 5%. Para la evaluación de IL-1 β en los sobrenadantes los neutrófilos fueron estimulados en medio con un 2% de SFB para evitar sobrecargar de proteínas al gel en la electroforesis. Luego los sobrenadantes fueron recuperados y preparados con *buffer* Laemmli β -mercaptoetanol 5% final. Todas las muestras fueron calentadas 5 min a 95° C, corridas en geles de acrilamida al 15% en condiciones desnaturizantes y transferidas a membranas de PVDF.

Para la detección de IL-1 β , las membranas fueron incubadas con un anticuerpo dirigido contra IL-1 β hecho en conejo (Cell Signaling Technology, 1:1000); para el análisis de NALP3, con un anticuerpo anti-NALP3 hecho en conejo (Epitomics, 1:1000). Las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano hecho en cabra (BD Pharmingen, 1:4000). La unión fue revelada empleando el reactivo ECL (Amersham Biosciences) mediante quimioluminiscencia y exposición a placa radiográfica. La intensidad de las bandas fue cuantificada utilizando el programa ImageQuant.

Análisis estadístico

La significación estadística de los resultados obtenidos en los estudios de esta tesis fue determinada mediante la prueba de Friedmann y *posttest* de Dunns. También se utilizó para el análisis la prueba no paramétrica pareada de Wilcoxon. Se definió la significancia estadística como $p < 0,05$.

Resultados

Los neutrófilos humanos producen y secretan IL-1 β cuando son estimulados con LPS o MSU, e incrementan la secreción de la misma cuando son tratados primero con LPS y luego estimulados con ATP o MSU

Estudios previos demostraron que los neutrófilos producen IL-1 β (123, 124). No obstante, la relevancia de esta producción fue minimizada dentro de la comunidad científica por la posibilidad de que fueran los monocitos contaminantes en las muestras de neutrófilos los responsables de los niveles de IL-1 β detectados. Por otra parte, como señalamos en la Introducción, diversos grupos de investigación han sostenido que los neutrófilos contribuyen a la generación de IL-1 β activa a través de la liberación de enzimas como la elastasa, la catepsina G y la proteinasa 3, que serían responsables del procesamiento de la proIL-1 β en forma extracelular en los sitios de inflamación. Sin embargo, estos estudios no han establecido claramente que fueran los neutrófilos las células responsables de la síntesis de la proIL-1 β (59, 125).

Con el conocimiento adquirido en años recientes sobre la relevancia del inflammasoma en el mecanismo que conduce a la activación de la caspasa-1 consideramos necesario realizar investigaciones para establecer inequívocamente si los neutrófilos humanos son capaces de producir y liberar la forma activa de la IL-1 β y para determinar cuál es el mecanismo implicado en su liberación.

Como mencionamos en la Introducción, la secreción de IL-1 β requiere de la inducción del gen de proIL-1 β y del procesamiento de esta proforma para generar una molécula con actividad biológica (figura 2). Numerosos modelos experimentales demostraron que el LPS, un agonista del TLR4 (126), es un potente activador de NF- κ B, el cual promueve la transcripción de diversos genes proinflamatorios, incluido el de la proIL-1 β (127). Por otro lado, los cristales de MSU fueron propuestos como una señal de daño generada en microambientes extracelulares por la nucleación del ácido úrico liberado por células que están muriendo o por células sometidas a estrés (128). A su vez, los cristales de MSU se encuentran depositados en las articulaciones de pacientes con gota, ocasionando inflamación aguda y crónica, y constituyendo el agente etiológico de la

enfermedad (121, 129, 130). Trabajos previos señalaron que el ATP puede ser liberado de células dañadas en sitios de inflamación (131). Asimismo, el ATP es liberado por plaquetas activadas o por monocitos y neutrófilos estimulados con agonistas de distintos RRP (132-135). Estos antecedentes nos condujeron a emplear a este conjunto de agonistas con el objeto de evaluar su capacidad de inducir la secreción de IL-1 β por los neutrófilos. Para ello, cultivamos a los neutrófilos en ausencia o presencia de LPS durante 2 h y luego los estimulamos o no con ATP o MSU por 16 h adicionales. Posteriormente determinamos la concentración de IL-1 β en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Como puede observarse en la figura 6A, tanto el LPS como el MSU lograron *per se* estimular la liberación de IL-1 β . A su vez, la combinación de ambos agonistas incrementó marcadamente dicha liberación. El ATP en cambio fue incapaz por sí mismo de estimular la liberación de IL-1 β . Sin embargo, en neutrófilos pretratados con LPS, el ATP estimuló la secreción de niveles superiores a los inducidos solamente por el LPS. Estos resultados indicaron que en neutrófilos el LPS no sólo es capaz de inducir la síntesis de IL-1 β sino también disparar su liberación, al tiempo que señalaron que el MSU es también capaz, en ausencia de primado con LPS, de inducir la síntesis de la proIL-1 β .

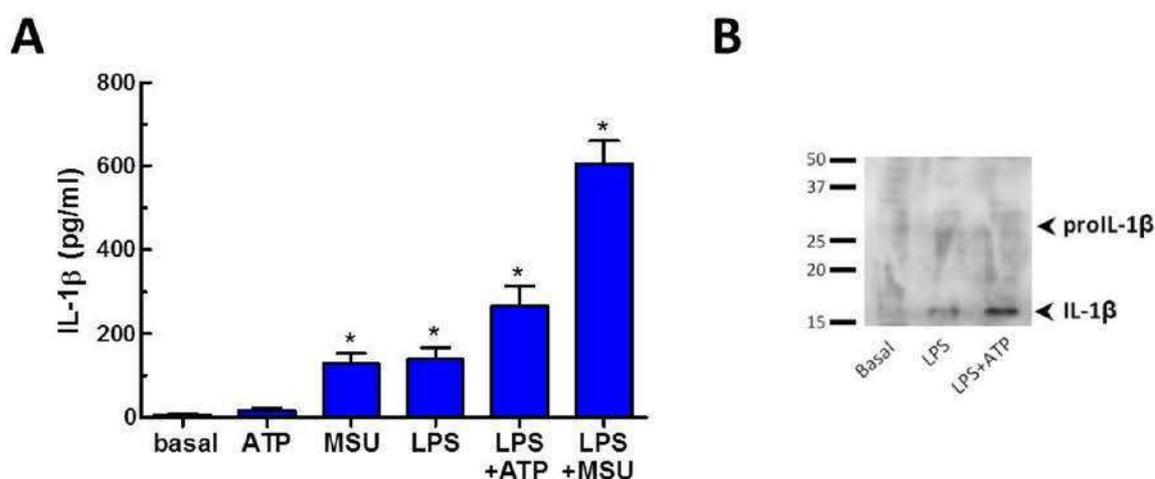


Figura 6 - Secreción de IL-1 β por neutrófilos humanos. Los neutrófilos fueron incubados con o sin LPS 200 ng/ml por 2 h y luego cultivados por 16 h en ausencia o presencia de ATP 2,5 mM o MSU 200 μ g/ml. Posteriormente se recuperaron los sobrenadantes de cultivo y se determinaron las concentraciones de IL-1 β por ELISA (A) o la presencia de señales de la proIL-1 β y la IL-1 β madura por *Western blot* (B). (A) Las barras representan las medias \pm ES de 10 experimentos, * $p < 0,05$. (B) Se muestra un *Western blot* representativo de 4 realizados.

Los anticuerpos de captura de los kits comerciales de ELISA para IL-1 β (incluyendo el empleado por nosotros) son generados inmunizando ratones con un péptido presente en la IL-1 β madura y que muy probablemente es compartido por la proIL-1 β . Este hecho no es explicitado por las empresas que comercializan estos kits ni tampoco es evidenciado en la mayor parte de la literatura. No obstante, cabría la posibilidad de que al evaluar por ELISA la IL-1 β en el sobrenadante de cultivo estuviéramos detectando tanto a la proIL-1 β como a la IL-1 β procesada. Para descartar esta posibilidad realizamos ensayos de *Western blot* de los sobrenadantes de cultivo de neutrófilos estimuladas o no, utilizando un anticuerpo capaz de reconocer a la proIL-1 β y a la forma madura. Estos ensayos indicaron que la forma procesada de la IL-1 β de 17 kDa es la que se encuentra mayoritariamente presente en el sobrenadante de cultivo de neutrófilos estimulados (figura 6B). Merece destacarse que en algunos experimentos se detectó la presencia de una banda muy tenue cuyo peso molecular podría corresponder a la proforma de 31 kDa, sin embargo, en la mayoría de nuestros ensayos la misma no fue evidenciada.

A fin de descartar la posibilidad de que el pequeño número de monocitos que pudiera estar presente en nuestras muestras de neutrófilos purificados fuese responsable de la IL-1 β detectada en los sobrenadantes de cultivo, realizamos experimentos en los que los neutrófilos aislados fueron contaminados con distintas proporciones de monocitos y luego estimulados con los agonistas mencionados. Los resultados obtenidos indicaron que la presencia de hasta 0,5% de monocitos en la preparación de neutrófilos no modificó los niveles de IL-1 β detectada en los sobrenadantes luego de la estimulación (datos no mostrados). En base a estos hallazgos, en todos los estudios realizados en adelante se emplearon preparaciones de neutrófilos conteniendo menos del 0,5% de monocitos.

Con el objetivo de determinar el tiempo óptimo para la detección de IL-1 β en los sobrenadantes de cultivo en respuesta a los agonistas utilizados en este trabajo, evaluamos la producción y liberación de IL-1 β por neutrófilos a las 6 y 18 h postestimulación (cultivo *overnight*). Para ello, transcurrida la incubación recuperamos los sobrenadantes de cultivo y con los *pellets* obtuvimos lisados celulares totales. Luego

determinamos por ELISA la concentración de IL-1 β en el medio extracelular (sobrenadantes) y el contenido de IL-1 β intracelular (extractos celulares).

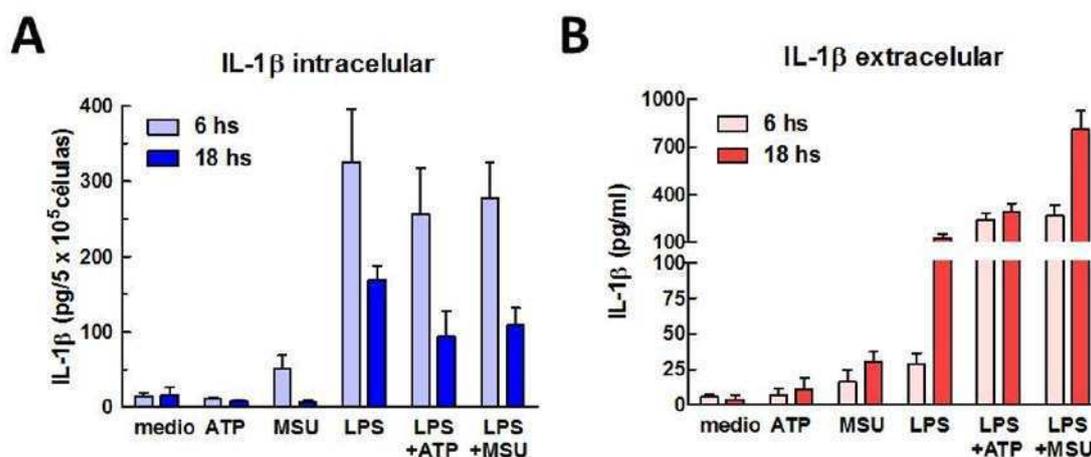
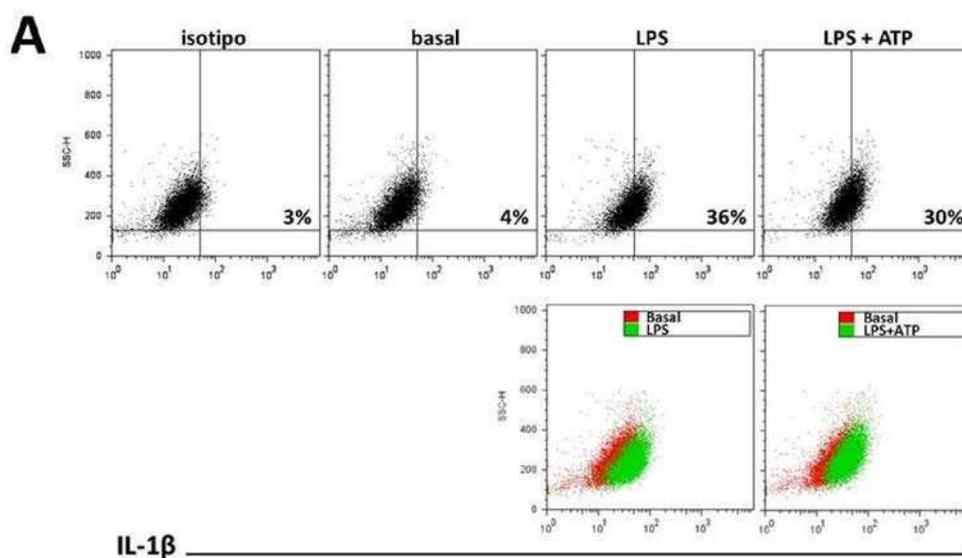


Figura 7 - Producción y liberación de IL-1 β por los neutrófilos humanos a distintos tiempos post-estimulación. Los neutrófilos fueron estimulados o no con LPS 200 ng/ml y luego de 2 h cultivados en presencia o ausencia de ATP 2,5 mM o MSU 200 μ g/ml durante 4 o 16 h adicionales (6 ó 18 h totales). Luego, se recuperaron los sobrenadantes de cultivo, se prepararon extractos celulares totales, y se determinó en ellos la presencia de IL-1 β por ELISA. Las barras representan las medias \pm ES de 5 experimentos.

Como puede observarse en la figura 7A, la inducción de la síntesis de la IL-1 β por el LPS ocurre tempranamente, dado que a las 6 h luego de la estimulación se detectó una cantidad considerable de IL-1 β dentro de las células. No obstante, se observaron diferencias en la cinética de secreción de IL-1 β dependiendo del agonista (figura 7B). La secreción inducida por LPS empleado como único agonista fue máxima a las 18 h postestimulación. Por el contrario, la adición de ATP a neutrófilos pretratados con LPS indujo liberación de IL-1 β en forma más temprana, dado que a las 6 h postestimulación se detectó en el medio extracelular prácticamente el mismo tenor de IL-1 β que a las 18 h. En este caso, el contenido de IL-1 β fue menor a los 18 hs de cultivo, aunque este descenso no se tradujo en un aumento de la IL-1 β detectada en el sobrenadante, hecho que podría ser explicado si frente a estos estímulos, parte de la IL-1 β sintetizada fuese degradada intracelularmente antes de poder ser liberada. La cantidad de IL-1 β liberada en respuesta al LPS+MSU aumentó significativamente luego de 18 h de estimulación respecto de la

observada a las 6 h. En base a estos resultados, los estudios subsiguientes que involucraron la evaluación de la presencia de IL-1 β en los sobrenadantes de cultivo fueron realizados estimulando a los neutrófilos por 18 h, mientras que los ensayos en los que se evaluó la presencia de IL-1 β intracelular fueron realizados luego de 6 horas de estimulación.

Para confirmar inequívocamente que los neutrófilos fueran la fuente de la IL-1 β detectada por ELISA y *Western blot*, se realizó una inmunomarcación intracitoplasmática de la citoquina y se reveló la presencia de células productoras mediante citometría de flujo y MLC (figura 8). La figura 8A muestra la expresión de IL-1 β en la población con parámetros FSC y SSC compatibles con los de células polimorfonucleares. El incremento en la expresión de IL-1 β en respuesta a la estimulación de los neutrófilos con los agonistas fue observado consistentemente en experimentos independientes. Por otro lado, la examinación de las muestras por MLC indicó que las células positivas para IL-1 β presentaban núcleos polilobulados característicos de granulocitos neutrófilos, ratificando que los neutrófilos son las células productoras de IL-1 β en nuestro sistema (Figura 8B).



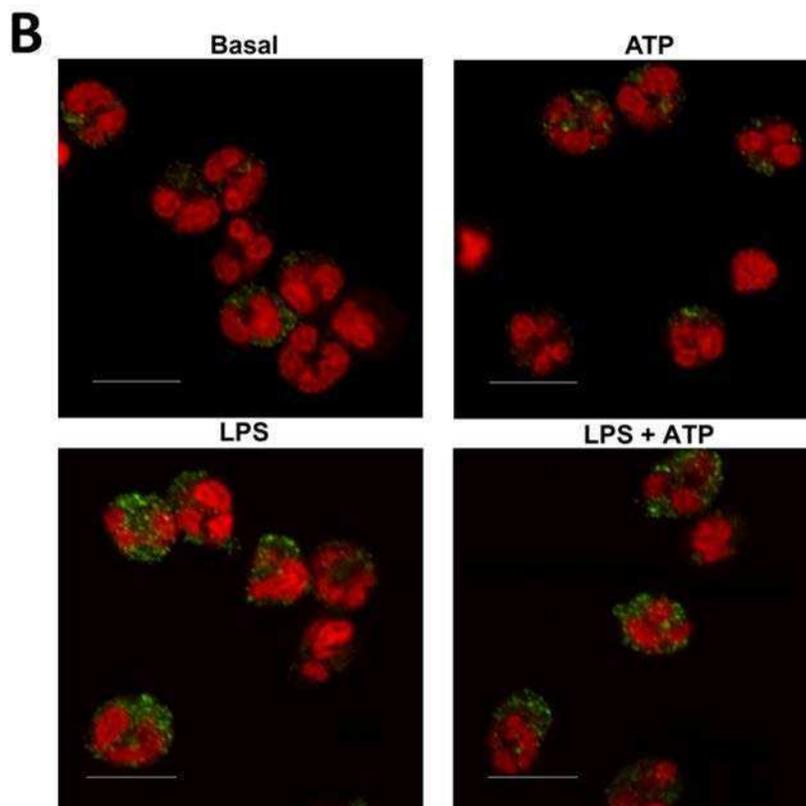


Figura 8 - Los granulocitos neutrófilos constituyen la fuente de IL-1 β dentro de la población de neutrófilos purificados. Los neutrófilos fueron preestimulados con LPS 200 ng/ml o vehículo por 2 h y luego cultivados durante 4 h en ausencia o presencia de ATP 2,5 mM. Las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con un anticuerpo anti-IL-1 β -FITC hecho en ratón (A) o con un anticuerpo anti-IL-1 β -FITC hecho en ratón y luego con un anticuerpo anti-IgG de ratón-conjugado a DyLight 488 (B). La expresión de IL-1 β fue determinada (A) por citometría de flujo en la región correspondiente a células con parámetros FSC y SSC compatibles con los de células polimorfonucleares o (B) por MLC, previa tinción con ioduro de propidio para la visualización de los núcleos. Puede observarse la forma característica del núcleo de los neutrófilos (en rojo) y la presencia de la IL-1 β en el citoplasma (en verde). La barra blanca representa 10 μ m. Los gráficos (A) y las imágenes (B) son representativos de 3 experimentos realizados.

Con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos con neutrófilos aislados de sangre periférica de donadores sanos, realizamos experimentos adicionales empleando la línea celular PLB-985. Esta línea es un clon derivado de la línea HL-60, que a su vez proviene de una leucemia mieloide aguda humana. Estas células fueron diferenciadas a neutrófilos por cultivo en presencia de 0,5% DMF durante 5 días (136) y en adelante serán denominadas neutrófilos PLB-985. Los neutrófilos PLB-985 fueron cultivados en ausencia o presencia de LPS y en combinación con ATP o MSU. Como puede observarse

en la figura 9, los neutrófilos PLB-985 liberaron IL-1 β en respuesta al LPS+MSU y en menor medida frente a LPS y a LPS+ATP. Estos resultados corroboran la capacidad de los neutrófilos de liberar esta citoquina.

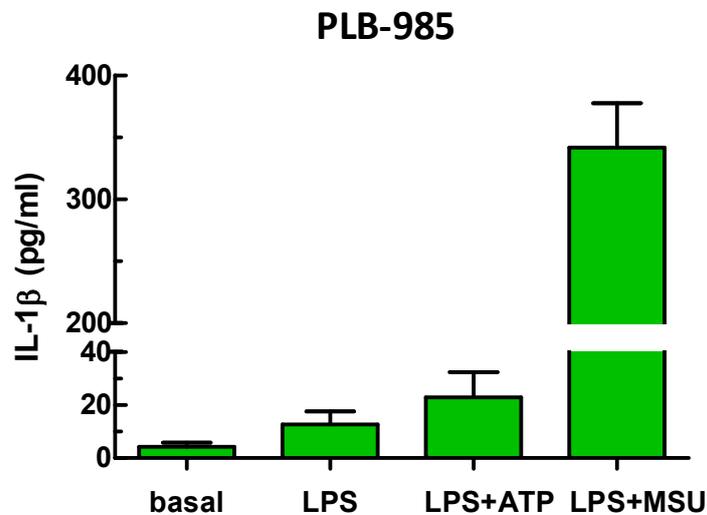


Figura 9 - Secreción de IL-1 β por neutrófilos diferenciados a partir de la línea PLB-985. Los neutrófilos PLB-985 fueron incubados en ausencia o presencia de LPS 200 ng/ml por 2 h y luego cultivados por 16 h en ausencia o presencia de ATP 2,5 mM o MSU 200 μ g/ml. Posteriormente los sobrenadantes de cultivo fueron recuperados y las concentraciones de IL-1 β fueron determinadas por ELISA. Las barras representan las medias \pm ES de 6 experimentos.

La liberación de IL-1 β por neutrófilos involucra la participación de caspasa-1

Estudios previos demostraron la expresión de caspasa-1 en neutrófilos humanos (101). Debido a la controversia mencionada en la Introducción sobre los mecanismos implicados en el procesamiento de la proIL-1 β por el neutrófilo (57, 64, 91, 92, 101, 107), nuestro siguiente objetivo consistió en determinar si la caspasa-1 se encuentra involucrada en la liberación de IL-1 β por neutrófilos estimulados con LPS y en combinación con estímulos inflamatorios estériles. Con este fin, pretratamos a los neutrófilos con el péptido inhibidor de caspasa-1 Ac-YVAD-CMK, cuya acción es específica e irreversible, y luego determinamos la liberación de IL-1 β al sobrenadante de cultivo en respuesta a la estimulación. Como se muestra en la figura 10A, la liberación de IL-1 β

estimulada por el MSU, el LPS, el LPS+ATP y el LPS+MSU disminuyó significativamente en presencia del inhibidor. Obtuvimos resultados similares al utilizar el inhibidor de caspasa-1 Ac-YVAD-AOM (resultados no mostrados).

La inhibición de la secreción de IL-1 β por Ac-YVAD-CMK también fue observada en neutrófilos PLB-985 (figura 10B). Estos resultados sugieren que la caspasa-1 se encuentra involucrada en el mecanismo que conduce a la secreción de IL-1 β por neutrófilos. Sin embargo, la inhibición mediada por Ac-YVAD-CMK no fue completa, por lo que estos resultados no excluyen la posibilidad de que en paralelo puedan operar mecanismos independientes de caspasa-1.

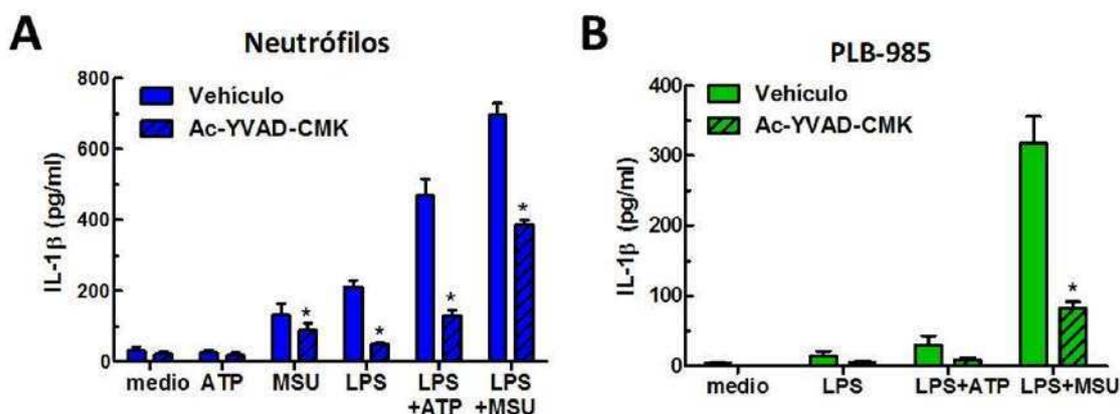
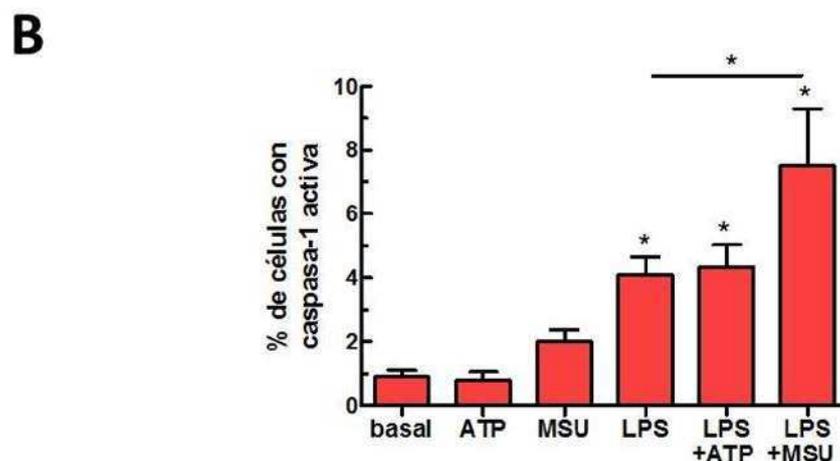
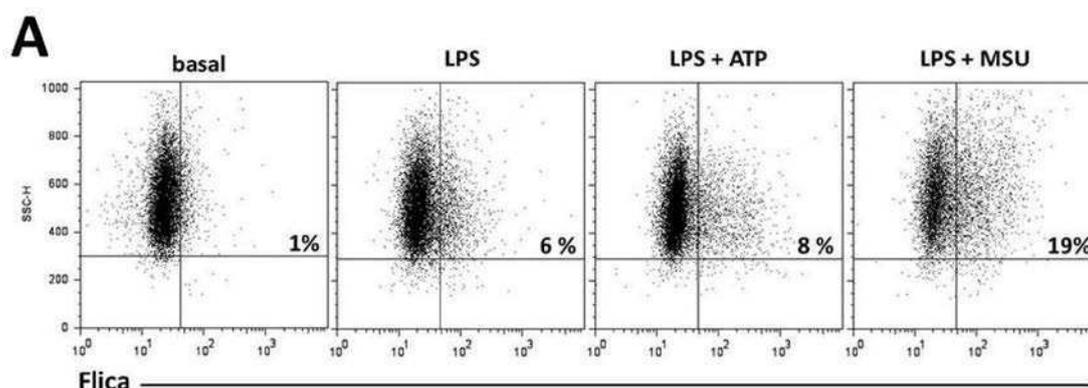


Figura 10 - El péptido inhibidor específico de caspasa-1 Ac-YVAD-CMK inhibe la liberación de IL-1 β por los neutrófilos. Los neutrófilos obtenidos de sangre periférica (A) o neutrófilos PLB-985 (B) fueron pretratados con Ac-YVAD-CMK (N-Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-CMK, 50 μ M) durante 30 min y estimulados o no con LPS por 2 h. Luego fueron cultivados en ausencia o presencia de ATP o MSU durante 16 h. Posteriormente se recuperaron los sobrenadantes de cultivo y se determinó en ellos la concentración de IL-1 β por ELISA. Las barras representan la media \pm ES de 10 y de 4 experimentos (A y B, respectivamente), * $p < 0,05$.

Con el fin de confirmar la activación de la caspasa-1 en respuesta a la estimulación con los agonistas mencionados, realizamos experimentos adicionales empleando el mismo péptido inhibitorio de caspasa-1 utilizado anteriormente, pero en este caso acoplado a un fluoróforo derivado de la fluoresceína (FAM-YVAD-FMK, llamado Flica por *Fluorescent Labeled Inhibitor of Caspase*). Este reactivo se une irreversiblemente sólo a la

forma activa de la caspasa-1, permitiendo identificar por citometría de flujo o MLC a la población celular en la que la enzima se encuentra activada. Como muestran las figuras 11A y 11B, el LPS *per se* indujo un aumento en el porcentaje de células con caspasa-1 activa, el cual fue levemente incrementado por la estimulación adicional de los neutrófilos con ATP. No obstante, como se observa en la figura 11A, la intensidad de fluorescencia exhibida por las células estimuladas con LPS+ATP fue mayor a la emitida por las células estimuladas sólo con LPS, sugiriendo que como consecuencia de la estimulación con ATP, estas células presentan mayor contenido de caspasa-1 activa. La estimulación con LPS en combinación con MSU incrementó marcadamente la activación de la caspasa-1. En la figura 11C puede observarse en el citoplasma de los neutrófilos la presencia de caspasa-1 activa en forma de focos, tal como fuera reportado en otros tipos celulares (137). En conjunto, estos hallazgos son consistentes con la capacidad de los agonistas ensayados de inducir la liberación de IL-1 β a través de un mecanismo que involucra a la caspasa-1.



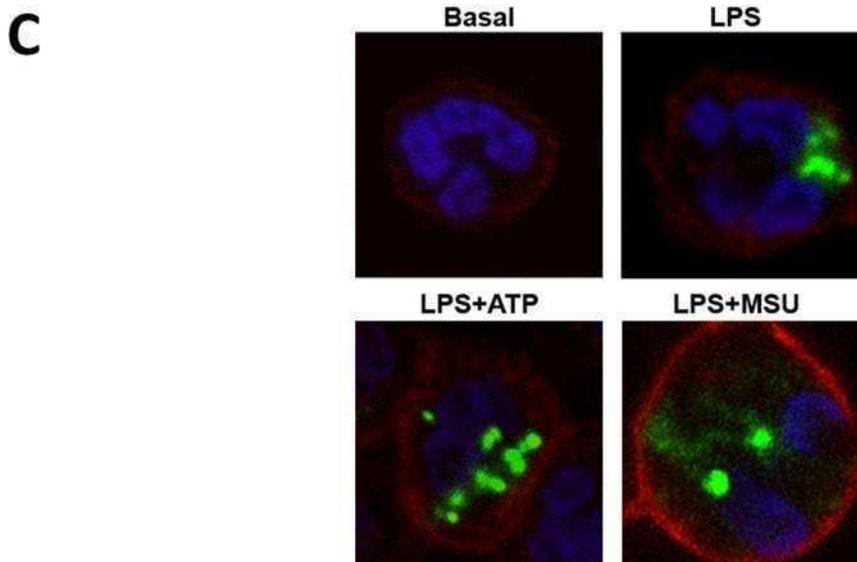


Figura 11 - La secreción de IL-1 β en los neutrófilos involucra la participación de la caspasa-1. Los neutrófilos fueron pretratados o no con LPS por 2 h y luego cultivados 4 h en ausencia o presencia de ATP o MSU conjuntamente con la sonda Flica, la cual se une irreversiblemente a la caspasa-1 activada y se encuentra acoplada a un fluoróforo derivado de la fluoresceína. (A) *Dot plots* correspondientes a un experimento representativo de 8 realizados. (B) Porcentaje de células con caspasa-1 activada determinado por citometría de flujo. Las barras representan la media \pm ES de 8 experimentos, * $p < 0,05$. (C) Imágenes obtenidas por MLC de neutrófilos sin estimular o tratados con LPS, LPS+ATP o LPS+MSU en presencia de la sonda Flica y marcados además con un anticuerpo anti-CD11b conjugado a ficoeritrina con el fin de definir el contorno celular y con ToPro3 para visualizar el ADN. Las micrografías son representativas de 3 experimentos realizados.

Participación de las proteasas del neutrófilo en la secreción de IL-1 β

Estudios previos realizados en macrófagos demostraron que ciertas proteasas intracelulares se encuentran implicadas en la activación del inflammasoma NALP3 (83). Estímulos como los cristales de sílice y de aluminio ocasionan la desestabilización de lisosomas y la consecuente liberación de proteasas al citoplasma, las cuales conducirían a la activación de NALP3, la formación del inflammasoma y la activación de la caspasa-1. Estos estudios adjudicaron a la cisteinproteasa catepsina B la capacidad de inducir la activación de caspasa-1 en macrófagos (83). Los neutrófilos no expresan catepsina B, sin embargo, poseen en sus gránulos un alto contenido de otras serinproteasas como la catepsina G, la elastasa y la PR3. Estas proteasas podrían mediar al procesamiento intracelular de la proIL-1 β , ya sea en forma directa o bien a través de la activación del

inflammasoma NALP3. Con el objeto de determinar si estas enzimas participan en el mecanismo que conduce a la liberación de IL-1 β por neutrófilos, evaluamos el impacto de inhibidores específicos y permeables de la mismas sobre el contenido de IL-1 β extracelular. Como se muestra en la figura 12A, el pretratamiento de neutrófilos con un inhibidor específico de catepsina G no modificó significativamente los niveles de IL-1 β detectada en los sobrenadantes en respuesta a ninguno de los agonistas empleados, desestimando la posibilidad de que esta proteasa se encuentre involucrada en el mecanismo intracelular que conduce a su liberación. Por el contrario, la preincubación de neutrófilos con Elafín, un inhibidor específico y permeable de elastasa y PR3, disminuyó los niveles de IL-1 β en los sobrenadantes de cultivo de neutrófilos estimulados con LPS sólo o en combinación con ATP o MSU (figura 12B). Estos resultados sugieren que la PR3 y/o la elastasa se encuentran involucradas en un mecanismo intracelular que conduce a la liberación de IL-1 β . Nosotros llegamos a esta conclusión sobre la base del conocimiento de que anticuerpo de captura del ELISA puede reconocer tanto a la proforma como a la IL-1 β madura. Por lo tanto, si las serinproteasas ejercieran su actividad sobre proIL-1 extracelular, no se habría evidenciado una disminución en la cantidad de IL-1 β detectada en el sobrenadante en los ELISA, ya que tanto la proIL-1 β como la IL-1 β activa son detectadas en dichos ensayos.

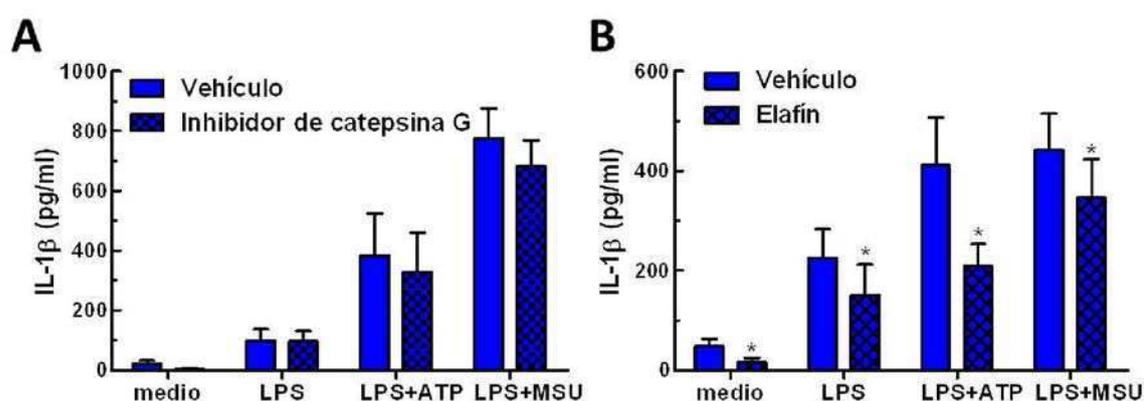


Figura 12 - Participación de serinproteasas del neutrófilo en el mecanismo que lleva al procesamiento de la proIL-1 β . Los neutrófilos fueron preincubados con vehículo, con el inhibidor permeable I de catepsina G (10 μ M) (A) o con Elafin (10 μ M) (B) durante 30 min. Luego fueron cultivados en presencia o ausencia de LPS durante 2 h. Posteriormente fueron estimulados o no con ATP o MSU durante 16 h y la IL-1 β secretada a los sobrenadantes de cultivo fue determinada por ELISA. Las barras representan la media \pm ES de 4 (A) y 6 (B) experimentos, * $p < 0,05$.

Cuando los neutrófilos fueron estimulados con MSU y más aún cuando fueron pretratados con LPS y luego estimulados con MSU, observamos la presencia de agregados celulares que sugerían la formación de NETs. Nosotros confirmamos por microscopía confocal la presencia de las mismas (datos no mostrados), sugiriendo que en parte la IL-1 β detectada en los sobrenadantes de neutrófilos estimulados con MSU podría ser liberada en forma inespecífica cuando las células sufren NETosis. Esto podría explicar por qué tanto el inhibidor de caspasa-1 como el Elafín redujeron en menor proporción la cantidad de IL-1 β detectada en sobrenadantes de neutrófilos estimulados con LPS+MSU que lo que lo hicieron frente a la estimulación con LPS o LPS+ATP.

Teniendo en cuenta que la liberación de IL-1 β inducida por MSU podía encontrarse influenciada por la ruptura celular por NETosis, decidimos continuar nuestros estudios sobre los mecanismos de controlan la secreción de IL-1 β por neutrófilos empleando como agonistas al LPS y al LPS+ATP. Cabe aclarar que, la estimulación con LPS o LPS+ATP no disminuyó la viabilidad de los neutrófilos (figura 13), sino que, por el contrario, aumentó su sobrevivencia, como era esperado en función del rol antiapoptótico ampliamente descrito para el LPS y el ATP en el neutrófilo (138, 139). En la mayor parte de los experimentos subsiguientes, el ATP sólo no fue empleado como agonista debido a que no induce *per se* la síntesis de la proIL-1 β y en consecuencia es incapaz de inducir la secreción de IL-1 β .

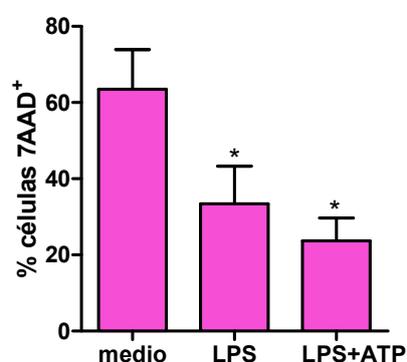


Figura 13 – Evaluación de la viabilidad de los neutrófilos estimulados con LPS y con LPS+ATP. Los neutrófilos fueron estimulados o no con LPS por 2 h y luego incubados o no con ATP por 16 h. Posteriormente, las células fueron incubadas con 7-aminoactinomicina D (7AAD) y el porcentaje de células que incorporó el colorante (no viables) fue determinado por citometría de flujo. Las barras representan la media \pm ES de 4 experimentos, * $p < 0,05$.

Los IRO producidos por la NADPH oxidasa son requeridos para la liberación de IL-1 β por los neutrófilos

Como mencionamos en la Introducción, los neutrófilos constituyen los leucocitos con capacidad de producir los mayores niveles de IRO. Esta capacidad es consecuencia de la activación de la enzima NADPH oxidasa que cataliza la reducción univalente del oxígeno molecular para generar anión superóxido. Se ha demostrado que numerosos estímulos son capaces de estimular la producción de IRO por los neutrófilos. Por este motivo, y considerando las controversias planteadas en la literatura respecto del rol de los IRO en los mecanismos que conducen a la secreción de IL-1 β en otros tipos celulares, decidimos investigar el papel que cumplen los mismos en la liberación de IL-1 β por neutrófilos. Con este objetivo, en primer lugar evaluamos la capacidad de liberar IL-1 β de los neutrófilos de pacientes con ECG-X deficientes en gp91^{phox}, cuyos fagocitos carecen completamente de actividad NADPH oxidasa (17). Como muestra la figura 14, la liberación de IL-1 β por neutrófilos ECG-X se encontró fuertemente disminuida en comparación a la exhibida por neutrófilos de donantes sanos. Estos resultados demuestran que los IRO producidos a expensas de la activación de la NADPH oxidasa cumplen un rol no redundante en el mecanismo que conduce a la liberación de IL-1 β .

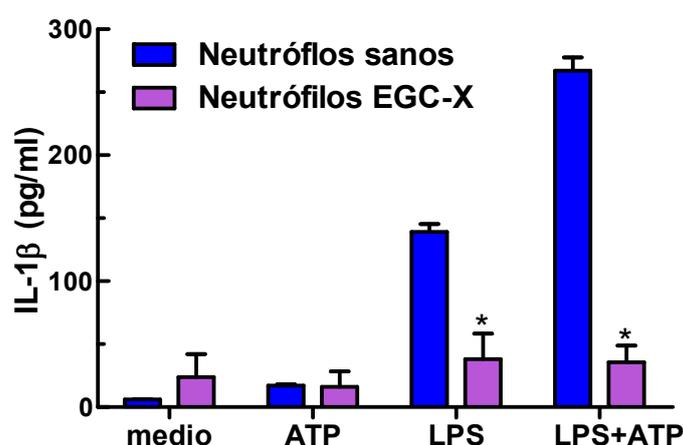


Figura 14 - Secreción de IL-1 β por neutrófilos de pacientes con ECG-X y de dadores sanos. Los neutrófilos fueron preincubados o no con LPS por 2 h y luego estimulados con vehículo o ATP durante 16 h. Posteriormente la concentración de IL- β liberada al sobrenadante fue determinada por ELISA. Las barras representan la media \pm ES de los niveles de IL-1 β liberados por neutrófilos de 5 pacientes ECG-X y de 5 dadores sanos, *p<0,05 vs igual estímulo en dadores sanos.

Para corroborar el rol de los IRO en la secreción de IL-1 β , evaluamos el efecto del agregado de apocinina, un inhibidor específico de la NADPH oxidasa de los fagocitos, sobre la liberación de IL-1 β (140, 141). Al preincubar a los neutrófilos provenientes de dadores sanos con esta droga, la liberación de IL-1 β fue inhibida significativamente (figura 15). Cabe aclarar que la viabilidad celular evaluada por citometría de flujo con el colorante 7-AAD no resultó afectada por el tratamiento con apocinina (datos no mostrados).

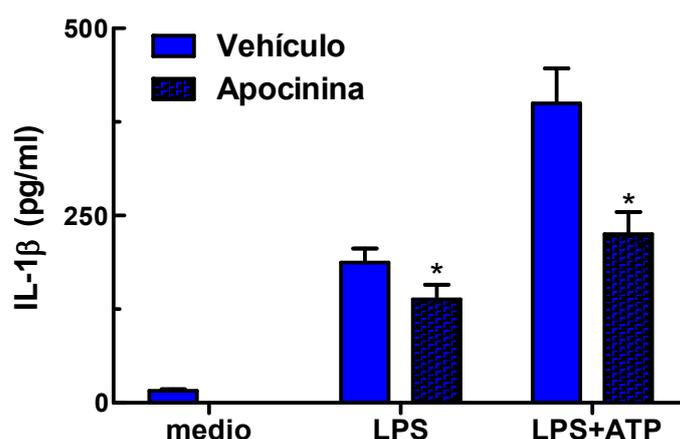


Figura 15 - La apocinina, un inhibidor específico de la NADPH oxidasa, inhibe la liberación de IL-1 β por neutrófilos humanos. Los neutrófilos fueron pretratados con apocinina 0,1 mM durante 30 min, cultivados en ausencia o presencia de LPS por 2 h y luego estimulados o no con ATP por 16 h. Posteriormente la concentración de IL-1 β en los sobrenadantes de cultivo fue determinada por ELISA. Las barras representan la media \pm ES de 8 experimentos.

Dado que estos experimentos fueron realizados cultivando a los neutrófilos 2 h en presencia de LPS y luego estimulados con ATP, y teniendo en cuenta que el LPS es capaz *per se* de inducir la secreción de IL-1 β , nosotros razonamos que los IRO requeridos para la liberación de IL-1 β deberían estar siendo inducidos por el LPS. Para corroborar esta presunción, determinamos la producción de IRO en respuesta a LPS, empleando DHR-123 y citometría de flujo. Como puede observarse en la figura 16, el LPS estimuló en forma leve pero consistente la producción de IRO por neutrófilos.

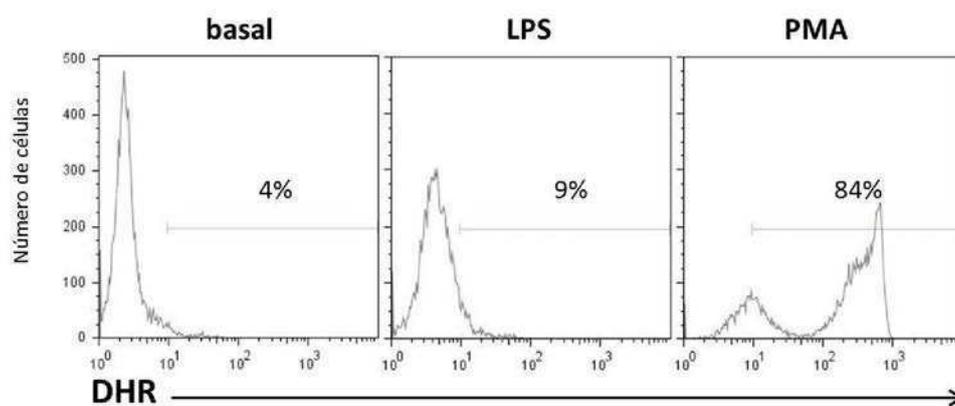


Figura 16. El LPS estimula la producción de IRO en los neutrófilos. Los neutrófilos fueron cargados con DHR-123 y luego estimulados con LPS durante 30 min. Posteriormente se determinó por citometría de flujo la fluorescencia emitida por la rodamina generada tras la oxidación de la DHR-123 por los IRO. Como control positivo se determinó en paralelo la respuesta inducida por una alta concentración de PMA (100 ng/ml), el agonista más potente conocido de la producción de IRO por neutrófilos. La figura muestra un experimento representativo de 5 realizados.

Con el fin de confirmar los hallazgos realizados con los neutrófilos de pacientes ECG-X que indicaron que los IRO son requeridos para la liberación de IL-1 β , realizamos experimentos adicionales empleando neutrófilos diferenciados de la línea PLB-985, neutrófilos diferenciados a partir de una línea PLB-985 en la cual el gen de la subunidad gp91^{phox} de la NADPH oxidasa ha sido eliminado (PLB *knockout*; PLB-KO) y neutrófilos diferenciados a partir de una línea PLB-985 *knockout* recuperada con una copia funcional del gen de la gp91^{phox} (PLB-91). En acuerdo con los resultados obtenidos con los neutrófilos de pacientes ECG-X, al ser estimulados con LPS en combinación con ATP los neutrófilos PLB-KO liberaron niveles marcadamente menores de IL-1 β que los neutrófilos PLB-985 (figura 17). Los neutrófilos PLB-91, por el contrario, secretaron niveles de IL-1 β similares a los neutrófilos PLB-985 al ser estimulados con LPS+ATP.

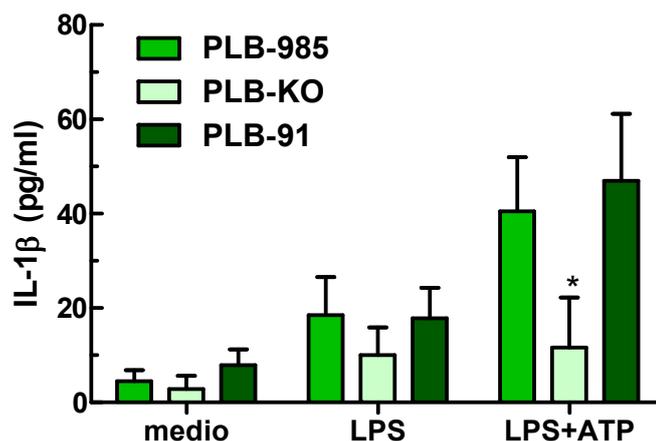


Figura 17 - Liberación de IL-1 β por neutrófilos diferenciados de las líneas PLB-985, PLB-KO y PLB-91. Las distintas líneas fueron diferenciadas a neutrófilos por cultivo durante 5 días en presencia de DMF. Luego fueron incubadas con LPS por 2 h y estimuladas 16 h adicionales con ATP. Posteriormente, los sobrenadantes fueron colectados y la concentración de IL-1 β fue determinada por ELISA. Las barras representan la media \pm ES de 4 experimentos, * $p < 0,05$ vs igual estímulo en neutrófilos PLB-985.

Los resultados obtenidos indicaron que tanto los neutrófilos de los pacientes con EGC-X como los neutrófilos PLB-KO liberaron cantidades muy reducidas de IL-1 β en respuesta a LPS y LPS+ATP respecto de sus contrapartes con una NADPH oxidasa funcional (figuras 14 y 17). Dada la compleja regulación de la secreción de IL-1 β pormenorizada en la Introducción, esta menor capacidad de secretar IL-1 β podría deberse a una menor síntesis del precursor, a una menor capacidad de procesamiento de la proIL-1 β o a un defecto en la secreción de la IL-1 β madura.

Para dilucidar este aspecto, evaluamos la expresión intracitoplasmática de IL-1 β en neutrófilos PLB-985 y PLB-KO. Como puede observarse, el contenido intracitoplasmático de IL-1 β en los neutrófilos PLB-KO estimulados con todos los agonistas fue mayor que el detectado en neutrófilos PLB-985 (figura 18). Estos resultados indicaron que la deficiencia en la NADPH oxidasa no afecta la capacidad de las células de sintetizar la proIL-1 β y son consistentes con la hipótesis de que las células incapaces de producir IRO presentan un defecto en el procesamiento y/o la secreción de IL-1 β .

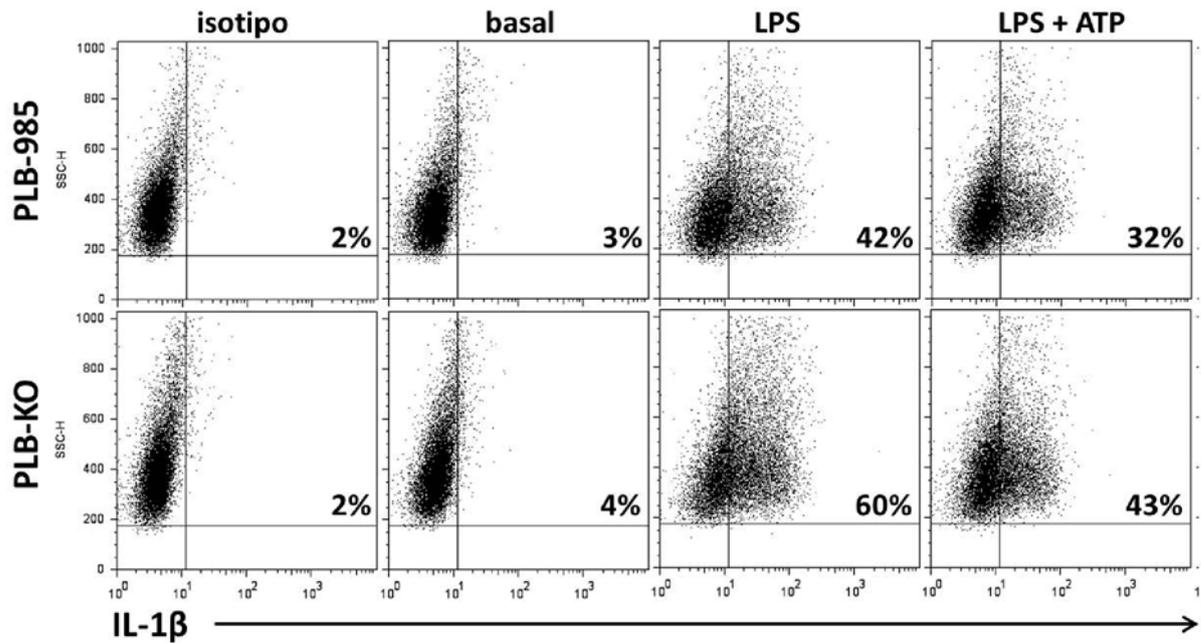


Figura 18 - Los neutrófilos PLB-KO estimulados poseen un mayor contenido de IL-1 β intracitoplasmático que los neutrófilos PLB-985. Los neutrófilos PLB-985 y PLB-KO fueron tratados 2 hs con LPS y estimulados con ATP por 4 h adicionales. Luego fueron fijados y la IL-1 β intracitoplasmática fue detectada por inmunomarcación y citometría de flujo. Los gráficos corresponden a *dot plots* de granularidad (SSC-H) vs expresión de IL-1 β . Los cuadrantes fueron definidos en función al control de isotipo. Los porcentajes indicados pertenecen al cuadrante superior derecho de cada *dot plot*. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados.

Como ya hemos mencionado, la literatura refiere que el procesamiento de la proIL-1 β se encuentra acoplado a su secreción (98), por lo tanto nosotros razonamos que la IL-1 β intracitoplasmática detectada correspondería a la proforma de la citoquina y pensamos que los IRO deberían ser requeridos para activar al inflamasoma y en consecuencia para activar el procesamiento de la proIL-1 β vía caspasa-1. Estudios recientes realizados en macrófagos murinos indicaron que los IRO producidos por el *priming* con LPS son indispensables para inducir la expresión de NALP3 y consecuentemente para la activación de la caspasa-1 y secreción de IL-1 β en dichas células (142). Los autores señalaron que en macrófagos la activación del inflamasoma requiere de los IRO porque NALP3 es expresado a niveles limitantes. Nosotros hipotetizamos que los IRO producidos por la NADPH oxidasa serían requeridos para la secreción de IL-1 β por neutrófilos porque serían necesarios para inducir/incrementar la expresión de NALP3 en neutrófilos (142, 143). Para testear esta hipótesis, determinamos

la expresión de NALP3 por inmunomarcación intracitoplasmática y citometría de flujo en neutrófilos estimulados o no con LPS. Aun cuando la estimulación con LPS indujo un sutil incremento en la expresión de NALP3 (figura 19), las leves diferencias en el nivel de expresión de esta molécula por acción del LPS sugieren que la estimulación de la secreción de IL-1 β por acción de los IRO no se debe a un efecto inductor de la expresión de NALP3. Esta conclusión es sustentada además por la observación indicando que los neutrófilos PLB-KO expresaron niveles basales de NALP3 mayores a los exhibidos por neutrófilos PLB-985 y casi un orden de magnitud superiores a los de los neutrófilos primarios y a pesar de ello, exhibieron una secreción de IL-1 β defectuosa al ser estimulados con los agonistas (figura 19).

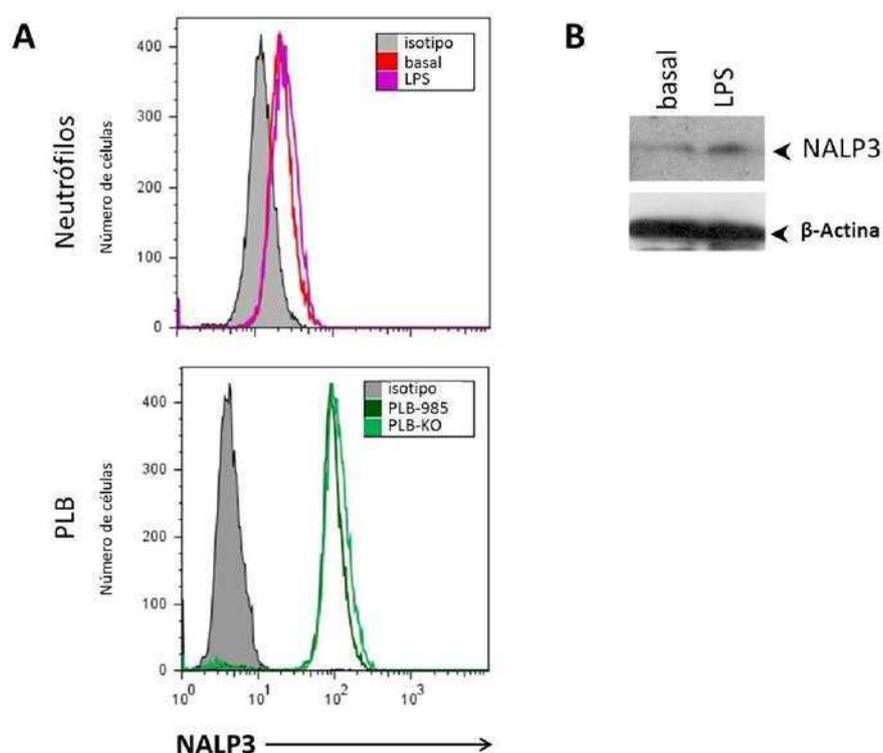


Figura 19 – El efecto promotor de la liberación de IL-1 β de los IRO no sería ejercido a través de la inducción de NALP3. (A) Los neutrófilos primarios estimulados o no durante 4 h con LPS (gráfico superior) y los neutrófilos PLB-985 y PLB-KO sin estimular (gráfico inferior), fueron fijados y la expresión de NALP3 fue determinada por inmunomarcación intracitoplasmática y citometría de flujo. Los gráficos son representativos de 3 experimentos realizados. (B) Los neutrófilos primarios fueron estimulados o no durante 4 h con LPS y luego se obtuvieron lisados celulares totales. Se analizó por *Western blot* la presencia de NALP3. Se muestra un experimento representativo de 2 realizados.

Con el fin de determinar si los IRO son requeridos para disparar la activación del inflammasoma, evaluamos la activación de caspasa-1 en los neutrófilos PLB-KO. Sorprendentemente, estas células no sólo fueron capaces de activar a la caspasa-1 sino que además, exhibieron mayores niveles de activación que las PLB-985 (figura 20). Estos resultados indicaron que células incapaces de producir IRO por la NADPH oxidasa son todavía capaces de inducir la activación de caspasa-1. En acuerdo con estos hallazgos, observamos en ensayos de *Western blot* de lisados celulares totales, que los neutrófilos PLB-KO al igual que los PLB-985, contuvieron principalmente la isoforma activa de la IL-1 β (Figura 19B). Estos resultados indicaron que la deficiencia en la NADPH oxidasa no afecta al procesamiento de la proIL-1 β . En conjunto, nuestros hallazgos sugieren que en neutrófilos los IRO no son necesarios para inducir la activación del inflammasoma pero son requeridos para activar un mecanismo involucrado en la liberación de la citoquina madura de la célula.

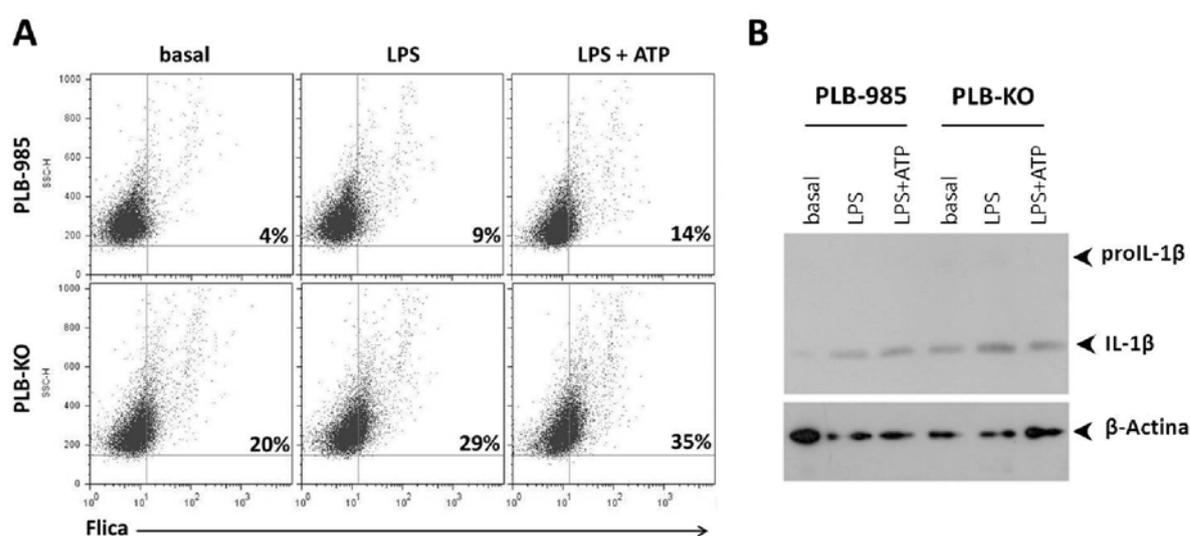


Figura 20. En neutrófilos deficientes en la NADPH oxidasa la caspasa-1 es funcional y el procesamiento de la IL-1 β no se encuentra afectado. Los neutrófilos PLB-985 y PLB-KO fueron incubados por 2 h con LPS y luego estimulados o no con ATP en presencia de FliC (en el caso de A). Luego de 4 h se determinó el porcentaje de células con caspasa-1 activa por citometría de flujo (A) o se obtuvieron extractos proteicos totales que fueron analizados por *Western blot* para detectar la presencia de IL-1 β (B). Se muestran experimentos representativos de 3 realizados.

Dado que luego de la estimulación de los neutrófilos PLB-KO con LPS y LPS+ATP, estas células exhibieron IL-1 β madura en su interior (figura 18), nosotros razonamos que

el agregado exógeno de IRO luego de la estimulación con los agonistas podría activar el mecanismo de liberación regulado por IRO, contribuyendo a secretar la IL-1 β activa. Con el fin de evaluar esta posibilidad, realizamos experimentos adicionales en los que luego de estimular a los neutrófilos PLB-KO durante 6 h con los agonistas se incorporó al cultivo el sistema generador de O $_2^-$ compuesto por la enzima xantina oxidasa y su sustrato, la xantina (X/XO). Tal como esperábamos, el agregado de anión superóxido incrementó marcadamente la secreción de IL-1 β por estas células (figura 21). Obtuvimos resultados similares con neutrófilos PLB-985 (datos no mostrados). En conjunto nuestros hallazgos evidencian la existencia de un paso regulado positivamente por IRO nunca antes descrito, involucrado en la secreción de la IL-1 β activa.

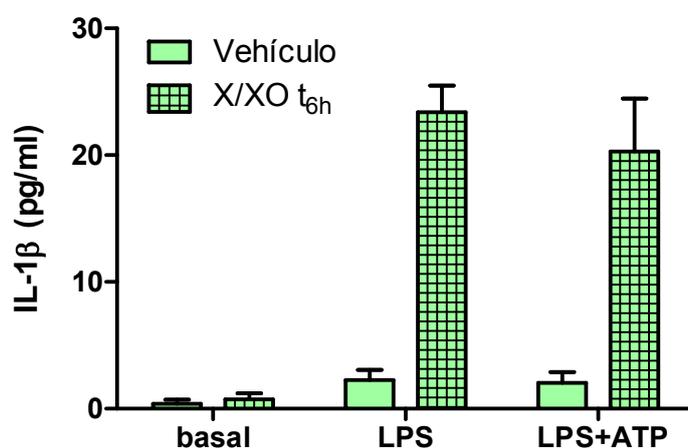


Figura 21 – El agregado de O $_2^-$ a los neutrófilos deficientes en la NADPH oxidasa luego de su estimulación aumenta su capacidad de liberar IL-1 β . Los neutrófilos PLB-KO fueron estimulados o no 2 h con LPS y luego 4 h con ATP. Luego se les agregó el sistema generador de O $_2^-$: xantina 0,75 mM y xantina oxidasa 1 U/ μ l (X/XO t_{6h}). Las células se cultivaron por 12 horas adicionales y finalmente se recuperaron los sobrenadantes y se determinó la presencia de IL-1 β por ELISA. Las barras representan la media \pm ES de 4 experimentos.

Los IRO también ejercen un rol regulatorio negativo sobre la liberación de IL-1 β por neutrófilos

En los experimentos descritos arriba, el agregado de X/XO luego de 6 h de estimulación con LPS o LPS+ATP nos permitió desacoplar el procesamiento de la proIL-1 β del paso de secreción de la forma madura regulable por IRO. Estudios previos realizados en monocitos y macrófagos demostraron que la actividad de la caspasa-1 es regulada

negativamente por oxidación en cisteína (80). Teniendo en cuenta que el procesamiento de la proIL-1 β por la caspasa-1 es un evento previo al de liberación de la forma madura regulable positivamente por IRO, decidimos evaluar el impacto del agregado exógeno de anión superóxido previo a la estimulación de los neutrófilos. Como se observa en la figura 22A, el agregado de O₂⁻ inhibió la secreción de IL-1 β por los neutrófilos. Esta disminución en la liberación de IL-1 β no se debió a una pérdida de la viabilidad celular, dado que la incubación con X/XO no modificó significativamente el porcentaje de células que incorporaron 7-AAD (figura 22B). En acuerdo con la posibilidad de que los IRO ejercieran un rol inhibitorio de la caspasa-1, el agregado de X/XO previo a la estimulación de neutrófilos EGC-X no modificó los niveles de IL-1 β liberados a los sobrenadantes (figura 22C).

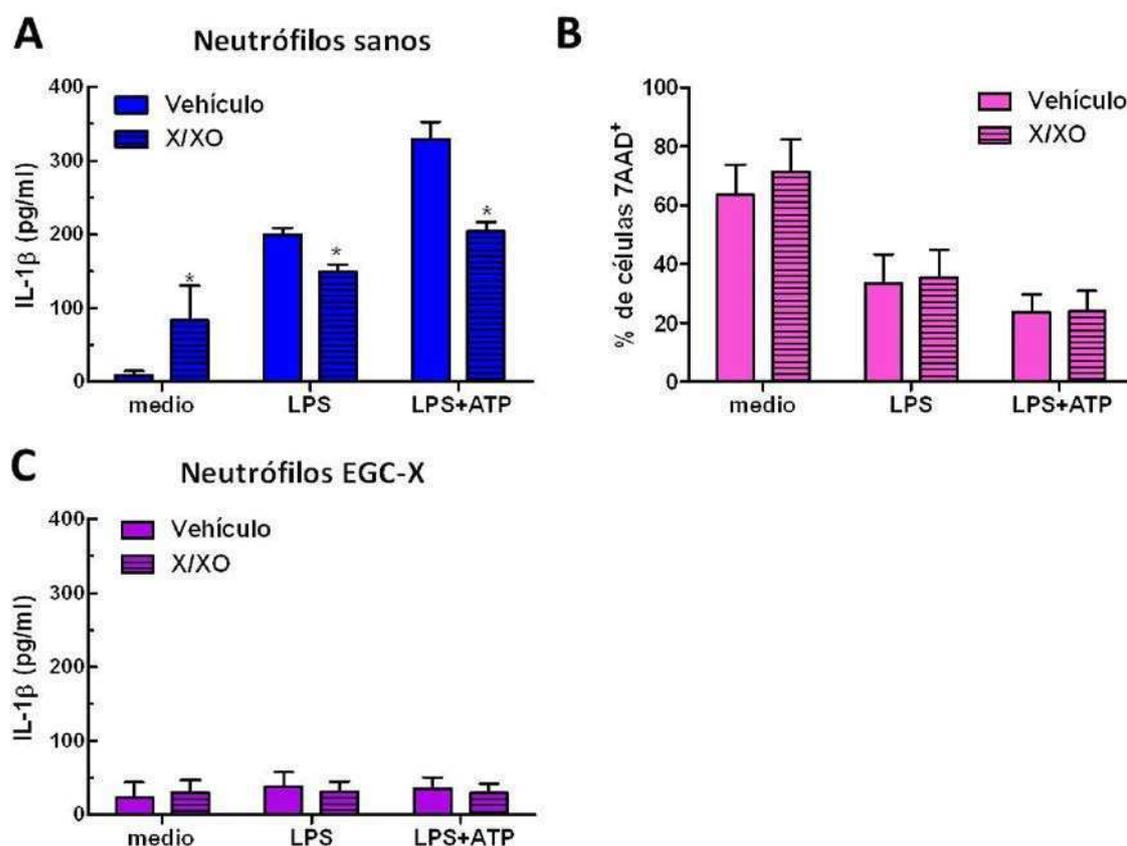


Figura 22 - El aporte exógeno de O₂⁻ previo a la estimulación inhibe la secreción de IL-1 β por neutrófilos humanos. Los neutrófilos de donantes sanos (A y B) o de pacientes EGC-X (C) fueron preincubados o no con X/XO durante 30 min. Luego fueron incubados o no con LPS por 2 h y estimulados con vehículo o ATP por 16 h adicionales. Se determinó la concentración de IL-1 β en los sobrenadantes de cultivo por ELISA (A y C) y la muerte celular por la incorporación del colorante 7-AAD y citometría de flujo. Las barras representan la media \pm ES de 8, 3 y 5 experimentos para A, B y C, respectivamente.

En concordancia con los resultados obtenidos en neutrófilos primarios, el superóxido adicionado previo a la estimulación con LPS o LPS+ATP, también redujo la liberación de IL-1 β por neutrófilos PLB-985 y PLB-KO (figura 23 A y B).

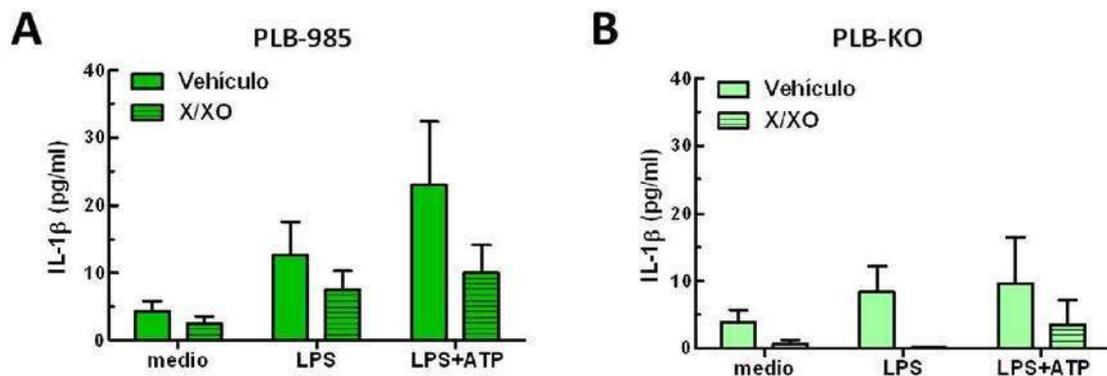


Figura 23 - El aporte exógeno de O₂⁻ previo a la estimulación inhibe la secreción de IL-1 β por neutrófilos diferenciados de las líneas PLB-985 y PLB-KO. Los neutrófilos PLB-985 (A) o PLB-KO (B) fueron preincubados con X/XO 1 U/ μ l durante 30 min. Luego fueron incubados con LPS por 2 h y estimulados con vehículo o ATP por 16 h adicionales. Posteriormente la concentración de IL-1 β en los sobrenadantes de cultivo fue determinada por ELISA. Las barras representan la media \pm ES de 4 experimentos.

En conjunto, estos hallazgos podrían ser explicados si los IRO ejercieran, tal como se postuló previamente, un rol inhibitorio de los IRO sobre la actividad de la caspasa-1. Para evaluar esta posibilidad, determinamos el impacto del aporte exógeno de O₂⁻ sobre la actividad de dicha enzima monitoreada por Flica. Como se observa en la figura 24, el porcentaje de células presentando caspasa-1 activa disminuyó cuando los neutrófilos fueron preincubados con X/XO y luego cultivados con LPS y estimulados o no con ATP. Estos hallazgos, en conjunto con las observaciones registradas en la figura 20 indicando que los neutrófilos PLB-KO incapaces de producir IRO, exhibieron un mayor porcentaje de células con caspasa-1 activa que los PLB-985, sugieren que los IRO regulan negativamente la actividad de la caspasa-1.

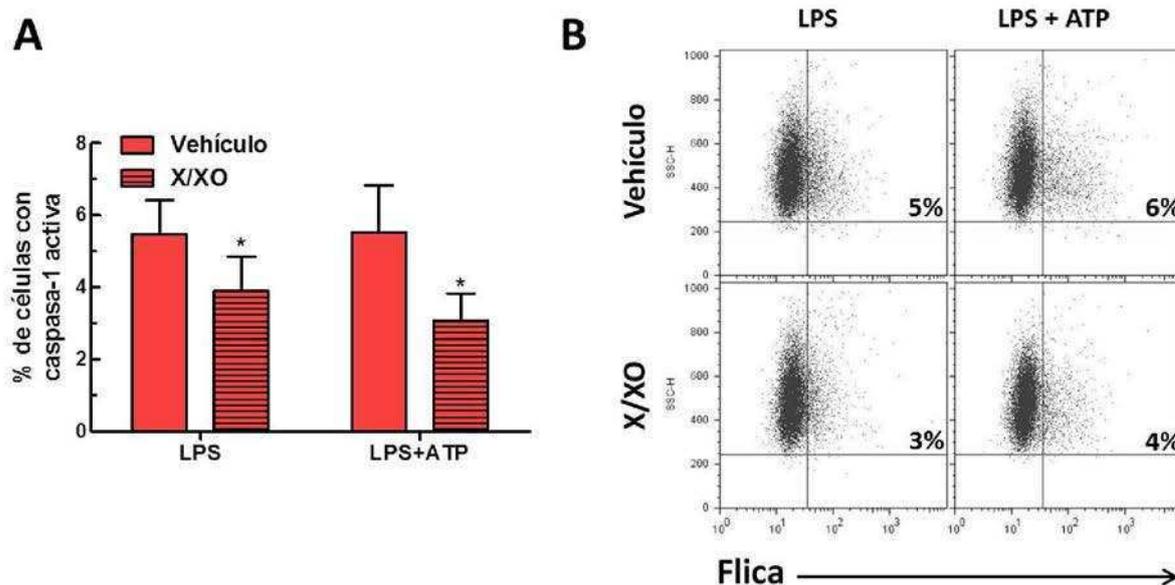


Figura 24 - Efecto del agregado de O_2^- en la activación de caspasa-1 en neutrófilos estimulados. Los neutrófilos fueron preincubados con X/XO durante 30 min y luego estimulados con LPS durante 2 h. Posteriormente fueron cultivados en presencia o ausencia de ATP y el reactivo Flica por 4 h adicionales, tras las cuales se determinó el porcentaje de células con caspasa-1 activa por citometría de flujo. (A) Las barras representan las medias \pm ES de 6 experimentos, (B) se muestra un experimento representativo * $p < 0,05$.

La X/XO constituye un sistema generador de O_2^- . Como mencionamos en la Introducción, el anión superóxido puede ser dismutado a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por acción de la SOD. Con el fin de profundizar el conocimiento de la especie derivada del oxígeno responsable de la regulación de la caspasa-1, evaluamos el impacto del agregado exógeno de H_2O_2 a neutrófilos cultivados con LPS y estimulados o no con ATP, sobre la secreción de IL-1 β . Como puede observarse, el H_2O_2 no modificó significativamente los niveles de IL-1 β liberada en respuesta a los agonistas mencionados (figura 25). Tampoco lo hicieron concentraciones 10 veces mayores y diez veces menores a las empleadas en dichos experimentos (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que el H_2O_2 no estaría directamente involucrado en la regulación de la secreción de IL-1 β , y sustentan un rol para el anión superóxido en este mecanismo.

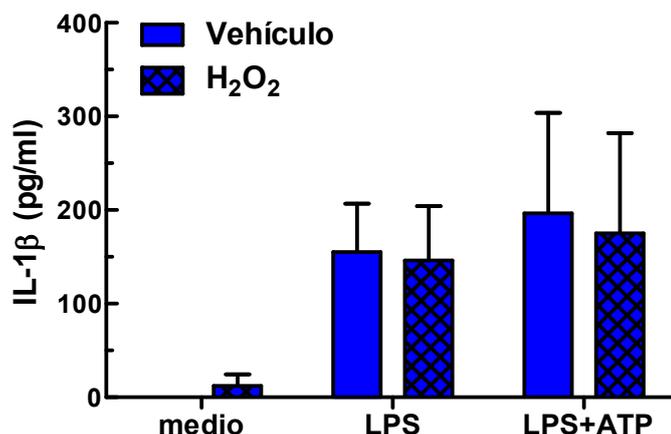


Figura 25 - El agregado de H₂O₂ no afecta la liberación de IL-1 β por los neutrófilos. Los neutrófilos fueron preincubados con H₂O₂ 10 μ M durante 30 min y luego tratados con LPS por 2h. Posteriormente fueron estimulados con medio o ATP por 16 h, tras las cuales se determinó la concentración de IL-1 β en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Las barras representan las medias de cada tratamiento \pm ES de 3 experimentos.

Nosotros especulamos que el incremento en el contenido de anión superóxido actuaría como un mecanismo de retroalimentación negativo, controlando la liberación IL-1 β . Si nuestra especulación fuese correcta, agentes capaces de modular el balance rédox intracelular deberían ser capaces de modular la secreción de IL-1 β .

Usualmente, las células se encuentran protegidas del efecto deletéreo de los IRO por la acción de enzimas antioxidantes y por moléculas pequeñas que actúan como *scavengers* de IRO. Estos *scavengers* se encuentran en altas concentraciones intracelulares, por lo que la probabilidad de que los IRO reaccionen con ellos es mucho mayor que aquélla de que reaccionen con blancos celulares. El glutatión es un tripéptido que se encuentra presente en altas concentraciones dentro de las células y constituye uno de los sistemas antioxidantes más relevantes. En el contexto de nuestros resultados previos, nosotros razonamos que si los IRO ejercieran un efecto regulador negativo en la liberación de IL-1 β actuando sobre la caspasa-1, el pretratamiento de neutrófilos con butioninsulfoximina (BSO), un inhibidor de la síntesis de glutatión que disminuye su disponibilidad e incrementa el tenor de IRO intracelular, debería reducir la liberación de IL-1 β .

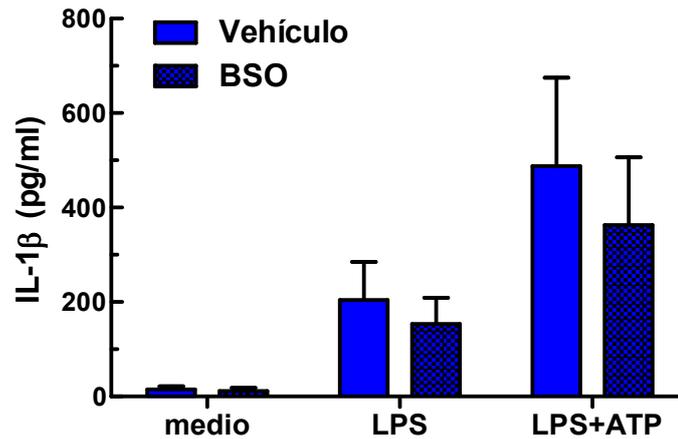


Figura 26 - La liberación de IL-1 β es parcialmente inhibida en un estado rédox oxidativo. Los neutrófilos fueron preincubados con BSO 200 μ M durante 30 min. Luego fueron cultivados en presencia o ausencia de LPS por 2 h y finalmente estimulados con ATP por 16 h adicionales. Posteriormente los sobrenadantes fueron recuperados y la concentración de IL-1 β fue determinada por ELISA. Las barras representan las medias de cada tratamiento \pm ES de 4 experimentos, * $p < 0,05$.

En acuerdo con lo esperado, la BSO inhibió parcialmente la secreción de IL-1 β inducida por los agonistas ensayados (figura 26). Es importante aclarar que hubiese sido conveniente preincubar a los neutrófilos con la BSO en forma prolongada para lograr modificar marcadamente el contenido de glutatión intracelular. Sin embargo, debido a la corta vida media de los neutrófilos no es posible realizar este tipo de experimentos, por lo que la modificación del estado rédox celular hacia la oxidación seguramente sólo fue parcial y ese debió ser el motivo por el cual los niveles de IL-1 β fueron sólo levemente afectados por la BSO.

En conjunto, nuestros resultados sustentan un modelo según el cual los IRO ejercen un rol dual sobre la secreción de IL-1 β , siendo requeridos para activar la liberación de su forma madura, pero controlando el procesamiento de la proIL-1 β merced a su capacidad de inhibir la actividad de la caspasa-1.

Efecto de la IL-1 β liberada por los neutrófilos sobre la propia secreción de IL-1 β

Como mencionamos en la Introducción, IL-1Ra es una citoquina que inhibe la acción proinflamatoria de IL-1 al unirse a los receptores de IL-1. Estudios previos realizados en monocitos indicaron que IL-1Ra es capaz de inhibir la secreción de IL-1 β estimulada por LPS o MSU (79). Dado que nuestros resultados y los de la literatura sugieren que regulación de la secreción de IL-1 β difiere entre monocitos, macrófagos y neutrófilos, decidimos determinar si la IL-1 liberada por los neutrófilos en respuesta a LPS solo o en combinación con ATP es capaz modular su propia liberación. Para ello, realizamos experimentos adicionales estimulando a los neutrófilos en presencia IL-1Ra. Como puede observarse en la figura 27, la adición del dicho antagonista no afectó significativamente la liberación de IL-1 β estimulada por los agonistas, por lo cual la IL-1 β secretada por los neutrófilos no ejercería un efecto modulador relevante sobre su propia liberación.

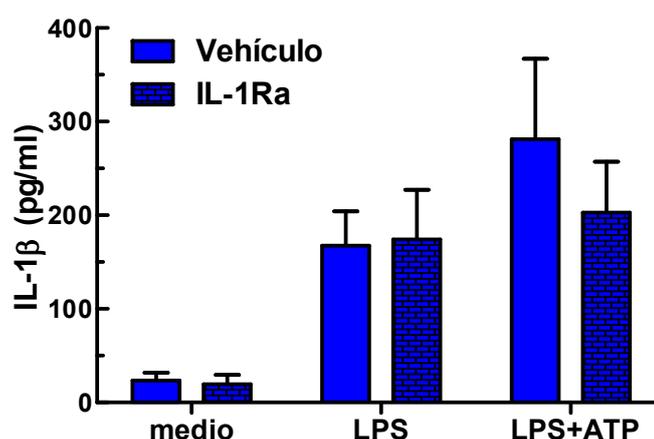


Figura 27 - La IL-1 β liberada por los neutrófilos no modularía su propia secreción. Los neutrófilos fueron pretratados con el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra, 100 ng/ml) por 30 min. Luego fueron incubados con LPS por 2 h y cultivados en presencia o ausencia de ATP por 16 h adicionales. Posteriormente la IL-1 β fue cuantificada en los sobrenadantes por ELISA. Las barras representan las medias \pm ES de 8 experimentos.

Rol de los cambios en las concentraciones de potasio intracelular en el mecanismo que conduce a la liberación de IL-1 β

Estudios iniciales demostraron que el ATP y el ionóforo de potasio nigericina inducen un descenso en los niveles de K⁺ intracelular que son necesarios para la maduración y liberación de IL-1 β (144). Estudios posteriores demostraron que el descenso en el K⁺ intracelular es un requerimiento para la activación de los inflamasomas NALP3 y NALP1, y en consecuencia para la activación de la caspasa-1 por los mismos, pero no para aquélla mediada por el inflamasoma IPAF (77). Dado que en acuerdo con trabajos previos nosotros determinamos que los neutrófilos expresan NALP3 (105, 145), y que el ATP es un agonista conocido del inflamasoma NALP3 en otros tipos celulares, nuestro siguiente objetivo consistió en determinar si su capacidad de estimular la liberación de IL-1 β en neutrófilos involucra un descenso en los niveles de K⁺ intracelular. Para ello, cultivamos a los neutrófilos en un *buffer* Hanks modificado conteniendo 130 mM de K⁺ (*buffer* alto potasio) y evaluamos la liberación de IL-1 β estimulada por LPS sólo o en combinación con ATP. Como puede observarse en la figura 28, la liberación de IL-1 β estimulada tanto por LPS como por LPS+ATP se encontró marcadamente inhibida en *buffer* alto potasio. Estos resultados sugieren que la salida de K⁺ del citoplasma es requerida para la secreción de IL-1 β inducida por estos agonistas. Cabe aclarar que inhibición de la secreción de IL-1 β observada en presencia de *buffer* alto potasio no es consecuencia de una pérdida de viabilidad celular, ya que la misma no resultó afectada cuando fue evaluada por tinción con naranja de acridina-bromuro de etidio (resultados no mostrados).

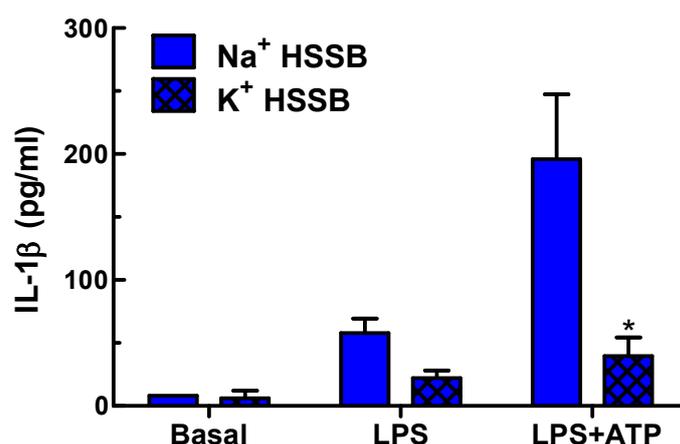


Figura 28 - La liberación de IL-1 β es inhibida por altas concentraciones de K⁺ extracelular. Los neutrófilos fueron resuspendidos en *buffer* Hanks (Na⁺ HSSB) o en *buffer* Hanks donde el sodio fue reemplazado por 130 mM de K⁺ (K⁺ HSSB), preincubados 2 h con LPS y luego estimulados por 16 h con ATP. Luego los sobrenadantes fueron recuperados y la concentración de IL-1 β fue determinada por ELISA. Las barras representan las medias \pm ES de 4 experimentos, * p<0,05.

Estudios previos demostraron que el ATP, actuando sobre el receptor purinérgico P2X₇ (P2X₇R), produce un descenso en los niveles de potasio intracelular que culmina en la activación del inflammasoma NALP3 (146). De hecho, el agregado de ATP estimula en macrófagos al P2X₇R provocando la salida de K⁺ seguida de la formación de un poro formado por el hemicanal de panexina-1. Esta proteína es requerida para la activación de caspasa-1 y liberación de IL-1 β por macrófagos estimulados no sólo con ATP, sino también con toxinas como la mitoxina y nigericina. Un estudio reciente demostró que los neutrófilos humanos no expresan P2X₇ (147), por lo que la liberación de IL-1 β no dependería de este receptor en este tipo celular. En acuerdo con esta posibilidad, el pretratamiento de neutrófilos con carbenoxolona, un inhibidor del canal de panexina-1, no modificó la liberación de IL-1 β estimulada por LPS sólo o en combinación con ATP (figura 29).

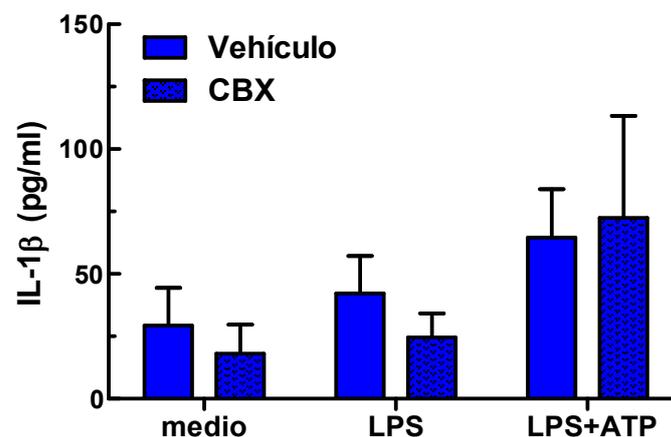


Figura 29 - El canal de panexina-1 no se encuentra involucrado en la liberación de IL-1 β estimulada por ATP o MSU en neutrófilos. Los neutrófilos fueron preincubados con carbenoxolona (CBX) durante 30 min y luego con LPS durante 2 h. Posteriormente fueron estimulados con medio o ATP por 16 h y la IL-1 β secretada a los sobrenadantes de cultivo fue determinada por ELISA. Las barras representan la media \pm ES de 4 experimentos.

Los neutrófilos expresan el receptor purinérgico P2Y₁₁ (P2Y₁₁R), el cual se encuentra involucrado en la inhibición de la apoptosis por ATP (139). Con el fin de determinar si la secreción de IL-1 β inducida por el LPS y el LPS+ATP involucra al receptor P2Y₁₁R, evaluamos el impacto de un inhibidor específico de este receptor, el NF-157. Sin embargo, el pretratamiento de neutrófilos con NF-157, no afectó la liberación de IL-1 β inducida por todos los agonistas (figura 30), sugiriendo que P2Y₁₁R no se encuentra involucrado en la regulación de la secreción de IL-1 β en neutrófilos.

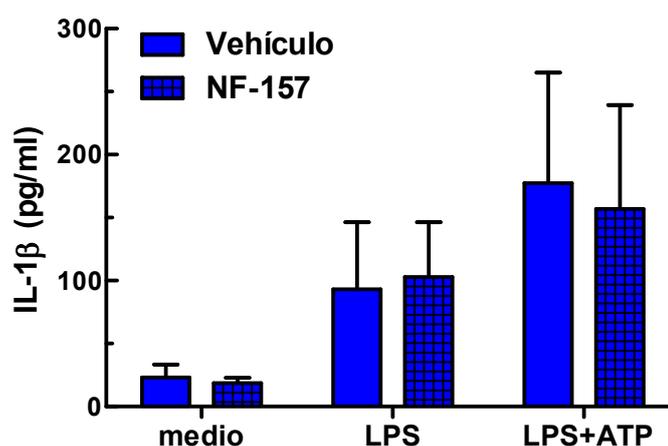


Figura 30 - El receptor P2Y₁₁ no se encuentra involucrado en la liberación de IL-1 β por los neutrófilos. Los neutrófilos fueron preincubados con el inhibidor del receptor purinérgico P2Y₁₁, NF-157 durante 30 min. Luego fueron incubados o no con LPS y 2 h más tarde estimulados con ATP por 16 h. Posteriormente la concentración de IL-1 β en los sobrenadantes de cultivo fue determinada por ELISA. Las barras representan las medias \pm ES de 6 experimentos.

Los resultados obtenidos al cultivar a los neutrófilos en *buffer* alto potasio pusieron en evidencia que el LPS y el ATP median sus efectos a través de inducir un descenso en los niveles intracelulares de potasio. Por ello, con el fin de determinar los posibles canales de potasio involucrados en dicho descenso y profundizar en el conocimiento de los mecanismos requeridos para la liberación de IL-1 β , ensayamos el impacto de inhibidores específicos de estos canales. Revisiones recientes demuestran la existencia de 78 canales de potasio diferentes que pueden ser clasificados en (1) canales rectificadores del potasio intracelular (Kir), canales de potasio de dos poros (K2p), canales de potasio activados por calcio (KCa) y canales de potasio activados por voltaje (Kv) (148). A pesar de una gran controversia durante años, los neutrófilos humanos no expresarían

los KCa de alta conductancia (canales BK sensibles al inhibidor iberiotoxina) (149). Por el contrario, los KCa de baja conductancia (SK), sensibles al inhibidor apamina, parecen estimular la producción de IRO a través de un mecanismo independiente de la NADPH oxidasa (150). Sin embargo, la expresión de otros canales de potasio en neutrófilos no ha sido investigada.

Los resultados obtenidos empleando inhibidores específicos indicaron, como era esperado, que la iberiotoxina (inhibidor de los canales BK) no modificó significativamente los niveles de IL-1 β liberados en respuesta a todos los agonistas empleados (Figura 31A). Tampoco la apamina (inhibidor de los canales SK) ni la glibenclamida (inhibidor de los canales rectificadores del K⁺ intracelular sensibles al ATP), lograron inhibir significativamente la secreción de IL-1 β estimulada por el LPS o por el LPS+ATP (figuras 31 B y C, respectivamente).

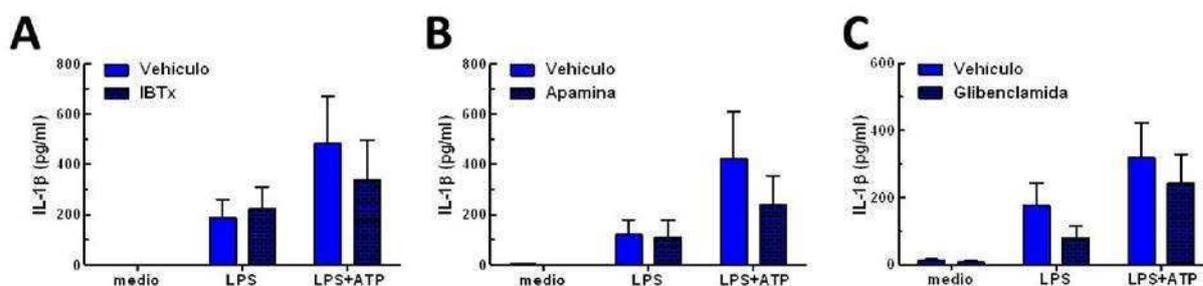


Figura 31 - Efecto de inhibidores de canales BK, SK y Kir sobre la liberación de IL-1 β . Los neutrófilos fueron preincubados con iberiotoxina (IBTx) 100 nM, apamina 200 nM o glibenclamida 50 μ M, durante 30 min. Luego fueron tratados con LPS por 2 h y estimulados con ATP por 16 h. adicionales. Posteriormente se determinó la concentración de IL-1 β en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Las barras representan las medias \pm ES de 4 experimentos.

Es conocido que algunos canales de potasio carecen de bloqueantes selectivos (148) y sólo un inhibidor general es capaz de revelar su participación en un mecanismo determinado. Por tal motivo, decidimos evaluar el impacto de la 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP), un inhibidor más general de canales de potasio. Como puede observarse en la figura 32, la 3,4-DAP redujo marcadamente la liberación de IL-1 β estimulada por LPS sólo

y en combinación con ATP. Cabe aclarar que esta droga no afectó marcadamente la viabilidad celular (datos no mostrados). La 3,4-DAP es empleada en el tratamiento de la esclerosis múltiple y se ha sugerido que sus blancos potenciales de acción podrían ser miembros de la familia de canales de potasio activados por voltaje (Kv)(148). Es posible especular que la liberación de IL-1 β en neutrófilos involucre la participación de alguno de estos canales.

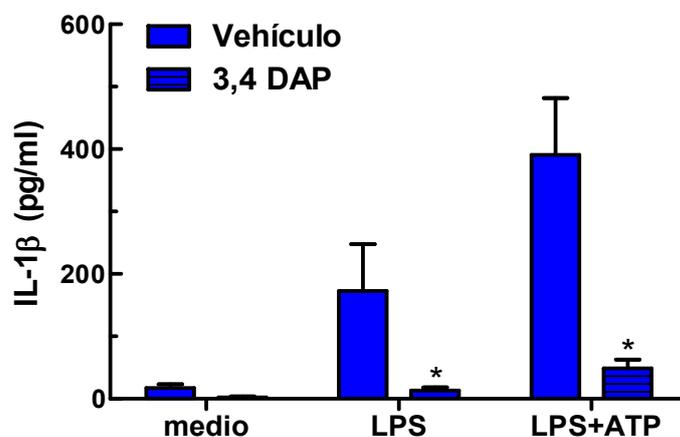


Figura 32 - La liberación de IL-1 β es inhibida por 3,4-DAP. Los neutrófilos fueron preincubados con 3,4-DAP 2 μ M durante 30 min. Luego fueron cultivados en presencia o ausencia de LPS por 2 h y estimulados o no con ATP por 16 h. Posteriormente, la concentración de IL-1 β en los sobrenadantes de cultivo fue determinada por ELISA. Las barras representan las medias \pm ES de 4 experimentos, * $p < 0,05$.

En conjunto, estos resultados sugieren que la liberación de IL-1 β en neutrófilos involucra la apertura de canales de potasio, probablemente canales activados por voltaje, que median un descenso en el nivel de potasio intracelular, señal que dispararía la activación del inflamasoma, tal como fuera descrito previamente.

Discusión

Los neutrófilos constituyen la primera línea de defensa frente a infecciones de naturaleza bacteriana y fúngica. Ellos exhiben un amplio arreglo de receptores de reconocimiento de patrones y receptores para opsoninas que les permiten detectar la presencia de los microorganismos y montar una respuesta inflamatoria que involucra la participación de agentes antimicrobianos como enzimas degradativas, defensinas e intermediarios reactivos del oxígeno, y la liberación de citoquinas y quimiocinas. Tradicionalmente los neutrófilos han sido considerados células terminalmente diferenciadas e incapaces de sintetizar proteínas. Sin embargo numerosos estudios han demostrado lo contrario, y en consecuencia esa visión es obsoleta (36). Estos granulocitos no sólo sintetizan numerosas proteínas que participan en forma directa en sus funciones efectoras, sino que secretan citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento, tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo que no sólo juegan un rol relevante induciendo y sosteniendo la inflamación, sino también modelando la respuesta adaptativa subsecuente (36). De hecho, los neutrófilos contribuyen al reclutamiento, activación y programación de células dendríticas mediante la generación de señales quimiotácticas y la liberación de citoquinas como el TNF- α (151). Aun cuando a nivel individual los neutrófilos sintetizan citoquinas en niveles más reducidos que los macrófagos o los linfocitos, estos granulocitos suelen superar en uno o dos órdenes de magnitud el número de leucocitos mononucleares presentes en sitios inflamatorios. Por esta razón resultan una fuente relevante de citoquinas como el TNF- α o la IL-1 en la coyuntura crucial donde se define la puesta en marcha de una respuesta inmune adaptativa (152-155). Evidencias recientes también sugieren que los neutrófilos pueden producir citoquinas antiinflamatorias como la IL-10. Al menos en modelos tumorales en ratón, el microambiente tumoral parece condicionar a los neutrófilos a adquirir un fenotipo “antiinflamatorio o N2” similar a lo observado en macrófagos (156).

En 1986 Tiku y colaboradores documentaron que los neutrófilos humanos producen una actividad similar a la de IL-1 después de 4-5 h de estimulación con agentes solubles y particulados como el PMA y el zymosán (157). Estudios posteriores demostraron que los neutrófilos también producen una actividad similar a la de IL-1 β en respuesta a GM-CSF (123). También Lord y colaboradores demostraron que los

neutrófilos transcriben y traducen el gen para IL-1 β en respuesta a la estimulación con LPS (158), y Popa-Nita y colaboradores demostraron la liberación de IL-1 β en respuesta a cristales de MSU (159). Sin embargo es importante destacar que la mayoría de estos estudios fueron realizados con concentraciones de agonistas muy superiores a las que se emplean en la actualidad (ej. LPS 10 a 30 $\mu\text{g/ml}$ frente a 100-500 ng/ml o 3 mg/ml de MSU frente a 200 $\mu\text{g/ml}$) y en algunos casos la especificidad y/o sensibilidad de las técnicas empleadas para su detección distan de las disponibles actualmente. Además, en algunos estudios no es posible descartar que parte de las respuestas observadas correspondieran a monocitos contaminantes de las muestras. Estos antecedentes, en conjunto con el conocimiento que emergió en los últimos años respecto del rol del inflammasoma en el mecanismo que conduce a la secreción de IL-1 β , nos motivaron a confirmar que utilizando concentraciones de agonistas similares a las empleadas actualmente para estimular a otras células mieloides, los neutrófilos humanos liberan IL-1 β en respuesta a LPS y a agonistas inflamatorios estériles, y a estudiar cuáles son los mecanismos involucrados en dicha liberación.

Los resultados obtenidos indicaron que los neutrófilos humanos purificados prácticamente a homogeneidad (menos del 0,5% de monocitos contaminantes) secretan IL-1 β en respuesta a LPS, MSU y la combinación LPS+ATP y LPS+MSU (figuras 6 y 7). Tanto el análisis por citometría de flujo, indicando la presencia de IL-1 β intracelular dentro de la población celular con FSC y SSC compatibles con los de granulocitos neutrófilos, como la microscopía confocal confirmaron inequívocamente que son los neutrófilos las células responsables de dicha producción (figura 8). Esta conclusión es sustentada además por nuestros hallazgos indicando la presencia de IL-1 β intracitoplasmática y su secreción por neutrófilos diferenciados a partir de la línea PLB-985 (figura 9).

Como mencionamos en la Introducción, la proIL-1 β carece de péptido señal de translocación a RE para su secreción por la vía canónica RE-aparato de Golgi. Aun cuando al día de hoy la vía de secreción de IL-1 β no se encuentra claramente establecida, es conocido que los inhibidores de la vía canónica RE-aparato de Golgi, como la brefeldina A y la monensina, son incapaces de inhibir la liberación de IL-1 β , sustentando que esta citoquina es secretada por una vía alternativa. En acuerdo con este mecanismo, nosotros

confirmamos que la preincubación con brefeldina A no afecta la cantidad de IL-1 β detectada en el interior de los neutrófilos (resultados no mostrados). A pesar de ello, nosotros pudimos detectar sensiblemente a IL-1 β en el citoplasma de los neutrófilos tanto por citometría de flujo como por MLC.

Trabajos previos demostraron que los neutrófilos humanos y los murinos expresan caspasa-1 (101, 160). A la vez, tanto los neutrófilos humanos como los murinos expresan NLR como NALP3 (103, 161). Nosotros detectamos la activación de caspasa-1 en neutrófilos estimulados y además observamos que el inhibidor específico de la caspasa-1 Ac-YVAD-CMK redujo marcadamente los niveles de IL-1 β liberados a los sobrenadantes de cultivo (figura 10). En conjunto, estos hallazgos involucran a la caspasa-1 del neutrófilo en el mecanismo que conduce a la generación de la forma activa de la IL-1 β . Sin embargo, estos resultados no descartaban la posibilidad de que otros mecanismos independientes de caspasa-1 también se encontraran involucrados. Las revisiones de la literatura sobre los mecanismos que conducen a producción de IL-1 β madura suelen mayoritariamente adjudicar a los neutrófilos la capacidad de procesar a la proIL-1 β merced a su habilidad para secretar proteasas como PR3, elastasa y catepsina G, las que extracelularmente serían responsables de cortar a la proforma generando la IL-1 β activa (59, 93-96). Este mecanismo podría tener lugar en los focos inflamatorios donde coexisten monocitos y neutrófilos, ya que se ha demostrado que los monocitos pueden liberar proIL-1 β (98) y los neutrófilos al degranular liberan las proteasas antes mencionadas. Sin embargo, un análisis detallado de la literatura disponible muestra que no resulta correcto asumir que el mecanismo de procesamiento de proIL-1 β por neutrófilos es exclusivamente dependiente de proteasas extracelulares, pues tales generalizaciones se basan en modelos particulares de inflamación y porque algunos de los estudios que las sustentan no descartan un rol de un mecanismo dependiente de caspasa-1, sino que establecen la existencia de mecanismos redundantes dependientes de otras proteasas que sostienen la inflamación mediada por la IL-1 β (91, 92). En este sentido, resulta relevante señalar que en modelos de inflamación cuyo desarrollo involucra indispensablemente a la IL-1, la relevancia del mecanismo dependiente de caspasa-1 para la generación de IL-1 β activa fue diferente dependiendo del agente empleado para inducir la inflamación y del modelo

particular utilizado (91, 92). Así, por ejemplo, en un modelo de artritis inducida por transferencia de suero artritogénico K/BxN, la deficiencia genética en caspasa-1 no modificó el curso de la inflamación; sin embargo, en un modelo de peritonitis inducida por MSU, la redujo parcialmente (91). Por el contrario, estudios realizados por Greten y colaboradores mostraron que neutrófilos inflamatorios obtenidos por estimulación intraperitoneal con tioglicolato de ratones deficientes en caspasa-1 no exhibieron una secreción reducida de IL-1 β luego de la estimulación con LPS. Según los autores, la PR3 intracelular sería responsable del procesamiento de IL-1 β , puesto que un inhibidor de serinproteasas no permeable a la membrana plasmática como la α -1-antitripsina fue incapaz de reducir la liberación de IL-1 β , mientras que un inhibidor permeable de la PR3 la redujo sustancialmente (96). Sin embargo, en ese mismo sistema, un inhibidor de caspasa-1 también inhibió la liberación de IL-1 β *in vivo*. Más allá de los posibles efectos no específicos del uso de inhibidores, la razón por la que los neutrófilos de ratones deficientes en caspasa-1 no mostraron una menor secreción de IL-1 β en respuesta a LPS podría ser que el mecanismo mediado por proteasas compensara la ausencia de la caspasa-1 (162). Nuestros hallazgos con el inhibidor de elastasa y PR3 Elafín (figura 12), también sustentan un rol para la proteinasa 3 intracelular en el procesamiento de la IL-1 β . Sin embargo, aún desconocemos si la proteinasa 3 y/o la elastasa contribuyen activar el mecanismo dependiente de caspasa-1 o constituyen *per se* un mecanismo de procesamiento de IL-1 β alternativo.

La estimulación de neutrófilos con agonistas proinflamatorios conduce a la activación de la NADPH oxidasa y la consecuente producción de IRO. En estudios previos realizados en otros tipos celulares, los IRO generados en proximidad espacial y temporal a NALP3 fueron propuestos como elementos centrales que llevan a su activación (74). Se ha demostrado que el ATP, un activador de NALP3, estimula la generación de IRO en macrófagos (75). Por otro lado, los activadores de NALP3 de naturaleza particulada, como los cristales de MSU, aluminio, asbesto o sílice, son fagocitados induciendo la activación de la NADPH oxidasa y la generación de IRO (76). Estos antecedentes nos llevaron a pensar que los IRO podrían constituir un efector común capaz de inducir la activación del inflammasoma y consecuentemente el procesamiento de la proIL-1 β en los neutrófilos en

respuesta a agonistas infecciosos y estériles. Nuestros resultados mostraron que los neutrófilos de pacientes con EGC-X y aquéllos diferenciados de la línea PLB-KO, ambos deficientes completos en la producción de IRO derivados de la NADPH oxidasa, exhibieron una capacidad marcadamente disminuida de secretar IL-1 β (figuras 14 y 17). Además la apocinina, un inhibidor específico de la NADPH oxidasa, también redujo significativamente la secreción de IL-1 β (figura 15). Estos resultados indicaron que los IRO producidos por la NADPH oxidasa son necesarios para la liberación de IL-1 β . Nuestros hallazgos señalaron también que los IRO son prescindibles para la síntesis de la proIL-1 β , dado que los neutrófilos PLB-KO exhibieron un alto contenido de IL-1 β intracelular al ser estimulados con LPS y LPS+ATP (figura 18).

Aun cuando diversos estudios adjudicaron a los IRO un rol relevante en la activación del inflamasoma y la consecuente liberación de IL-1 β , otros estudios arribaron a conclusiones contrapuestas. A favor de un requerimiento de IRO en la activación del inflamasoma, se determinó que el tratamiento de macrófagos peritoneales con N-acetilcisteína, un precursor de la síntesis de glutatión que actúa además como *scavenger* de IRO, seguido de la estimulación con cristales de MSU o asbesto, inhibió el procesamiento de la proIL-1 β , mientras que el *knockdown* de p22^{phox} (un componente de las NADPH oxidasas) inhibió la secreción de IL-1 β dependiente de NALP3 (76). La generación de IRO fue implicada en la liberación de IL-1 β inducida por cristales de hemozoína en células dendríticas de ratón en base a la capacidad del inhibidor de NADPH oxidasa DPI de reducir la secreción de IL-1 β y al hecho que células con niveles de p22^{phox} reducidos por *knockdown* presentaran incapacidad de procesar proIL-1 β (163). En el mismo sentido, se demostró que la molécula TRIM30 regula negativamente la activación del inflamasoma NALP3 al modular negativamente la producción de IRO, dado que el *knockdown* de TRIM30 incrementó la producción de IRO, la activación caspasa-1 y la liberación de IL-1 β (164). Por el contrario, monocitos de pacientes deficientes en p47^{phox} (otra subunidad de la NADPH oxidasa) no exhibieron diferencias respecto de monocitos de donantes sanos en la secreción de IL-1 β inducida por LPS o LPS en combinación con ATP y liberaron mayores cantidades en respuesta a MSU (78). De modo similar, los fagocitos mononucleares de pacientes EGC deficientes en las subunidades de la NADPH

oxidasa p22^{phox}, p47^{phox} o gp91^{phox} secretaron IL-1 β en respuesta a señales de daño como también había sido observado en macrófagos de ratón deficientes en gp91^{phox} (79, 80). En conjunto estos antecedentes ponen de manifiesto que el papel de los IRO en la secreción de IL-1 β no ha sido aún completamente esclarecido. Es importante destacar también la ausencia de estudios del rol de los IRO en la secreción de IL-1 β por neutrófilos, células en las cuales la actividad NADPH oxidasa es prominente en respuesta a agonistas proinflamatorios.

Distintos grupos de investigación han intentado determinar el mecanismo por el cual los IRO mediarían la activación del inflammasoma NALP3. En este sentido, se ha demostrado que NALP3 es capaz de interactuar con la proteína TXNIP (de *thioredoxin-interacting protein*, proteína que interactúa con la tiorredoxina, TXN) (165). Los autores observaron que al tratar a macrófagos con activadores de NALP3 como los cristales de MSU, TXNIP deja de interactuar con TXN y se asocia a NALP3 en una forma dependiente de IRO, permitiendo la activación del NLR (165). De hecho, la deficiencia en TXNIP impidió la activación de NALP3 y la liberación de IL-1 β (165). Estos resultados proveen un mecanismo por el cual los IRO podrían mediar la activación de NALP3 y en consecuencia de caspasa-1. Por otra parte, estudios recientes sostienen que los IRO son requeridos para la liberación de IL-1 β pues son responsables de inducir la expresión *de novo* de NALP3 (142), un evento que estudios previos demostraron esencial para la activación de la caspasa-1 y la secreción de IL-1 β en respuesta a agonistas como el ATP o la nigericina (143, 166). Basados en el empleo de DPI (un inhibidor de flavoenzimas, entre ellas las NADPH oxidasas), los estudios de Bauernfeind y colaboradores sostienen que los mismos agonistas responsables de la inducción de la proIL-1 β (por ejemplo, el LPS), estimularían la producción de IRO que aumentarían la expresión de NALP3 permitiendo su activación (142). En contraste con estos hallazgos, aun cuando en el presente trabajo determinamos que el LPS induce la producción de IRO, nosotros no detectamos luego de 4 h de estimulación de neutrófilos con LPS incrementos significativos de NALP3 sobre la expresión basal que pudieran justificar que los IRO fuesen requeridos para mediar la inducción de la expresión de este NLR y consecuentemente para la secreción de IL-1 β (figura 19). Reforzando esta conclusión, observamos que aun cuando los neutrófilos PLB-

KO exhiben una deficiente secreción de IL-1 β en respuesta a LPS o LPS+ATP, expresan mayores niveles de NALP3 que los neutrófilos PLB-985, y éstos a su vez, mayores tenores que los detectados en neutrófilos primarios (figura 19). Estos hallazgos en neutrófilos contrastan con los reportados por Bauernfeind y colaboradores, quienes demostraron que la expresión constitutiva de NALP3 en macrófagos transfectados es suficiente para mediar la activación del inflamasoma (142).

Nuestros resultados indicaron que las células PLB-KO, incapaces de producir IRO a través de la NADPH oxidasa, indujeron la activación de la caspasa-1 y procesaron la proIL-1 (figura 20). De hecho, en las células PLB-KO al igual que en las PLB-985, toda la IL-1 β detectada por *Western blot* correspondió a la forma madura de esta citoquina. Estos hallazgos evidenciaron que los IRO producidos por la NADPH oxidasa no son necesarios para la activación de la caspasa-1 y en consecuencia para la activación del inflamasoma y el procesamiento de la proIL-1 β en neutrófilos, pero sí regulan un paso involucrado en la liberación de la célula de la IL-1 β activa. Esta conclusión es sustentada además por la capacidad del superóxido adicionado exógenamente (a través del sistema X/XO) de estimular la secreción de la IL-1 β acumulada en el interior de neutrófilos PLB-KO luego de seis horas de estimulación con LPS o LPS+ATP (figura 21).

En contraposición con trabajos que adjudicaron un rol activador del inflamasoma a los IRO (76, 77, 167-169), los estudios de Meissner y colaboradores no encontraron diferencias ni en la activación de la caspasa-1 ni en la liberación de IL-1 β en macrófagos provenientes de ratones deficientes en el citocromo b558 (molécula integrada por el homólogo murino de la subunidad gp91^{phox}, mutada en los pacientes ECG-X) (80). En otro trabajo el mismo grupo reportó que los fagocitos mononucleares de pacientes deficientes en distintas subunidades de la NADPH oxidasa (p22^{phox}, p47^{phox} o gp91^{phox}) activaron caspasa-1 y liberaron IL-1 β activa en respuesta a señales de daño (79). Otros estudios conducidos por van de Veerdonk y colaboradores realizados con monocitos de pacientes EGC deficientes en p47^{phox} no mostraron diferencias respecto de los monocitos de donantes sanos en su capacidad de liberar IL-1 β en respuesta a LPS y LPS+ATP (78). Los autores concluyeron que los IRO no son requeridos para la activación del inflamasoma,

contrariamente a lo que planteaban otros trabajos que hemos discutido previamente. Por otra parte, estos investigadores también encontraron una activación prominente de la caspasa-1 en los monocitos deficientes en p47^{phox} y determinaron que éstos, a diferencia de los monocitos de donantes sanos, eran capaces de liberar IL-1 β en respuesta a MSU solo, resultados que los llevaron a adjudicar a los IRO un rol regulatorio negativo sobre la actividad de la caspasa-1 (78). Este mismo rol regulatorio negativo fue sustentado por los estudios de Meissner y colaboradores, los cuales mostraron que la activación de caspasa-1 y la secreción de IL-1 β fue elevada en monocitos de pacientes con EGC deficientes en p47^{phox} no estimulados y en respuesta a LPS y MSU (79). Otros estudios realizados en monocitos y macrófagos, demostraron que la actividad de la caspasa-1 puede ser regulada negativamente por oxidación en cisteína (80). En nuestras manos, los efectos contrapuestos de la adición de superóxido exógeno previo a la estimulación y luego de seis horas de transcurrida la misma (figuras 21, 22 y 23), nos permitieron evidenciar que en neutrófilos los IRO también regulan negativamente la secreción de IL-1 β porque ejercen un efecto inhibitorio sobre la actividad de caspasa-1. Dado que el procesamiento de la proIL-1 β por la caspasa-1 es un evento previo al de liberación regulable por IRO de la forma madura de esta citoquina, el tratamiento de neutrófilos con X/XO antes de la estimulación con LPS o LPS+ATP, inhibió a la caspasa-1 (figura 24), reduciendo la generación de IL-1 β madura y en consecuencia la secreción de la misma, un hecho evidenciado por la disminución de los niveles de IL-1 β en los sobrenadantes de cultivo (figuras 22 y 23). Por el contrario, en ausencia de X/XO, luego de seis horas de estimulación de los neutrófilos PLB-KO, suficiente cantidad de IL-1 β madura se acumuló en el interior de estas células y la adición posterior de superóxido contribuyó a su liberación (figura 21). Por otra parte, al igual que en los trabajos previamente detallados, observamos que los neutrófilos PLB-KO exhibieron un mayor nivel de activación de caspasa-1 que los PLB-985, confirmando que los ROS ejercen un efecto regulador negativo sobre la actividad de la caspasa-1 (figura 20). En este sentido, estudios previos han demostrado que modificaciones en el estado redox celular pueden regular la actividad de enzimas (19). En particular, Meissner y colaboradores demostraron que en los macrófagos peritoneales de ratones deficientes en superóxido dismutasa, los cuales presentan un mayor contenido de IRO, no se activa la caspasa-1 y en consecuencia no se

produce secreción de IL-1 β (80). En concordancia con estos antecedentes, nosotros comprobamos que el tratamiento de neutrófilos con BSO, un inhibidor de la síntesis de glutatión que desplaza el balance redox hacia la oxidación, disminuyó la secreción de IL-1 β (figura 26). No obstante, el efecto fue sólo parcial probablemente porque la incubación con BSO, debido a la corta vida media del neutrófilo, no pudo ser lo suficientemente prolongada como para modificar sustancialmente el estado redox celular.

Nuestros resultados indicando que los neutrófilos ECG-X y los neutrófilos PLB-KO exhiben una deficiencia marcada en la secreción de IL-1 β , evidenciaron un rol estimulador de la secreción de IL-1 β que no había sido observado en los estudios previamente mencionados reportados por van de Veerdonk y Meissner y colaboradores (78, 79). Las razones de estas diferencias podrían ser consecuencia de los distintos tipos celulares empleados, ya que tanto los mecanismos involucrados en la liberación de IL-1 β así como la susceptibilidad a distintos estímulos podría ser diferente (78). En sustento parcial a esta posibilidad, estudios realizados por Netea y colaboradores demostraron diferencias entre monocitos y macrófagos en los requerimientos para activar a la caspasa-1 y consecuentemente para procesar a la IL-1 β (70). En monocitos, la caspasa-1 se encuentra constitutivamente activada, por lo que estímulos como el LPS que inducen la transcripción del gen de la proIL-1 β , también disparan su traducción, maduración y secreción, mientras que en macrófagos se requieren de dos estímulos, uno que induzca la transcripción y traducción, y otro para activar a la caspasa-1 y en consecuencia estimular su procesamiento y secreción. Nosotros detectamos niveles muy bajos de caspasa-1 activada en neutrófilos no estimulados y observamos un incremento en su activación por acción del LPS (figura 11), indicando que, a diferencia de otras células mieloides, en neutrófilos, el LPS no sólo estimula la síntesis de la proIL-1 sino también induce su procesamiento y dispara la secreción de la IL-1 β . Al igual que observaron Netea y colaboradores en monocitos, la adición de ATP o MSU a neutrófilos pretratados con LPS incrementó la liberación de IL-1 β . Sin embargo, nosotros detectamos niveles mayores de caspasa-1 activa con LPS+ATP, a diferencia de lo que ocurre en monocitos, en los cuales los niveles de caspasa-1 activada no parecen incrementarse luego de la estimulación (70).

Aunque los PMAPs son considerados generalmente como la primera señal requerida para la liberación de IL-1 β al estimular la síntesis de proIL-1 β , estudios realizados en macrófagos han demostrado que algunos PMAPs pueden también generar la segunda señal necesaria para activar al inflamasoma (170). Así por ejemplo, el MDP es capaz de inducir la activación de NALP1 y NALP3 (171, 172), mientras que la flagelina introducida en el citosol por transfección, activa a caspasa-1 y la secreción de IL-1 β vía el inflamasoma IPAF (173, 174). Por su parte, la introducción de LPS en el citosol por acción de la estreptolisina O, una molécula capaz de formar poros en la membrana, induce la activación de caspasa-1 a través del inflamasoma NALP3 (175). Como ya mencionamos, nuestros estudios demostraron que el LPS es capaz *per se* de inducir la activación de caspasa-1 y la secreción de IL-1 β en neutrófilos, sin embargo, dado que en nuestro sistema no incorporamos un canal de ingreso del LPS a las células, ¿Cómo podría el LPS ejercer un efecto activador de caspasa-1? Diversas evidencias previas nos permiten plantear una posible explicación. Estudios realizados en monocitos humanos demostraron que PMAPs extracelulares son capaces de activar al inflamasoma (146). Piccini y colaboradores demostraron que el LPS, el MDP, el zimósán y la flagelina no sólo inducen la producción de proIL-1 β sino que estimulan la liberación de ATP endógeno que activa al receptor P₂X₇, llevando a la activación de caspasa-1 y liberación de IL-1 β por la vía ATP-P₂X₇. Además, Netea y colaboradores observaron que los monocitos liberan ATP endógeno en respuesta a LPS, y sostienen que éste constituye el estímulo para la secreción de IL-1 β (70). Por el contrario, estudios recientes en neutrófilos demostraron que estas células liberan ATP en forma constitutiva y que el LPS no modifica los niveles secretados (176). Sin embargo, como los neutrófilos no producen basalmente IL-1 β , la secreción constitutiva de ATP no dispara la liberación de IL-1 β . Cuando los mismos son estimulados con LPS, se induce la síntesis de la proIL-1 β , y la secreción constitutiva de ATP podría mediar la activación del inflamasoma y la secreción de la IL-1 β sintetizada.

¿Cuál es el mecanismo a través del cual el ATP activaría a la caspasa-1? Este interrogante continúa siendo materia de debate en la literatura. Algunos investigadores postularon que el ATP estimula al receptor purinérgico y canal iónico P₂X₇R, provocando la activación del hemicanal panexina-1, a través del cual podrían ingresar PMAPs como el LPS, el cual podría conducir intracelularmente y por mecanismos aún desconocidos a la activación de NALP3 (175). Este mecanismo estaría en sintonía con nuestros hallazgos

indicando que se necesita preestimulación con LPS para que el ATP medie la activación de la caspasa-1. Sin embargo, nuestros resultados mostrando que la carbenoxolona, un inhibidor de pannexina-1, no afectó la liberación de IL-1 β inducida por todos los agonistas empleados (figura 27), sugieren que este canal no estaría involucrado en el mecanismo que conduce a la activación del inflamasoma en neutrófilos. Otra posibilidad sería que el ATP indujera un descenso en el nivel de potasio intracelular que conduciría a la activación del inflamasoma. En sustento de esta posibilidad observamos que el cultivo de neutrófilos en un medio con alto potasio (que impide la salida del mismo cuando el neutrófilo es estimulado) redujo la secreción de IL-1 β inducida por LPS y LPS+ATP (figura 26) y también demostramos que el bloqueo de canales de potasio con 3,4-DAP la inhibió en respuesta a ambos agonistas (figura 32).

El antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) es una citoquina que inhibe la acción proinflamatoria de IL-1 al unirse a los receptores de IL-1. Estudios previos realizados en monocitos indicaron que IL-1Ra es capaz de inhibir la secreción de IL-1 β estimulada por LPS o MSU (79). Nuestros resultados indicaron que a diferencia de lo observado en monocitos, IL-1Ra no modificó significativamente la secreción de IL-1 β , sugiriendo que la IL-1 β liberada por los neutrófilos no regula su propia liberación. Sin embargo, esta conclusión merece cierta consideración ya que estudios previos demostraron que los neutrófilos estimulados con LPS también liberan IL-1Ra (177) el cual podría estar controlando la capacidad de la IL-1 β secretada por los neutrófilos de regular autócrinamente su liberación, y en consecuencia el aporte exógeno de IL-1Ra podría no evidenciar efectos. En condiciones patológicas, la acción autócrina de la IL-1 β sobre su propia secreción podría depender del balance entre IL-1 β /IL-1Ra secretados.

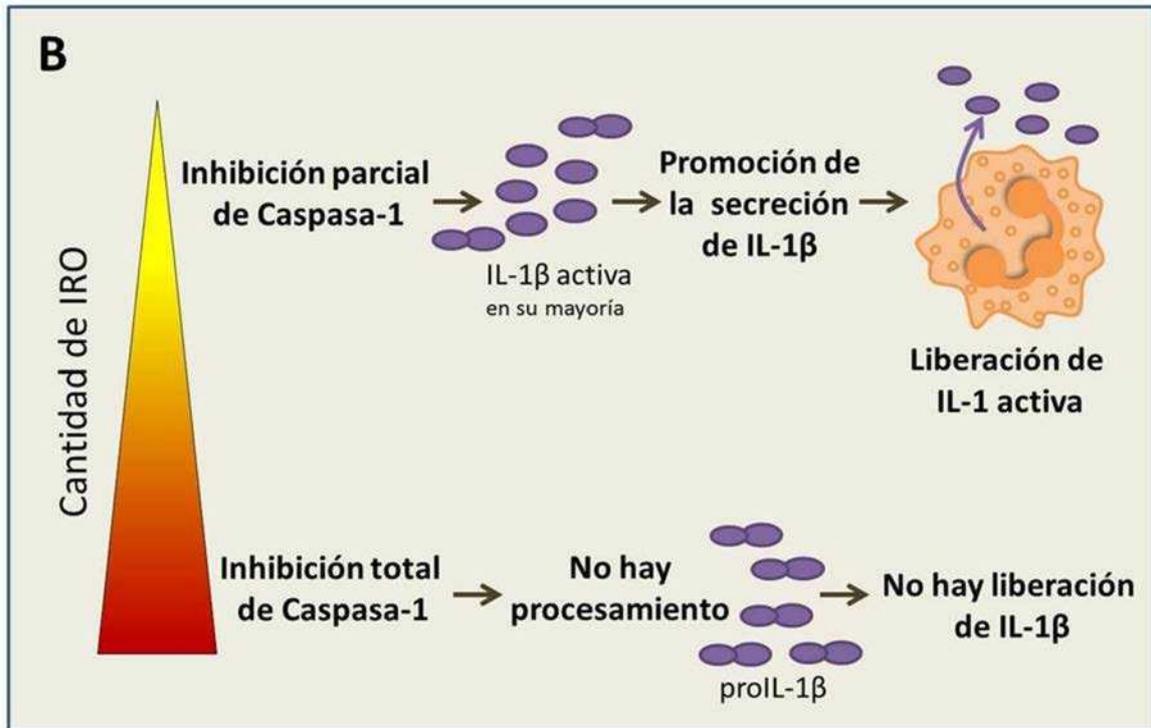


Figura 33 – Modelos propuestos para la producción de IL-1 β activa (A) y para explicar el rol dual de los IRO sobre la liberación de IL-1 β (B) en los neutrófilos humanos.

Teniendo en cuenta el reclutamiento masivo de neutrófilos a focos de infección y en respuesta a estímulos inflamatorios estériles, su capacidad de secretar IL-1 β y nuestros resultados indicando que la apocinina es capaz de reducir la secreción de IL-1 β por estos granulocitos, consideramos que estos hallazgos abren nuevas posibilidades a la investigación del uso de inhibidores de la NADPH oxidasa para el tratamiento de patologías inflamatorias en las que los neutrófilos cumplen un rol relevante.

Referencias

1. Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1:135-145.
2. Medzhitov, R., and C. A. Janeway, Jr. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9:4-9.
3. Akira, S. 2003. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15:5-11.
4. Janeway, C. A., Jr., and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
5. Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454:428-435.
6. Rock, K. L., E. Latz, F. Ontiveros, and H. Kono. 2010. The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol* 28:321-342.
7. van de Veerdonk, F. L., M. G. Netea, C. A. Dinarello, and L. A. Joosten. 2011. Inflammasome activation and IL-1beta and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol* 32:110-116.
8. Witko-Sarsat, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, and L. Halbwachs-Mecarelli. 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80:617-653.
9. Lekstrom-Himes, J. A., and J. I. Gallin. 2000. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med* 343:1703-1714.
10. Pober, J. S., and R. S. Cotran. 1990. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 50:537-544.
11. Choi, E. Y., S. Santoso, and T. Chavakis. 2009. Mechanisms of neutrophil transendothelial migration. *Front Biosci* 14:1596-1605.
12. Parker, L. C., M. K. Whyte, S. K. Dower, and I. Sabroe. 2005. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol* 77:886-892.
13. Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532-1535.
14. Borregaard, N., and J. B. Cowland. 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89:3503-3521.
15. Babior, B. M. 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood* 93:1464-1476.
16. Verhoef, J., and M. R. Visser. 1993. *Neutrophil phagocytosis and killing*. Oxford University Press Inc, New York.
17. Holland, S. M. 2010. Chronic granulomatous disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 38:3-10.
18. Fialkow, L., Y. Wang, and G. P. Downey. 2007. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med* 42:153-164.
19. Tonks, N. K. 2005. Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell* 121:667-670.
20. Schreck, R., P. Rieber, and P. A. Baeuerle. 1991. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 10:2247-2258.
21. Brumell, J. H., A. L. Burkhardt, J. B. Bolen, and S. Grinstein. 1996. Endogenous reactive oxygen intermediates activate tyrosine kinases in human neutrophils. *J Biol Chem* 271:1455-1461.

22. Fialkow, L., C. K. Chan, and G. P. Downey. 1997. Inhibition of CD45 during neutrophil activation. *J Immunol* 158:5409-5417.
23. Fialkow, L., C. K. Chan, D. Rotin, S. Grinstein, and G. P. Downey. 1994. Activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in neutrophils. Role of oxidants. *J Biol Chem* 269:31234-31242.
24. Salmon, J. E., S. S. Millard, N. L. Brogle, and R. P. Kimberly. 1995. Fc gamma receptor IIIb enhances Fc gamma receptor IIa function in an oxidant-dependent and allele-sensitive manner. *J Clin Invest* 95:2877-2885.
25. Lo, Y. Y., and T. F. Cruz. 1995. Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J Biol Chem* 270:11727-11730.
26. Gardai, S., B. B. Whitlock, C. Helgason, D. Ambruso, V. Fadok, D. Bratton, and P. M. Henson. 2002. Activation of SHIP by NADPH oxidase-stimulated Lyn leads to enhanced apoptosis in neutrophils. *J Biol Chem* 277:5236-5246.
27. Papayannopoulos, V., and A. Zychlinsky. 2009. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol* 30:513-521.
28. Fuchs, T. A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176:231-241.
29. Yousefi, S., C. Mihalache, E. Kozłowski, I. Schmid, and H. U. Simon. 2009. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ* 16:1438-1444.
30. Urban, C. F., D. Ermert, M. Schmid, U. Abu-Abed, C. Goosmann, W. Nacken, V. Brinkmann, P. R. Jungblut, and A. Zychlinsky. 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 5:e1000639.
31. Mantovani, A., M. A. Cassatella, C. Costantini, and S. Jaillon. 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11:519-531.
32. Scapini, P., J. A. Lapinet-Vera, S. Gasperini, F. Calzetti, F. Bazzoni, and M. A. Cassatella. 2000. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 177:195-203.
33. Weiss, S. J. 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320:365-376.
34. Scapini, P., F. Bazzoni, and M. A. Cassatella. 2008. Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils. *Immunol Lett* 116:1-6.
35. Huard, B., T. McKee, C. Bosshard, S. Durual, T. Matthes, S. Myit, O. Donze, C. Frossard, C. Chizzolini, C. Favre, R. Zubler, J. P. Guyot, P. Schneider, and E. Roosnek. 2008. APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. *J Clin Invest* 118:2887-2895.
36. Cassatella, M. A. 1999. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol* 73:369-509.
37. Dinarello, C. A. 2011. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117:3720-3732.
38. Dinarello, C. A. 2002. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 20:S1-13.

39. Caamano, J., and C. A. Hunter. 2002. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev* 15:414-429.
40. Sims, J. E., C. J. March, D. Cosman, M. B. Widmer, H. R. MacDonald, C. J. McMahan, C. E. Grubin, J. M. Wignall, J. L. Jackson, S. M. Call, and et al. 1988. cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 241:585-589.
41. Dinarello, C. A. 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27:519-550.
42. Sims, J. E., and D. E. Smith. 2010. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 10:89-102.
43. van den Berg, W. B. 2001. Uncoupling of inflammatory and destructive mechanisms in arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 30:7-16.
44. Zheng, H., D. Fletcher, W. Kozak, M. Jiang, K. J. Hofmann, C. A. Conn, D. Soszynski, C. Grabiec, M. E. Trumbauer, A. Shaw, and et al. 1995. Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin-1 beta-deficient mice. *Immunity* 3:9-19.
45. Fantuzzi, G., G. Ku, M. W. Harding, D. J. Livingston, J. D. Sipe, K. Kuida, R. A. Flavell, and C. A. Dinarello. 1997. Response to local inflammation of IL-1 beta-converting enzyme-deficient mice. *J Immunol* 158:1818-1824.
46. Horai, R., S. Saijo, H. Tanioka, S. Nakae, K. Sudo, A. Okahara, T. Ikuse, M. Asano, and Y. Iwakura. 2000. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med* 191:313-320.
47. Nicklin, M. J., D. E. Hughes, J. L. Barton, J. M. Ure, and G. W. Duff. 2000. Arterial inflammation in mice lacking the interleukin 1 receptor antagonist gene. *J Exp Med* 191:303-312.
48. Bevilacqua, M. P., J. S. Pober, M. E. Wheeler, R. S. Cotran, and M. A. Gimbrone, Jr. 1985. Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest* 76:2003-2011.
49. Kuijpers, T. W., B. C. Hakkert, M. Hoogerwerf, J. F. Leeuwenberg, and D. Roos. 1991. Role of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and platelet-activating factor in neutrophil adherence to IL-1-prestimulated endothelial cells. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-mediated CD18 activation. *J Immunol* 147:1369-1376.
50. Dustin, M. L., R. Rothlein, A. K. Bhan, C. A. Dinarello, and T. A. Springer. 1986. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 137:245-254.
51. Tanaka, T., H. Kanai, K. Sekiguchi, Y. Aihara, T. Yokoyama, M. Arai, T. Kanda, R. Nagai, and M. Kurabayashi. 2000. Induction of VEGF gene transcription by IL-1 beta is mediated through stress-activated MAP kinases and Sp1 sites in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 32:1955-1967.
52. Voronov, E., D. S. Shouval, Y. Krelin, E. Cagnano, D. Benharroch, Y. Iwakura, C. A. Dinarello, and R. N. Apte. 2003. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2645-2650.
53. Park, C. C., J. C. Morel, M. A. Amin, M. A. Connors, L. A. Harlow, and A. E. Koch. 2001. Evidence of IL-18 as a novel angiogenic mediator. *J Immunol* 167:1644-1653.

54. Besedovsky, H., A. del Rey, E. Sorkin, and C. A. Dinarello. 1986. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 233:652-654.
55. Dinarello, C. A. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87:2095-2147.
56. Watkins, L. R., M. K. Hansen, K. T. Nguyen, J. E. Lee, and S. F. Maier. 1999. Dynamic regulation of the proinflammatory cytokine, interleukin-1beta: molecular biology for non-molecular biologists. *Life Sci* 65:449-481.
57. Netea, M. G., A. Simon, F. van de Veerdonk, B. J. Kullberg, J. W. Van der Meer, and L. A. Joosten. 2010. IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS Pathog* 6:e1000661.
58. Dinarello, C. A. 1997. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 8:253-265.
59. Coeshott, C., C. Ohnemus, A. Pilyavskaya, S. Ross, M. Wieczorek, H. Kroona, A. H. Leimer, and J. Cheronis. 1999. Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6261-6266.
60. Gardella, S., C. Andrei, S. Costigliolo, L. Olcese, M. R. Zocchi, and A. Rubartelli. 2000. Secretion of bioactive interleukin-1beta by dendritic cells is modulated by interaction with antigen specific T cells. *Blood* 95:3809-3815.
61. Mehta, V. B., J. Hart, and M. D. Wewers. 2001. ATP-stimulated release of interleukin (IL)-1beta and IL-18 requires priming by lipopolysaccharide and is independent of caspase-1 cleavage. *J Biol Chem* 276:3820-3826.
62. Maelfait, J., E. Vercammen, S. Janssens, P. Schotte, M. Haegman, S. Magez, and R. Beyaert. 2008. Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1beta maturation by caspase-8. *J Exp Med* 205:1967-1973.
63. Miwa, K., M. Asano, R. Horai, Y. Iwakura, S. Nagata, and T. Suda. 1998. Caspase 1-independent IL-1beta release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. *Nat Med* 4:1287-1292.
64. Schonbeck, U., F. Mach, and P. Libby. 1998. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol* 161:3340-3346.
65. Franchi, L., T. Eigenbrod, R. Munoz-Planillo, and G. Nunez. 2009. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* 10:241-247.
66. Bergsbaken, T., S. L. Fink, and B. T. Cookson. 2009. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* 7:99-109.
67. Kepp, O., L. Galluzzi, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2010. Pyroptosis - a cell death modality of its kind? *Eur J Immunol* 40:627-630.
68. Cerretti, D. P., C. J. Kozlosky, B. Mosley, N. Nelson, K. Van Ness, T. A. Greenstreet, C. J. March, S. R. Kronheim, T. Druck, L. A. Cannizzaro, and et al. 1992. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256:97-100.
69. Thornberry, N. A., H. G. Bull, J. R. Calaycay, K. T. Chapman, A. D. Howard, M. J. Kostura, D. K. Miller, S. M. Molineaux, J. R. Weidner, J. Aunins, and et al. 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356:768-774.

70. Netea, M. G., C. A. Nold-Petry, M. F. Nold, L. A. Joosten, B. Opitz, J. H. van der Meer, F. L. van de Veerdonk, G. Ferwerda, B. Heinhuis, I. Devesa, C. J. Funk, R. J. Mason, B. J. Kullberg, A. Rubartelli, J. W. van der Meer, and C. A. Dinarello. 2009. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* 113:2324-2335.
71. Martinon, F., A. Mayor, and J. Tschopp. 2009. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 27:229-265.
72. Schroder, K., and J. Tschopp. 2010. The inflammasomes. *Cell* 140:821-832.
73. Brodsky, I. E., and D. Monack. 2009. NLR-mediated control of inflammasome assembly in the host response against bacterial pathogens. *Semin Immunol* 21:199-207.
74. Tschopp, J., and K. Schroder. 2010. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol* 10:210-215.
75. Cruz, C. M., A. Rinna, H. J. Forman, A. L. Ventura, P. M. Persechini, and D. M. Ojcius. 2007. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem* 282:2871-2879.
76. Dostert, C., V. Petrilli, R. Van Bruggen, C. Steele, B. T. Mossman, and J. Tschopp. 2008. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320:674-677.
77. Petrilli, V., S. Papin, C. Dostert, A. Mayor, F. Martinon, and J. Tschopp. 2007. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 14:1583-1589.
78. van de Veerdonk, F. L., S. P. Smeekeens, L. A. Joosten, B. J. Kullberg, C. A. Dinarello, J. W. van der Meer, and M. G. Netea. 2010. Reactive oxygen species-independent activation of the IL-1beta inflammasome in cells from patients with chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:3030-3033.
79. Meissner, F., R. A. Seger, D. Moshous, A. Fischer, J. Reichenbach, and A. Zychlinsky. 2010. Inflammasome activation in NADPH oxidase defective mononuclear phagocytes from patients with chronic granulomatous disease. *Blood* 116:1570-1573.
80. Meissner, F., K. Molawi, and A. Zychlinsky. 2008. Superoxide dismutase 1 regulates caspase-1 and endotoxic shock. *Nat Immunol* 9:866-872.
81. Zhou, R., A. S. Yazdi, P. Menu, and J. Tschopp. 2011. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469:221-225.
82. Ly, J. D., D. R. Grubb, and A. Lawen. 2003. The mitochondrial membrane potential (deltapsi(m)) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 8:115-128.
83. Hornung, V., F. Bauernfeind, A. Halle, E. O. Samstad, H. Kono, K. L. Rock, K. A. Fitzgerald, and E. Latz. 2008. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 9:847-856.
84. Walev, I., K. Reske, M. Palmer, A. Valeva, and S. Bhakdi. 1995. Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes. *EMBO J* 14:1607-1614.
85. Ferrari, D., C. Pizzirani, E. Adinolfi, R. M. Lemoli, A. Curti, M. Idzko, E. Panther, and F. Di Virgilio. 2006. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol* 176:3877-3883.
86. Pelegrin, P., and A. Surprenant. 2006. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* 25:5071-5082.

87. Marina-Garcia, N., L. Franchi, Y. G. Kim, D. Miller, C. McDonald, G. J. Boons, and G. Nunez. 2008. Pannexin-1-mediated intracellular delivery of muramyl dipeptide induces caspase-1 activation via cryopyrin/NLRP3 independently of Nod2. *J Immunol* 180:4050-4057.
88. Horai, R., M. Asano, K. Sudo, H. Kanuka, M. Suzuki, M. Nishihara, M. Takahashi, and Y. Iwakura. 1998. Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med* 187:1463-1475.
89. Cheng, W., P. Shivshankar, Z. Li, L. Chen, I. T. Yeh, and G. Zhong. 2008. Caspase-1 contributes to Chlamydia trachomatis-induced upper urogenital tract inflammatory pathologies without affecting the course of infection. *Infect Immun* 76:515-522.
90. Prantner, D., T. Darville, J. D. Sikes, C. W. Andrews, Jr., H. Brade, R. G. Rank, and U. M. Nagarajan. 2009. Critical role for interleukin-1beta (IL-1beta) during Chlamydia muridarum genital infection and bacterial replication-independent secretion of IL-1beta in mouse macrophages. *Infect Immun* 77:5334-5346.
91. Guma, M., L. Ronacher, R. Liu-Bryan, S. Takai, M. Karin, and M. Corr. 2009. Caspase 1-independent activation of interleukin-1beta in neutrophil-predominant inflammation. *Arthritis Rheum* 60:3642-3650.
92. Joosten, L. A., M. G. Netea, G. Fantuzzi, M. I. Koenders, M. M. Helsen, H. Sparrer, C. T. Pham, J. W. van der Meer, C. A. Dinarello, and W. B. van den Berg. 2009. Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1beta. *Arthritis Rheum* 60:3651-3662.
93. Stehlik, C. 2009. Multiple interleukin-1beta-converting enzymes contribute to inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 60:3524-3530.
94. Black, R. A., S. R. Kronheim, M. Cantrell, M. C. Deeley, C. J. March, K. S. Prickett, J. Wignall, P. J. Conlon, D. Cosman, T. P. Hopp, and et al. 1988. Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor. *J Biol Chem* 263:9437-9442.
95. Hazuda, D. J., J. Strickler, F. Kueppers, P. L. Simon, and P. R. Young. 1990. Processing of precursor interleukin 1 beta and inflammatory disease. *J Biol Chem* 265:6318-6322.
96. Greten, F. R., M. C. Arkan, J. Bollrath, L. C. Hsu, J. Goode, C. Miething, S. I. Goktuna, M. Neuenhahn, J. Fierer, S. Paxian, N. Van Rooijen, Y. Xu, T. O'Cain, B. B. Jaffee, D. H. Busch, J. Duyster, R. M. Schmid, L. Eckmann, and M. Karin. 2007. NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell* 130:918-931.
97. Mizutani, H., N. Schechter, G. Lazarus, R. A. Black, and T. S. Kupper. 1991. Rapid and specific conversion of precursor interleukin 1 beta (IL-1 beta) to an active IL-1 species by human mast cell chymase. *J Exp Med* 174:821-825.
98. Hazuda, D. J., J. C. Lee, and P. R. Young. 1988. The kinetics of interleukin 1 secretion from activated monocytes. Differences between interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta. *J Biol Chem* 263:8473-8479.
99. Watson, R. W., O. D. Rotstein, J. Parodo, R. Bitar, and J. C. Marshall. 1998. The IL-1 beta-converting enzyme (caspase-1) inhibits apoptosis of inflammatory neutrophils through activation of IL-1 beta. *J Immunol* 161:957-962.
100. Santos-Beneit, A. M., and F. Mollinedo. 2000. Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells. *J Leukoc Biol* 67:712-724.

101. Westphal, E., M. Herzberg, I. Neumann, L. Beibei, C. Pilowski, C. Li, K. Werdan, and H. Loppnow. 2006. Neutrophils process interleukin-1beta and interleukin-18 precursors in a caspase-1-like fashion--processing is inhibited by human vascular smooth muscle cells. *Eur Cytokine Netw* 17:19-28.
102. Chu, Z. L., F. Pio, Z. Xie, K. Welsh, M. Krajewska, S. Krajewski, A. Godzik, and J. C. Reed. 2001. A novel enhancer of the Apaf1 apoptosome involved in cytochrome c-dependent caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem* 276:9239-9245.
103. Kummer, J. A., R. Broekhuizen, H. Everett, L. Agostini, L. Kuijk, F. Martinon, R. van Bruggen, and J. Tschopp. 2007. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J Histochem Cytochem* 55:443-452.
104. Hoffman, H. M., J. L. Mueller, D. H. Broide, A. A. Wanderer, and R. D. Kolodner. 2001. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet* 29:301-305.
105. Ekman, A. K., and L. O. Cardell. 2010. The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. *Immunology* 130:55-63.
106. Grenier, J. M., L. Wang, G. A. Manji, W. J. Huang, A. Al-Garawi, R. Kelly, A. Carlson, S. Merriam, J. M. Lora, M. Briskin, P. S. DiStefano, and J. Bertin. 2002. Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappaB and caspase-1. *FEBS Lett* 530:73-78.
107. Rowe, S. J., L. Allen, V. C. Ridger, P. G. Hellewell, and M. K. Whyte. 2002. Caspase-1-deficient mice have delayed neutrophil apoptosis and a prolonged inflammatory response to lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *J Immunol* 169:6401-6407.
108. Rubartelli, A., F. Cozzolino, M. Talio, and R. Sitia. 1990. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J* 9:1503-1510.
109. Eder, C. 2009. Mechanisms of interleukin-1beta release. *Immunobiology* 214:543-553.
110. Andrei, C., P. Margiocco, A. Poggi, L. V. Lotti, M. R. Torrisi, and A. Rubartelli. 2004. Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9745-9750.
111. Andrei, C., C. Dazzi, L. Lotti, M. R. Torrisi, G. Chimini, and A. Rubartelli. 1999. The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell* 10:1463-1475.
112. MacKenzie, A., H. L. Wilson, E. Kiss-Toth, S. K. Dower, R. A. North, and A. Surprenant. 2001. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 15:825-835.
113. Pizzirani, C., D. Ferrari, P. Chiozzi, E. Adinolfi, D. Sandona, E. Savaglio, and F. Di Virgilio. 2007. Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1beta-loaded microvesicles from human dendritic cells. *Blood* 109:3856-3864.
114. Bianco, F., E. Pravettoni, A. Colombo, U. Schenk, T. Moller, M. Matteoli, and C. Verderio. 2005. Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *J Immunol* 174:7268-7277.
115. Qu, Y., L. Franchi, G. Nunez, and G. R. Dubyak. 2007. Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol* 179:1913-1925.

116. Brough, D., and N. J. Rothwell. 2007. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. *J Cell Sci* 120:772-781.
117. Hogquist, K. A., E. R. Unanue, and D. D. Chaplin. 1991. Release of IL-1 from mononuclear phagocytes. *J Immunol* 147:2181-2186.
118. Laliberte, R. E., J. Egger, and C. A. Gabel. 1999. ATP treatment of human monocytes promotes caspase-1 maturation and externalization. *J Biol Chem* 274:36944-36951.
119. Alvarez, M. E., J. I. Fuxman Bass, J. R. Geffner, P. X. Calotti, M. Costas, O. A. Coso, R. Gamberale, M. E. Vermeulen, G. Salamone, D. Martinez, T. Tanos, and A. S. Trevani. 2006. Neutrophil signaling pathways activated by bacterial DNA stimulation. *J Immunol* 177:4037-4046.
120. Zhen, L., A. A. King, Y. Xiao, S. J. Chanock, S. H. Orkin, and M. C. Dinauer. 1993. Gene targeting of X chromosome-linked chronic granulomatous disease locus in a human myeloid leukemia cell line and rescue by expression of recombinant gp91phox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9832-9836.
121. Martinon, F., V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel, and J. Tschopp. 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440:237-241.
122. El Kebir, D., L. Jozsef, T. Khreiss, and J. G. Filep. 2006. Inhibition of K⁺ efflux prevents mitochondrial dysfunction, and suppresses caspase-3-, apoptosis-inducing factor-, and endonuclease G-mediated constitutive apoptosis in human neutrophils. *Cell Signal* 18:2302-2313.
123. Lindemann, A., D. Riedel, W. Oster, S. C. Meuer, D. Blohm, R. H. Mertelsmann, and F. Herrmann. 1988. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor induces interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol* 140:837-839.
124. Goh, K., S. Furusawa, Y. Kawa, S. Negishi-Okitsu, and M. Mizoguchi. 1989. Production of interleukin-1-alpha and -beta by human peripheral polymorphonuclear neutrophils. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 88:297-303.
125. Sugawara, S., A. Uehara, T. Nochi, T. Yamaguchi, H. Ueda, A. Sugiyama, K. Hanzawa, K. Kumagai, H. Okamura, and H. Takada. 2001. Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. *J Immunol* 167:6568-6575.
126. Tapping, R. I., S. Akashi, K. Miyake, P. J. Godowski, and P. S. Tobias. 2000. Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for Escherichia and Salmonella lipopolysaccharides. *J Immunol* 165:5780-5787.
127. May, M. J., and S. Ghosh. 1998. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 19:80-88.
128. Rock, K. L., J. J. Lai, and H. Kono. 2011. Innate and adaptive immune responses to cell death. *Immunol Rev* 243:191-205.
129. Tschopp, J., F. Martinon, and K. Burns. 2003. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:95-104.
130. Chen, C. J., Y. Shi, A. Hearn, K. Fitzgerald, D. Golenbock, G. Reed, S. Akira, and K. L. Rock. 2006. MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *J Clin Invest* 116:2262-2271.
131. Yin, J., K. Xu, J. Zhang, A. Kumar, and F. S. Yu. 2007. Wound-induced ATP release and EGF receptor activation in epithelial cells. *J Cell Sci* 120:815-825.

132. Eltzschig, H. K., C. F. Macmanus, and S. P. Colgan. 2008. Neutrophils as sources of extracellular nucleotides: functional consequences at the vascular interface. *Trends Cardiovasc Med* 18:103-107.
133. Novak, I. 2003. ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. *News Physiol Sci* 18:12-17.
134. Eltzschig, H. K., T. Eckle, A. Mager, N. Kuper, C. Karcher, T. Weissmuller, K. Boengler, R. Schulz, S. C. Robson, and S. P. Colgan. 2006. ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ Res* 99:1100-1108.
135. Goodenough, D. A., and D. L. Paul. 2003. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:285-294.
136. Pedruzzi, E., M. Fay, C. Elbim, M. Gaudry, and M. A. Gougerot-Pocidallo. 2002. Differentiation of PLB-985 myeloid cells into mature neutrophils, shown by degranulation of terminally differentiated compartments in response to N-formyl peptide and priming of superoxide anion production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Br J Haematol* 117:719-726.
137. Fink, S. L., T. Bergsbaken, and B. T. Cookson. 2008. Anthrax lethal toxin and Salmonella elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4312-4317.
138. Yamamoto, C., S. Yoshida, H. Taniguchi, M. H. Qin, H. Miyamoto, and Y. Mizuguchi. 1993. Lipopolysaccharide and granulocyte colony-stimulating factor delay neutrophil apoptosis and ingestion by guinea pig macrophages. *Infect Immun* 61:1972-1979.
139. Vaughan, K. R., L. Stokes, L. R. Prince, H. M. Marriott, S. Meis, M. U. Kassack, C. D. Bingle, I. Sabroe, A. Surprenant, and M. K. Whyte. 2007. Inhibition of neutrophil apoptosis by ATP is mediated by the P2Y11 receptor. *J Immunol* 179:8544-8553.
140. Stolk, J., T. J. Hiltermann, J. H. Dijkman, and A. J. Verhoeven. 1994. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11:95-102.
141. Vejrazka, M., R. Micek, and S. Stipek. 2005. Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells. *Biochim Biophys Acta* 1722:143-147.
142. Bauernfeind, F., E. Bartok, A. Rieger, L. Franchi, G. Nunez, and V. Hornung. 2011. Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol* 187:613-617.
143. Bauernfeind, F. G., G. Horvath, A. Stutz, E. S. Alnemri, K. MacDonald, D. Speert, T. Fernandes-Alnemri, J. Wu, B. G. Monks, K. A. Fitzgerald, V. Hornung, and E. Latz. 2009. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 183:787-791.
144. Perregaux, D., and C. A. Gabel. 1994. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem* 269:15195-15203.
145. Anderson, J. P., J. L. Mueller, S. Rosengren, D. L. Boyle, P. Schaner, S. B. Cannon, C. S. Goodyear, and H. M. Hoffman. 2004. Structural, expression, and evolutionary analysis of mouse CIAS1. *Gene* 338:25-34.

146. Piccini, A., S. Carta, S. Tassi, D. Lasiglie, G. Fossati, and A. Rubartelli. 2008. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8067-8072.
147. Martel-Gallegos, G., M. T. Rosales-Saavedra, J. P. Reyes, G. Casas-Pruneda, C. Toro-Castillo, P. Perez-Cornejo, and J. Arreola. 2010. Human neutrophils do not express purinergic P2X7 receptors. *Purinergic Signal* 6:297-306.
148. Wulff, H., and B. S. Zhorov. 2008. K⁺ channel modulators for the treatment of neurological disorders and autoimmune diseases. *Chem Rev* 108:1744-1773.
149. Essin, K., B. Salanova, R. Kettritz, M. Sausbier, F. C. Luft, D. Kraus, E. Bohn, I. B. Autenrieth, A. Peschel, P. Ruth, and M. Gollasch. 2007. Large-conductance calcium-activated potassium channel activity is absent in human and mouse neutrophils and is not required for innate immunity. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C45-54.
150. Fay, A. J., X. Qian, Y. N. Jan, and L. Y. Jan. 2006. SK channels mediate NADPH oxidase-independent reactive oxygen species production and apoptosis in granulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17548-17553.
151. Nathan, C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6:173-182.
152. Bennouna, S., S. K. Bliss, T. J. Curiel, and E. Y. Denkers. 2003. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J Immunol* 171:6052-6058.
153. Wittamer, V., B. Bondue, A. Guillabert, G. Vassart, M. Parmentier, and D. Communi. 2005. Neutrophil-mediated maturation of chemerin: a link between innate and adaptive immunity. *J Immunol* 175:487-493.
154. van Gisbergen, K. P., M. Sanchez-Hernandez, T. B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2005. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med* 201:1281-1292.
155. Ethuin, F., B. Gerard, J. E. Benna, A. Boutten, M. A. Gougereot-Pocidallo, L. Jacob, and S. Chollet-Martin. 2004. Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. *Lab Invest* 84:1363-1371.
156. Fridlender, Z. G., J. Sun, S. Kim, V. Kapoor, G. Cheng, L. Ling, G. S. Worthen, and S. M. Albelda. 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 16:183-194.
157. Tiku, K., M. L. Tiku, and J. L. Skosey. 1986. Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol* 136:3677-3685.
158. Lord, P. C., L. M. Wilmoth, S. B. Mizel, and C. E. McCall. 1991. Expression of interleukin-1 alpha and beta genes by human blood polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 87:1312-1321.
159. Popa-Nita, O., L. Marois, G. Pare, and P. H. Naccache. 2008. Crystal-induced neutrophil activation: X. Proinflammatory role of the tyrosine kinase Tec. *Arthritis Rheum* 58:1866-1876.
160. Sporri, R., N. Joller, H. Hilbi, and A. Oxenius. 2008. A novel role for neutrophils as critical activators of NK cells. *J Immunol* 181:7121-7130.
161. Sutterwala, F. S., Y. Ogura, M. Szczepanik, M. Lara-Tejero, G. S. Lichtenberger, E. P. Grant, J. Bertin, A. J. Coyle, J. E. Galan, P. W. Askenase, and R. A. Flavell. 2006. Critical role for

- NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* 24:317-327.
162. Hendley, T. M., R. B. Steed, and G. M. Galbraith. 1995. Interleukin-1 beta gene expression in human oral polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontol* 66:761-765.
163. Dostert, C., G. Guarda, J. F. Romero, P. Menu, O. Gross, A. Tardivel, M. L. Suva, J. C. Stehle, M. Kopf, I. Stamenkovic, G. Corradin, and J. Tschopp. 2009. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PLoS One* 4:e6510.
164. Hu, Y., K. Mao, Y. Zeng, S. Chen, Z. Tao, C. Yang, S. Sun, X. Wu, G. Meng, and B. Sun. 2010. Tripartite-motif protein 30 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation by modulating reactive oxygen species production. *J Immunol* 185:7699-7705.
165. Zhou, R., A. Tardivel, B. Thorens, I. Choi, and J. Tschopp. 2010. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 11:136-140.
166. Franchi, L., T. Eigenbrod, and G. Nunez. 2009. Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J Immunol* 183:792-796.
167. Quinn, M. T., F. R. DeLeo, and G. M. Bokoch. 2007. Neutrophil methods and protocols. Preface. *Methods Mol Biol* 412:vii-viii.
168. Dinauer, M. C. 2007. Disorders of neutrophil function: an overview. *Methods Mol Biol* 412:489-504.
169. Vowells, S. J., T. A. Fleisher, S. Sekhsaria, D. W. Alling, T. E. Maguire, and H. L. Malech. 1996. Genotype-dependent variability in flow cytometric evaluation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase function in patients with chronic granulomatous disease. *J Pediatr* 128:104-107.
170. Yu, H. B., and B. B. Finlay. 2008. The caspase-1 inflammasome: a pilot of innate immune responses. *Cell Host Microbe* 4:198-208.
171. Faustin, B., L. Lartigue, J. M. Bruey, F. Luciano, E. Sergienko, B. Bailly-Maitre, N. Volkmann, D. Hanein, I. Rouiller, and J. C. Reed. 2007. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell* 25:713-724.
172. Martinon, F., L. Agostini, E. Meylan, and J. Tschopp. 2004. Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr Biol* 14:1929-1934.
173. Franchi, L., A. Amer, M. Body-Malapel, T. D. Kanneganti, N. Ozoren, R. Jagirdar, N. Inohara, P. Vandenabeele, J. Bertin, A. Coyle, E. P. Grant, and G. Nunez. 2006. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol* 7:576-582.
174. Miao, E. A., C. M. Alpuche-Aranda, M. Dors, A. E. Clark, M. W. Bader, S. I. Miller, and A. Aderem. 2006. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol* 7:569-575.
175. Kanneganti, T. D., M. Lamkanfi, Y. G. Kim, G. Chen, J. H. Park, L. Franchi, P. Vandenabeele, and G. Nunez. 2007. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity* 26:433-443.
176. Kukulski, F., F. Bahrami, F. Ben Yebdri, J. Lecka, M. Martin-Satue, S. A. Levesque, and J. Seignyn. 2011. NTPDase1 controls IL-8 production by human neutrophils. *J Immunol* 187:644-653.

177. Ohlsson, K., C. Linder, E. Lundberg, and L. Axelsson. 1996. Release of cytokines and proteases from human peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells following phagocytosis and LPS stimulation. *Scand J Clin Lab Invest* 56:461-470.