



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

## **Mecanismos que controlan el desarrollo de inflamación mediada por neutrófilos**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área: **Química Biológica**

**Lic. Irene Angelica Keitelman**

Directora: Dra. Analía S. Trevani

Consejero de estudios: Dra. Gabriela C. Fernández

Laboratorio de Inmunidad Innata  
Instituto de Medicina Experimental (IMEX) - CONICET  
Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires

Buenos Aires, Argentina, 2019

## MECANISMOS QUE CONTROLAN EL DESARROLLO DE INFLAMACIÓN MEDIADA POR NEUTRÓFILOS

Los neutrófilos son leucocitos que cumplen un papel clave en la defensa antimicrobiana. Éstos constituyen las células más numerosas de la sangre periférica, con una producción que se incrementa dramáticamente durante la inflamación o infección sistémica. Tradicionalmente se les ha adjudicado un papel microbicida en la respuesta inmune, pero estudios recientes demostraron que pueden modular el curso de las mismas a través de la secreción de citoquinas, entre las cuales se encuentra la Interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Ésta es una citoquina proinflamatoria central en procesos fisiopatológicos que ejerce efectos pleiotrópicos tanto sobre el sistema inmune innato como el adaptativo. La IL-1 $\beta$  es sintetizada como un precursor inactivo que requiere clivaje proteolítico para ser activado. En respuesta a la estimulación con LPS y ATP, los neutrófilos humanos sintetizan pro-IL-1 $\beta$  y median la generación de su forma activa a través de la caspasa-1 tras la activación del inflamasoma. La IL-1 $\beta$  carece de péptido señal, por lo que es sintetizada en el citoplasma y secretada por vías no convencionales de naturaleza controvertida, que son independientes de la vía canónica que involucra al retículo endoplásmico-aparato de Golgi. En este trabajo de tesis aportamos evidencias que sustentan que un mecanismo de autofagia secretoria se encuentra involucrado en la exportación de IL-1 $\beta$  en neutrófilos humanos, a través de estudios cinéticos cuantitativos que involucraron inmunomarcaciones, técnicas de microscopía confocal y cuantificación de las imágenes, así como ensayos de ELISA específicos y Western Blot. Estos estudios también indicaron que aun cuando los neutrófilos humanos liberan pro-IL-1 $\beta$ , su secreción no está mediada por autofagia. Además, los resultados evidenciaron que las serinproteasas neutrofílicas regulan la secreción de la IL-1 $\beta$ . Nuestros hallazgos indicaron que la IL-1 $\beta$  es secretada mayoritariamente en forma soluble, y sólo en una mínima proporción dentro de microvesículas y exosomas. Los resultados son compatibles con un modelo que involucra la participación de la chaperona HSP-90 y de la Gasdermina D en la translocación de la IL-1 $\beta$  a las vesículas. Nuestros hallazgos también sugirieron que la autofagia controla el destino de los inflasomas. Teniendo en cuenta las diversas condiciones de naturaleza infecciosa e inflamatoria en las que los neutrófilos infiltran masivamente los tejidos, los resultados de esta tesis aportan blancos moleculares potenciales, que podrían ser sujeto de investigaciones en el futuro para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para mitigar la inflamación en patologías en las cuales la IL-1 $\beta$  neutrofílica cumpla un papel relevante en su patogénesis.

**Palabras clave:** *Neutrófilos, inflamación, IL-1 $\beta$ , Autofagia, Secreción no convencional*

## MECHANISMS THAT CONTROL NEUTROPHIL-MEDIATED INFLAMMATION

Neutrophils are leukocytes that play a key role in antimicrobial defense. They constitute the most numerous cells in human peripheral blood, increasing dramatically their number during inflammation or systemic infections. Neutrophils have been traditionally considered within the innate immune response setting for its antimicrobial capacity. However, recent studies have shown that these cells may potentially modulate the course of an immune response by producing and releasing different cytokines, like Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). This is a key pro-inflammatory cytokine that exerts pleiotropic effects on both the innate and adaptive immune system. IL-1 $\beta$  is synthesized as a precursor that requires enzymatic processing in order to be activated. In response to LPS and ATP stimulation, human neutrophils produce pro-IL-1 $\beta$  and mediate the generation of the biological active isoform through activation of the inflammasome and caspase-1. Unlike proteins endowed with the leader (N-terminal signal) peptide, IL-1 $\beta$  is a leaderless cytosolic protein which cannot enter the conventional secretory pathway normally operating via the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. The mechanisms involved in its secretion are still controversial. In this thesis work we obtained evidence that supports that an autophagic secretory mechanism is involved in IL-1 $\beta$  exportation from human neutrophils, by immunostaining, confocal microscopy, quantitative image analysis specific ELISA assays and Western Blot. Moreover, our studies indicated that even though neutrophils release pro-IL-1 $\beta$ , its secretion is not mediated by autophagy. Furthermore, our results pointed out that neutrophil serineproteases can regulate IL-1 $\beta$  secretion. Our findings also suggest that IL-1 $\beta$  is mainly exported soluble and a minimal proportion through exosomes and microvesicles. The results agree with a model that involves the participation of the chaperone HSP-90 and Gasdermin D in the translocation of IL-1 $\beta$  into the vesicles. Our findings also suggested that autophagy controls the fate of inflammasomes. Considering the diverse infectious and inflammatory conditions in which neutrophils massively infiltrate the tissues, the results presented in this thesis provided evidence of potential molecular targets that could be evaluated in the future to design new therapeutic strategies to mitigate inflammation in those pathologies in which neutrophil IL-1 $\beta$  plays a significant role in their pathogenesis.

**Key words:** *Neutrophils, inflammation, IL-1 $\beta$ , Autophagy, unconventional secretion*

## Agradecimientos

A Analía, por iniciarme y ser guía durante todo este camino en el mundo de la investigación, por la paciencia, por la dedicación, por siempre alentarme a seguir aun cuando las cosas no siempre salen como uno quisiera, y principalmente por su calidad humana, en todo momento.

A Jere, por transmitirme su pasión, dedicación y darme otra mirada de la ciencia.

A Lau, por darme las primeras herramientas y enseñarme los primeros pasos para trabajar en el laboratorio.

A Flor y Mauri, personas sin las cuales nada de esto podría haber pasado. No sólo son unos compañeros de laboratorio increíbles, siempre dispuestos a ayudarte cuando lo necesitás, sino que aún mejor que eso, son amigos. Y nada mejor que ir a trabajar a un lugar donde te sentís entre amigos. Gracias por escucharme y bancarme en el trabajo diario, y por hacerlo ininidad de veces fuera de él. Gracias, por todo.

A Flor, por estar siempre con la palabra justa, con el optimismo que la caracteriza, que te saca de momentos difíciles.

A Mauri, por las charlas de los miércoles y los mates compartidos.

A Maiu y Maxi, por estar siempre dispuestos a ayudar y dar una mano, y hacer el trabajo del laboratorio mejor cada día.

A todo IO, los que siguen y los que ya están por otros lares, por compartir el trabajo día a día y hacerlo más fácil y divertido. También por los encuentros y momentos fuera del laboratorio.

A Fede, por el aguante durante las incontables horas pasadas en el confocal.

A los grietenses, gracias por el aguante y el tiempo compartido desde el comienzo del camino facultativo. Mención especial al tesis support group, que fue fundamental para toda la etapa de escritura, y a Joaqui por ayudarme todas las veces que necesité, con el papeleo y las cosas burocráticas.

A Meli, mi amiga hermana desde jardín. Soy muy afortunada por tenerte en mi vida y poder seguir esta amistad desde hace tantos años. Te agradezco todo el apoyo y lo que hacés por mí, desde siempre.

A mis amigos de siempre, que estuvieron acompañándome durante este camino.

A mi mamá, mi papá y mi hermana, por ser mi apoyo, y estar conmigo durante este proceso incondicionalmente. Gracias.

A Martin, por cuidarme, escucharme, apoyarme y alentarme siempre a ser mejor.

*A mi papá*



# Índice

Agradecimientos	3
Índice	5
Abreviaturas	7
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>10</b>
La respuesta inmune	11
Mecanismos de reconocimiento del sistema inmune innato	12
Neutrófilos	14
<i>Origen y vida media</i>	14
<i>Rol de los neutrófilos en la respuesta inmune antiinfecciosa</i>	14
Acciones antiinfecciosas de los neutrófilos	15
<i>Mecanismos microbicidas independientes del oxígeno</i>	15
<i>Mecanismos microbicidas dependientes del oxígeno</i>	18
<i>Procesos que intervienen en la eliminación de agentes infecciosos</i>	19
Fagocitosis	19
Formación de trampas extracelulares de neutrófilos	20
Degranulación	20
Secreción de citoquinas	21
Familia de la Interleuquina 1	23
IL-1 $\beta$	24
<i>Actividad biológica y rol en la inflamación</i>	24
IL-1 $\beta$ en el contexto de las enfermedades autoinflamatorias	25
<i>Síntesis de la IL-1<math>\beta</math></i>	26
<i>Procesamiento de la IL-1<math>\beta</math></i>	26
Procesamiento de la IL-1 $\beta$ dependiente de la caspasa-1	26
Procesamiento de la IL-1 $\beta$ independiente de la caspasa-1	28
<i>IL-1<math>\beta</math> y neutrófilos</i>	29
Impacto de la IL-1 $\beta$ producida por los neutrófilos en procesos infecciosos	30
<i>Mecanismos de secreción propuestos para la IL-1<math>\beta</math></i>	30
Secreción mediante exocitosis de lisosomas secretorios	31
Secreción mediante liberación de vesículas extracelulares (VE): microvesículas (MV) y exosomas (Ex)	32
Secreción mediante transportadores ABC	32
Secreción por inducción de piroptosis	33
Secreción por autofagia secretoria	33
Autofagia	34
<i>Mecanismos de autofagia degradativa</i>	34
Macroautofagia	35
Microautofagia	38
Autofagia mediada por chaperonas	39
<i>Mecanismo de autofagia secretoria</i>	40
Antecedentes del grupo	41
<b>OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
Objetivo general	44
Objetivos específicos	44
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>45</b>
Materiales y reactivos utilizados	46
Obtención de los neutrófilos	47
Protocolo para estimular la síntesis y el procesamiento de la IL-1 $\beta$	48
Cuantificación de citoquinas intra y extracelulares por ELISA	49
Estudios de microscopía láser confocal (MLC)	50
Estudios de citometría de flujo	50
Fijación, permeabilización e inmunomarcación de las células para MLC y citometría de flujo	50
Cuantificación de las imágenes obtenidas por MLC	51
<i>Cuantificación de la intensidad de fluorescencia total y vesicular</i>	52

---

<i>Cuantificación del área vesicular colocalizante por célula</i>	52
<i>Coefficientes de colocalización de Manders</i>	53
Estudios en tiempo real ( <i>time lapse</i> ) por MLC	54
Marcación mediante sondas fluorescentes para estudios por MLC	54
Preparación de extractos celulares totales para Western Blot	55
Ensayo de Western Blot	55
Análisis estadístico	56
<b>RESULTADOS</b>	<b>58</b>
Exportación de la citoquina IL-1 $\beta$ por los neutrófilos humanos	59
<i>Activación del flujo autofágico por estimulación de neutrófilos con LPS y ATP</i>	59
<i>Participación de la autofagia en la secreción de IL-1<math>\beta</math> en neutrófilos humanos</i>	61
<i>Evidencia de que las vesículas conteniendo IL-1<math>\beta</math> no transitan a una vía degradativa clásica</i>	72
<i>Impacto de la autofagia en la secreción de pro-IL-1<math>\beta</math></i>	73
<i>Identificación de la forma en que la IL-1<math>\beta</math> es liberada al medio extracelular</i>	77
<i>Papel de la chaperona HSP-90 en el mecanismo de secreción de la IL-1<math>\beta</math></i>	78
<i>Presencia de la GTPasa pequeña Rab27a en las vesículas que contienen IL-1<math>\beta</math></i>	82
<i>Papel de las serinproteasas neutrofílicas en la secreción de la IL-1<math>\beta</math></i>	83
<i>Papel de la Gasdermina D (GSDMD) en la secreción de IL-1<math>\beta</math></i>	88
Destino de componentes del inflamasoma	91
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>94</b>
Conclusión	105
<b>ANEXO</b>	<b>106</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>111</b>

## Abreviaturas

<b>3-MA</b>	3-metil adenina
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ALR</b>	Receptores tipo AIM-2 ( <i>Absent in melanoma-2 like receptors</i> )
<b>AMPC</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>ARNdc</b>	Ácido ribonucleico doble cadena
<b>ARNsc</b>	Ácido ribonucleico simple cadena
<b>ASC</b>	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD</i>
<b>ATG</b>	Proteínas relacionadas a la autofagia ( <i>AuTophagy-related proteins</i> )
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato ( <i>Adenosine triphosphate</i> )
<b>Baf A1</b>	Bafilomicina A1
<b>BFA</b>	Brefeldina A
<b>CARD</b>	Dominio de activación y reclutamiento de caspasas ( <i>Caspase activation and recruitment domains</i> )
<b>CLR</b>	Receptores tipo lectina C ( <i>C-type Lectin-like receptors</i> )
<b>CML</b>	Compartimientos multilaminares
<b>CMV</b>	Cuerpos multivesiculares
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa tipo 2
<b>Cytb<sub>558</sub></b>	Citocromo b <sub>558</sub>
<b>EGC</b>	Enfermedad granulomatosa crónica
<b>ESCRT</b>	Complejos de clasificación endosomal requeridos para la maquinaria de transporte ( <i>Endosomal sorting complexes required for transport</i> )
<b>Ex</b>	Exosomas
<b>GRASP</b>	Proteínas de reordenamiento y apilamiento del Golgi ( <i>Golgi reassembly stacking protein</i> )
<b>GSDMD</b>	Gasdermina D
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano picante ( <i>Horseradish peroxidase</i> )
<b>HSC-70</b>	Proteína 8 de <i>shock</i> térmico de 70 KDa ( <i>Heat shock protein 70</i> )
<b>HSP-90</b>	Proteína de <i>shock</i> térmico de 90 KDa ( <i>Heat shock protein 90</i> )
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IL-1Ra</b>	Antagonista del receptor de la IL-1
<b>iNOS</b>	Enzima óxido nítrico sintetasa inducible ( <i>Inducible nitric oxide synthase</i> )
<b>IRAK4</b>	Quinasa 4 asociada al receptor de IL-1 ( <i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 4</i> )
<b>IRO</b>	Intermediarios reactivos del oxígeno
<b>LAD1</b>	Deficiencia en la adhesión leucocitaria de tipo 1
<b>LAMP</b>	Proteínas lisosomales asociadas a membrana ( <i>Lysosome-associated membrane protein</i> )
<b>LC3</b>	Cadena liviana 3 de la proteína asociada a microtúbulos ( <i>Microtubule-associated protein light chain 3</i> )
<b>LC3B+</b>	Puntos LC3B positivos
<b>LIR</b>	Región de interacción con LC3 ( <i>LC3-interacting region</i> )
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MAPK</b>	Proteínas quinasas activadas por mitógenos ( <i>Mitogen-activated protein kinase</i> )
<b>MLC</b>	Microscopía láser confocal
<b>MMO</b>	Macrófagos murinos derivados de médula ósea
<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa
<b>MV</b>	Microvesículas

<b>MyD88</b>	Proteína citoplasmática de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 ( <i>Myeloid differentiation primary response 88</i> )
<b>NADPH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato ( <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> )
<b>NF-κB</b>	Factor de transcripción nuclear κB
<b>NLRC</b>	Molécula NLR sensora con dominios CARD ( <i>NLR sensor with a CARD domain-containing protein</i> )
<b>NLRP</b>	Molécula sensora NLR con dominios pirina ( <i>NLR sensor molecule containing pyrin</i> )
<b>NLRs</b>	Receptores de tipo NOD ( <i>nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors</i> )
<b>NOD</b>	Dominio central de unión a nucleótidos/oligomerización ( <i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i> )
<b>NT-GSDMD</b>	Fragmento N-terminal de gasdermina
<b>P.e.</b>	Posestimulación
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-quinasa ( <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> )
<b>PI3P</b>	Fosfatidilinositol 3-fosfato ( <i>Phosphatidylinositol 3-phosphate</i> )
<b>PMAD</b>	Patrones moleculares asociados a daño
<b>PMAP</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>PR3</b>	Proteinasa 3
<b>PYD</b>	Dominio pirina ( <i>Pyrin domain</i> )
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RLR</b>	Receptores de tipo RIG-I ( <i>retinoic acid inducible I-like receptors</i> )
<b>RRL</b>	Rico en repeticiones de leucina
<b>RRP</b>	Receptores de reconocimiento de patrones
<b>SNARE</b>	<i>Soluble NSF-attachment protein [SNAP] receptors</i> ; NSF representa <i>N-ethylmaleimide sensitive factor</i>
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TIR</b>	Dominio intracelular del receptor de IL-1, similar a TLR ( <i>Toll/IL-1 receptor</i> )
<b>TLR</b>	Receptores tipo Toll ( <i>Toll-like receptors</i> )
<b>TRIM16</b>	Proteína de motivo tripartita 16 ( <i>Tripartite Motif-containing protein 16</i> )
<b>UAF</b>	Unidades arbitrarias de fluorescencia
<b>VE</b>	Vesículas extracelulares
<b>WN</b>	Wortmanina

Los resultados de esta tesis doctoral fueron parcialmente publicados en:

**Iula, L\***, **Keitelman, I. A.\***, Sabbione, F., Fuentes, F., Guzman, M., Galletti, J. G., ... & Trevani, A. S. (2018). Autophagy Mediates Interleukin-1 $\beta$  Secretion in Human Neutrophils. *Frontiers in immunology*, 9, 269. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00269>

**\* Ambos autores contribuyeron por igual a este trabajo.**

# **Introducción**

## La respuesta inmune

Los vertebrados han desarrollado un sistema inmune que los protege de patógenos tales como bacterias, hongos, virus, parásitos y de otras injurias. Este sistema comprende una compleja colección de células, cuyos receptores pueden sentir y reconocer las señales de daño microbiológico y responder vía cascadas de señalización que median la inflamación y los procesos asociados a ella para eliminar directamente a los patógenos <sup>1</sup>.

Tradicionalmente a este sistema se lo clasificó en sistema inmune innato y adaptativo. Sin embargo, resulta cada vez más claro que las respuestas que involucran no son independientes entre sí, sino que existen vías de señalización que se entrecruzan y promueven la movilización de una variedad de células inmunes que siguen una secuencia temporal, empezando por un ataque a patógenos en general, hasta el desarrollo y montaje de una "memoria inmunológica" contra las distintas injurias en particular <sup>2,3</sup>.

El sistema inmune innato responde rápido, en cuestión de minutos a horas, y esta respuesta puede por sí misma ser capaz de eliminar al invasor dependiendo del tamaño del inóculo y la virulencia del patógeno. En otros casos, es posible que sólo logre contener la infección hasta que se desarrolle una respuesta adaptativa, que puede demandar desde días a semanas. Esta respuesta involucra el reconocimiento de fragmentos antigénicos específicos de cada patógeno por linfocitos B y T. En la mayor parte de los procesos infecciosos, estos mecanismos permitirán eliminar al patógeno, luego comenzará una fase de reparación del tejido y recuperación de la homeostasis <sup>4,5</sup>. Cuando esta respuesta se establece, el sistema inmune adaptativo permite reconocer con mucha mayor rapidez un segundo ataque de la misma clase <sup>1</sup>.

Frente al ataque de un patógeno, el sistema inmune innato representa la primera línea de defensa. Entre las células que van a ejercer las primeras acciones figuran neutrófilos, células dendríticas, monocitos, macrófagos, y células T *natural killer*. Sumado a ellas se encuentran la piel y los epitelios del tracto respiratorio y gastrointestinal que actúan de interfase entre los tejidos y el ambiente.

Si bien la respuesta inflamatoria es esencial para la defensa del hospedador ante las injurias a las que está expuesto en el medio ambiente, si la misma no es controlada correctamente puede resultar contraproducente porque puede dañar secundariamente los tejidos. En general, el tiempo que dura la respuesta inflamatoria y el daño tisular asociado a ella es limitado, dado que las infecciones tienden a resolverse de manera rápida por los propios mecanismos del sistema inmune. Incluso, existen situaciones donde el daño tisular producto de la inflamación es admisible. Por ejemplo, en el caso de una infección, cuando el resultado final es limitar un escenario en el que está en riesgo la vida del hospedador. Por el contrario, en los casos de

inflamación estéril, como el estímulo *per sé* no es perjudicial para el hospedador, aún no resulta sencillo entender la relación costo-beneficio de la respuesta inflamatoria <sup>6</sup>.

## **Mecanismos de reconocimiento del sistema inmune innato**

El sistema inmune innato tiene la habilidad de discriminar lo propio de lo no propio. Esto es posible gracias al reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP). Los PMAP son estructuras que se encuentran conservadas, compartidas por grandes grupos de microorganismos y son componentes esenciales para su funcionamiento. Entre ellos se encuentran los componentes de las paredes celulares o membranas microbianas como las lipoproteínas o glicoproteínas de superficie (peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, lipopolisacárido -LPS-), y los ácidos nucleicos microbianos, incluyendo los motivos CpG no metilados del ácido desoxirribonucleico (ADN) y los ácido ribonucleicos doble cadena (ARNdc) o simple cadena (ARNsc) <sup>4,5</sup>.

El reconocimiento de estos PMAP se lleva a cabo mediante proteínas especializadas llamadas receptores de reconocimiento de patrones (RRP). Estos mismos RRP pueden reconocer patrones moleculares asociados a daño (PMAD) que no provienen de patógenos sino que son producto del llamado daño estéril <sup>7,8</sup>. La detección de estos PMAP y PMAD por los RRP desencadena respuestas inflamatorias al inducir la activación de vías de transducción intracelulares que promueven la expresión de genes que median la respuesta del hospedador a corto y largo plazo. Además, el reconocimiento de microbios por los RRP que se expresan en las células presentadoras de antígeno, en particular sobre las células dendríticas, contribuye a la activación de la respuesta inmune adaptativa <sup>5</sup>.

Los RRP pueden ser expresados en la superficie celular, encontrarse en compartimentos intracelulares, o ser secretados al torrente sanguíneo o fluidos tisulares <sup>4</sup>. Las principales funciones que disparan su activación comprenden la opsonización, la activación del sistema de complemento y cascadas de coagulación, la fagocitosis, la inducción de apoptosis y la activación de cascadas de vías proinflamatorias.

Existen varios tipos de RRP que pueden ser agrupados en distintas familias. Su expresión es diferencial según el tipo celular o tisular e incluso puede variar dentro de un mismo tipo dependiendo el estado de activación en el que se encuentre. Dichas familias comprenden los receptores tipo lectina C (*C-type Lectin-like receptors*; CLR), receptores de tipo RIG-I (*retinoic acid inducible I-like receptors*; RLR), receptores tipo AIM-2 (*Absent in melanoma-2 like receptors*; ALR) y otros sensores de ácidos nucleicos, receptores tipo Toll (*Toll-like receptors*; TLR) y

receptores de tipo NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors; NLR*)<sup>5,9</sup>.

Los CLR incluyen receptores transmembrana y receptores solubles, y se caracterizan por la presencia de dominios de unión a hidratos de carbono. Éstos reconocen arreglos de hidratos de carbono sobre virus, bacterias, y hongos, y estimulan la producción de citoquinas proinflamatorias o modulan la señalización mediada por TLR <sup>10</sup>.

Los RLR son receptores citoplasmáticos y reconocen el ARN genómico de virus ARNdc y el ARNdc generado por la replicación de virus ARNsc. La activación de los RLR desata una respuesta antiviral mayormente mediada por la expresión de citoquinas proinflamatorias y los interferones de tipo I, limitando la replicación viral. Además, su expresión se ve potenciada frente a estos estímulos <sup>9</sup>.

Los receptores de la familia de los TLR son de los mejor caracterizados y son los responsables del reconocimiento de los patógenos fuera de la célula y en endosomas <sup>2</sup>. En humanos se identificaron diez tipos distintos de TLR, cada uno de los cuales reconoce distintos PMAP o PMAD. El TLR4 reconoce el LPS de las bacterias Gram-negativas; el TLR2 reconoce componentes de bacterias, micoplasmas, hongos y virus; y el TLR5 reconoce a la flagelina, la proteína estructural del flagelo, que es el órgano que les confiere movilidad a ciertas bacterias <sup>9</sup>. Los TLR 3, 7, 8 y 9, en cambio, se especializan en la detección de virus y el reconocimiento de ácidos nucleicos, que no son únicos de los patógenos. En este caso, la discriminación de lo propio frente a lo ajeno es mediada, no tanto por la especificidad de la naturaleza del ligando, sino por la accesibilidad del mismo a estos receptores. En general se encuentran en compartimentos intracelulares y detectan ácidos nucleicos virales en endosomas, aunque pueden reconocer ácidos nucleicos propios en situaciones patológicas <sup>9,11</sup>.

Los NLR son sensores citoplasmáticos de patógenos compuestos por un dominio central de unión a nucleótidos/oligomerización (NOD), un dominio C-terminal rico en repeticiones de leucina (RRL) y una porción N-terminal que en la mayoría de los NLR comprende dominios que sirven como anclas para otras proteínas, como los dominios de activación y reclutamiento de caspasas (CARD, por sus siglas en inglés) o de unión a pirinas (PYD, por sus siglas en inglés) <sup>12</sup>. Algunos miembros de la familia pueden unir PMAP o PMAD y activar el factor de transcripción nuclear *kB* (NF-*kB*, por sus siglas en inglés) o activarse y promover la secreción de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina (IL)-1 $\beta$  e IL-18 en un proceso que involucra la formación de un complejo, que se describirá luego, denominado inflammasoma. Algunos de estos son los llamados receptores NLRP (*NLR sensor molecule containing pyrin* (NLRP)1, NLRP3 y *NLR with a CARD domain-containing protein* (NLRC) 4) <sup>13</sup>. Este tema será desarrollado más adelante.

El reconocimiento de los agentes patógenos por medio de este grupo de receptores conduce al desarrollo de una gran cantidad de eventos que constituyen la respuesta inflamatoria. Entre ellos se encuentran la liberación de quimioattractantes y moléculas vasoactivas, la secreción de citoquinas proinflamatorias y el reclutamiento de neutrófilos y monocitos, entre otros <sup>14</sup>. Es a través de estos mediadores que la inflamación cumple un papel crítico en la resolución o, en su defecto, en la contención de la infección.

## **Neutrófilos**

### ***Origen y vida media***

Los neutrófilos se originan y maduran en la médula ósea, a razón de 1 a  $2 \times 10^{11}$  células por día en un organismo adulto sano en estado basal. La producción de los neutrófilos es cuantitativamente la mayor actividad de la médula ósea, involucrando aproximadamente dos tercios de la mielopoyesis (generación de células mieloides). Luego de la maduración son liberados al torrente sanguíneo y se constituyen como la población más numerosa en circulación<sup>15</sup>.

Los neutrófilos son considerados como células de una vida media relativamente corta en circulación, que se extiende entre las 4,3 y 17,5 horas <sup>16</sup>. Es por esto que la homeostasis de estos granulocitos es mantenida con un fino balance entre la granulopoyesis, el almacenamiento y liberación de médula ósea, la marginación intravascular y la eliminación <sup>17</sup>.

La marginación se refiere al tránsito prolongado de neutrófilos por órganos específicos, lo que resulta en una población intravascular discreta (marginada) (en inglés se la conoce como *marginated pool*, y coloquialmente en español como *pool* marginal de neutrófilos); estos pueden ser encontrados en los pulmones, el hígado, el bazo, y la médula ósea <sup>18</sup>. La primera evidencia de la existencia de este *pool* marginal se obtuvo en la década de 1960 cuando se observó que el 50% de los neutrófilos radioactivamente marcados “desaparecía” de circulación luego de la infusión de los mismos <sup>19</sup>. Investigaciones más tardías demostraron que los órganos en los que se establece el almacenamiento tienen en común una red de capilares más grandes y que el tamaño de este *pool* marginal depende, tanto del influjo de sangre de ese órgano en particular, como del tiempo de tránsito de los neutrófilos por esa red vascular <sup>18</sup>.

### ***Rol de los neutrófilos en la respuesta inmune antiinfecciosa***

Los neutrófilos son fagocitos profesionales por excelencia y suelen cumplir un rol beneficioso en la respuesta antiinfecciosa. Su número se incrementa marcadamente en circulación en infecciones bacterianas o fúngicas, siendo convocados masivamente a dichos

focos infecciosos <sup>20</sup>. Por otra parte, si bien la contribución de los neutrófilos a la respuesta inmune antiviral no ha sido claramente establecida, estas células son las primeras y más abundantemente reclutadas a sitios de la infección viral y se ha reportado su participación en la resolución de algunas de estas patologías <sup>21,22</sup>.

El papel preponderante que cumplen los neutrófilos en la respuesta inmune es expuesto en pacientes con desórdenes funcionales o cuantitativos, tales como la enfermedad granulomatosa crónica (EGC), la deficiencia en la adhesión leucocitaria de tipo 1 (LAD1) o diversas formas de neutropenia, que se caracterizan por padecer una severa susceptibilidad a infecciones de naturaleza bacteriana y fúngica que amenazan su sobrevivencia <sup>23</sup>.

## **Acciones antiinfecciosas de los neutrófilos**

Cuando los neutrófilos son reclutados al sitio de infección ejecutan funciones para intentar contenerla y en lo posible, resolverla <sup>20</sup>. Para ello, estas células son capaces de activar dos tipos de mecanismos microbicidas: los mecanismos independientes del oxígeno, que involucran a proteínas con acción antimicrobiana; y los mecanismos dependientes del oxígeno que requieren la activación de la enzima Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH) oxidasa y la consecuente producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO). Estos mecanismos integran distintos procesos, como la fagocitosis, la NETosis y la propia degranulación, que ponen en marcha los neutrófilos para intentar eliminar a los microorganismos invasores.

### ***Mecanismos microbicidas independientes del oxígeno***

Los neutrófilos se caracterizan por poseer una gran cantidad de gránulos y vesículas secretorias, en los que almacenan una amplia variedad de proteínas, algunas con actividad antimicrobiana, que difieren ampliamente en su potencia y especificidad por la célula blanco y que pueden matar a los microorganismos directa o indirectamente. Estas proteínas son sintetizadas durante distintas etapas de la diferenciación de los neutrófilos en médula ósea. Por ello, los gránulos que se producen durante las primeras etapas de la granulopoyesis difieren en contenido de los formados en los estadios más tardíos. Algunas proteínas granulares están restringidas a un único tipo de gránulos mientras otras se encuentran en más de un tipo. Sin embargo, la proporción en que se hallan puede variar significativamente, siendo algunas de ellas muy abundantes en unos gránulos y estando muy reducidas en otros <sup>24</sup>.

Tradicionalmente se clasificó a los gránulos de los neutrófilos en azurófilos, específicos, de gelatinasa y vesículas secretorias. No obstante, en función de su contenido, también se plantea

la existencia de gránulos ricos en ficolina-1, que comparten proteínas con las vesículas secretorias, pero son pobres en contenido de gelatinasa <sup>24,25</sup>.

Los distintos gránulos del neutrófilo difieren en su capacidad de ser movilizados frente a estímulos. La exocitosis de los mismos tiene lugar de manera jerárquica, de modo que una estimulación mínima induce la exocitosis de las vesículas secretorias, mientras que un incremento en la potencia del estímulo permite la exocitosis de gránulos ricos en ficolina, gelatinasa, secundarios y azurófilos, en ese orden <sup>20,25</sup>.

Los gránulos azurófilos (también llamados primarios), son considerablemente heterogéneos en tamaño y forma, lo que parece depender del empaquetamiento y síntesis de las proteínas que los componen. Esta clase de gránulos son pobremente exocitados en respuesta a estímulos <sup>26,27</sup> y se cree que su función primaria es eliminar y degradar aquellos microorganismo que fueron fagocitados e incorporados a un fagolisosoma <sup>28</sup>. Aunque contienen hidrolasas ácidas y proteínas microbidas, se definen por su alto contenido de mieloperoxidasa (MPO), que representa el 5% del peso seco total del neutrófilo y es un participante fundamental en los mecanismos microbidas dependientes del oxígeno.

Estos gránulos también poseen las enzimas serinproteasas (llamadas así por la presencia de histidina, aspartato y serina en su sitio activo). Entre ellas se encuentran la elastasa, la proteinasa 3 (PR3), la catepsina G y la serinproteasa 4 de neutrófilos <sup>29</sup>. Éstas presentan actividad proteolítica frente a componentes de la matriz extracelular como la elastina, fibronectina, laminina, colágeno tipo IV y vitronectina, y es por ello que no actúan sólo sobre los componentes de los microorganismos, sino que también están implicadas en el daño a los tejidos y su inflamación. Por estos motivos, su actividad debe ser estrictamente regulada por la acción de inhibidores intracelulares o extracelulares como la  $\alpha$ -1-antitripsina y la  $\alpha$ -2-macroglobulina, las cuales a su vez son inactivadas por los IRO producidos por la propia activación del neutrófilo. Por otro lado, ensayos *in vitro* demostraron que tanto la catepsina G como la PR3 y la azurocidina poseen capacidad antimicrobiana independiente de su actividad enzimática contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, levaduras y hongos <sup>30</sup>.

Otra proteína importante que compone estos gránulos es la proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad, que tiene como blanco específico a las bacterias Gram-negativas para su destrucción a concentraciones nanomolares <sup>25</sup>.

La mayor parte de los gránulos azurófilos también contiene 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  $\alpha$ -1-antitripsina y la  $\alpha$ -1-antiquimotripsina<sup>30</sup>.

Los gránulos azurófilos también poseen proteasas que son encontradas en lisosomas de otros tipos celulares, como las cisteín proteasas. Sin embargo, existe una discusión aún no resuelta acerca de si estos gránulos deberían ser considerados como los lisosomas de los neutrófilos, o si estas células poseen una entidad distinta identificable como lisosoma. Esto se debe a que algunas de las proteínas típicas de los lisosomas, como las proteínas lisosomales asociadas a membrana (LAMP) 1 y 2 no están presentes en los gránulos azurófilos, pero sí se encuentran asociadas a cuerpos multivesiculares (CMV; estructuras consideradas parte de la vía endosomal) y en compartimientos multilaminares (CML). No obstante, la proteína LAMP3, también conocida como CD63, sí se expresa en los gránulos azurófilos, así como muchos receptores de glicoproteínas conteniendo manosa-6 fosfato<sup>31</sup>. Por otro lado, el receptor de manosa 6-fosfato independiente de cationes está presente en CMV. En conjunto, estos hallazgos llevaron a sugerir que los CMV y los CML representan los verdaderos lisosomas de los neutrófilos, y a plantear la posibilidad de que los neutrófilos no posean una estructura similar a los lisosomas de otros tipos celulares, pues debido a su corta vida media, no necesitarían un gran sistema de reciclado o de degradación adicional a la maquinaria que ya poseen para el material endocitado. Otras hallazgos, por el contrario, indicaron que los pacientes con Chediak-Higashi, un desorden ocasionado por un defecto en un gen que codifica a una proteína que regula el tráfico lisosomal en otras células, afecta el tráfico de gránulos azurófilos, sustentando la posibilidad de que éstos representen lisosomas<sup>31</sup>.

Los gránulos específicos, o secundarios, son ricos en sustancias antimicrobianas y participan en la actividad microbicida ya sea por fusión con los fagosomas o por la liberación de su contenido al ambiente extracelular. Uno de sus componentes principales es la lactoferrina, que ejerce efectos directos sobre virus, bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y hongos al ser microbicida y bacteriostática<sup>32</sup>.

Los gránulos de gelatinasa, o terciarios, se movilizan cuando los neutrófilos establecen el contacto primario con el endotelio activado<sup>33</sup>. Estos gránulos contienen enzimas que degradan componentes de la matriz extracelular, como la gelatinasa, y receptores de membrana, como CD11b, CD67, CD177, SCAMP y VAMP2<sup>31</sup>, que son importantes en las respuesta temprana de los neutrófilos y su extravasación hacia los tejidos inflamados.

Los gránulos ricos en ficolina 1 son similares a las vesículas secretorias (descritos a continuación) en cuanto contenido, función, y propensión a ser excitados del neutrófilo. Poseen ficolina-1, proteína capaz de unirse a la superficie de los microorganismos y activar el

complemento, así como proteínas involucradas en la extravasación del neutrófilo a los tejidos<sup>34,35</sup>.

Las vesículas secretorias, a diferencia del resto de los gránulos de los neutrófilos, no emergen del Golgi, sino que se forman por endocitosis en etapas tardías de la diferenciación del neutrófilo, es por esto que su contenido incluye predominantemente albúmina y proteínas derivadas del plasma. Estas vesículas constituyen un importante reservorio de receptores asociados a membrana, que incluyen entre otras moléculas CD11b/CD18, CD15, CD16, CD35, MMP-25, LFA-1 y MAC-1; también actina, proteínas de unión a actina, y fosfatasa alcalinas, que son requeridas en las etapas tempranas de la inflamación mediada por neutrófilos<sup>24,31,36</sup>. Las vesículas secretorias son fácilmente excitadas y sus componentes de membrana son esenciales para que el neutrófilo pueda establecer un contacto firme con el endotelio vascular activado y completar la diapédesis hacia el tejido inflamado para localizar y erradicar a patógenos.

### ***Mecanismos microbicidas dependientes del oxígeno***

La producción de IRO es un arma antimicrobiana muy potente y un componente mayoritario de la defensa del sistema inmune innato frente a infecciones bacterianas y fúngicas. Los defectos en la producción de IRO permiten a las bacterias sobrevivir, colonizar repetidamente varios tejidos y eventualmente causar septicemia. Los neutrófilos producen IRO gracias al complejo multiproteico de membrana denominado NADPH oxidasa<sup>37</sup>.

El complejo NADPH oxidasa está compuesto por componentes citosólicos, las proteínas p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup>, y otros asociados a la membrana, las moléculas p22<sup>phox</sup> y gp91<sup>phox</sup>, las cuales conforman un heterodímero conocido como citocromo b<sub>558</sub> (Cytb<sub>558</sub>). El Cytb<sub>558</sub> está localizado principalmente en la membrana de las vesículas secretorias, de los gránulos específicos del neutrófilo y, en menor medida, en la membrana plasmática y constituye el núcleo catalítico de la NADPH oxidasa. La separación de los componentes de la NADPH oxidasa en distintos compartimentos subcelulares previene su ensamblado espontáneo, evitando de este modo su consecuente activación y potencial daño en células que no se han activado por una injuria<sup>37</sup>.

En el sitio de infección, como se ha explicado anteriormente, los neutrófilos expresan un amplio número de receptores de superficie que reconocen la presencia de patógenos y del ambiente proinflamatorio<sup>38</sup>. La estimulación de estos receptores puede luego conducir a la activación de una variedad de vías de señalización para una efectiva respuesta antimicrobiana, incluyendo la activación de la NADPH oxidasa con la consecuente producción de IRO, a través

de un proceso caracterizado por un incremento abrupto del consumo de oxígeno denominado estallido respiratorio.

La NADPH oxidasa se ensambla en la membrana de los fagosomas y en la membrana plasmática disparándose de este modo la producción en cascada de IRO. La misma comienza con la reducción del oxígeno molecular ( $O_2$ ) a anión superóxido ( $O_2^-$ ). Río abajo del  $O_2^-$ , el cual no es un oxidante potente, se genera por su dismutación peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Si el  $O_2^-$  reacciona con el óxido nítrico, el cual es producido en altos niveles en los sitios inflamatorios, se genera peroxinitrito, un potente oxidante<sup>37</sup>. También, dentro de fagosomas a los cuales se fusionaron gránulos azurófilos, la enzima MPO cataliza la producción, mayoritariamente, de ácido hipocloroso. Este oxidante, es más reactivo que el  $O_2^-$  y es microbicida *in vitro*, y se piensa que también lo es dentro del fagosoma. Sin embargo, hay investigadores que sostienen que el ácido hipocloroso reacciona con grupos amino, produciendo cloraminas, y que estos serían los elementos antimicrobianos más relevantes<sup>39</sup>.

Los IRO juegan un rol clave en la actividad microbicida de los neutrófilos. Esto se pone de manifiesto en la EGC, donde los neutrófilos de los pacientes exhiben baja capacidad microbicida debido a mutaciones en alguno de los genes que componen la NADPH oxidasa, y por lo tanto son susceptibles a una gran cantidad de infecciones<sup>40</sup>.

Además de su acción antimicrobiana directa, los IRO pueden modificar moléculas del hospedador. Algunos ejemplos bien estudiados del impacto de los IRO en vías de señalización incluyen la regulación reversible de varias moléculas blanco, como algunas fosfatasas, metaloproteinasas y caspasas, por oxidación directa de residuos de cisteína. Además, las proteasas de los gránulos pueden ser reguladas por oxidación directa o vía la inactivación oxidativa de sus inhibidores<sup>20</sup>.

## ***Procesos que intervienen en la eliminación de agentes infecciosos***

### **Fagocitosis**

Los neutrófilos deben abandonar el flujo sanguíneo atravesando el endotelio por diapédesis para llegar al sitio de infección. Los quimioattractantes secretados por los microorganismos, o por las células del hospedador en el foco infeccioso, guían esta extravasación. Una vez que estos granulocitos acceden al foco infeccioso comienza el proceso de fagocitosis<sup>41</sup>. Éste constituye el mecanismo más importante para remover patógenos y *debris* celular. Es un proceso activo, mediado por receptor, en el cual una partícula o un microorganismo es internalizado a través de una invaginación de la membrana celular al interior de una vacuola llamada fagosoma.

El mecanismo depende de las interacciones entre el neutrófilo y el microorganismo, y puede ocurrir en forma directa por reconocimiento de PMAP por los RRP, o mediada por opsoninas. Este último mecanismo incluye dos ejemplos representativos: el mediado por los receptores para Fc de la inmunoglobulina G (IgG) y el mediado por receptores de complemento<sup>20</sup>.

La maduración de los fagosomas ocurre por la fusión con los gránulos, en cuyo lumen se produce el encuentro de las moléculas antimicrobianas. Simultáneamente, se ensambla el complejo de la NADPH oxidasa en la membrana fagosomal, lo que permite la producción de IRO, y en conjunto estos dos mecanismos crean un ambiente tóxico para la mayoría de los patógenos.

La regulación del pH fagosomal en los neutrófilos difiere significativamente de aquella observada en los macrófagos. Mientras que en el macrófago el pH se acidifica gradualmente, en el neutrófilo el pH intrafagosomal es inicialmente alcalino<sup>42</sup>, y se mantiene neutro por períodos prolongados de tiempo<sup>43</sup>. La persistencia de este pH es esencial para la activación de la mayoría de las serinoproteasas, entre ellas la elastasa y la catepsina G, y es mantenido activamente por la NADPH oxidasa y los canales Hv1<sup>44</sup>.

### **Formación de trampas extracelulares de neutrófilos**

Otro de los procesos por el cual los neutrófilos son capaces de ejercer su acción microbicida es la formación de trampas extracelulares de neutrófilos, conocidas como NET (por sus siglas en inglés, de *Neutrophil Extracellular Traps*).

Las NET son grandes estructuras extracelulares con forma de red y están compuestas por proteínas citosólicas y granulares que se ensamblan sobre la cromatina descondensada<sup>45</sup>. Si bien en la mayoría de los casos este material genético es nuclear, en ciertos escenarios se ha encontrado ADN mitocondrial<sup>46</sup>.

### **Degranulación**

La degranulación es definida como la liberación de componentes granulares mediada por receptor, y ocurre tanto intracelularmente, vía anclaje y fusión de los gránulos con fagosomas cargados con microorganismos, o extracelularmente, a través de la fusión con la membrana plasmática y consecuente exocitosis del contenido de los gránulos. En ambos casos, la membrana de los gránulos se vuelve parte de la membrana blanco, modificando su composición molecular. Una diversa gama de moléculas es secretada incluyendo proteínas antimicrobianas, enzimas proteolíticas y otras sustancias proinflamatorias que son almacenadas en el lumen de los gránulos<sup>20,47</sup>.

Se considera que el proceso de degranulación ocurre en cuatro etapas: la primera involucra la remodelación del citoesqueleto de actina y el ensamblado de los microtúbulos, del cual depende el tráfico de los gránulos hacia su membrana blanco. En la segunda etapa de este proceso, antes del contacto, la superficie externa de los gránulos debe estar próxima a la membrana receptora para iniciar el pegado y anclaje, mediado por las proteínas Rab y por un set de proteínas conocidas colectivamente como SNARE (del inglés, *soluble NSF-attachment protein [SNAP] receptors*; NSF representa *N-ethylmaleimide sensitive factor*). La especificidad de las membranas que van a fusionarse está determinada por la presencia de distintos v-SNARE presentes en las vesículas (también conocidas como proteínas VAMP) y diferentes t-SNARE (sintaxinas) en las membranas blanco de la fusión. En el tercer estadio, los gránulos sufren una serie de reacciones que le permiten adquirir la competencia para fusionarse. Durante la cuarta y última etapa, la fusión de los gránulos con su membrana blanco forma una bicapa lipídica continua y promueve el desarrollo de un poro de fusión, en el caso de la membrana plasmática, que facilita la liberación del contenido al medio extracelular. La finalización de estos pasos no sólo incrementa el área total de la célula, sino que expone la cara interior de los gránulos al exterior de la célula <sup>47</sup>.

Una de las características comunes a varios desórdenes inflamatorios, como la injuria pulmonar aguda, las lesiones por isquemia y reperfusión, la artritis reumatoidea, el *shock* séptico y episodios severos de asma, es la degranulación excesiva de los neutrófilos <sup>47</sup>.

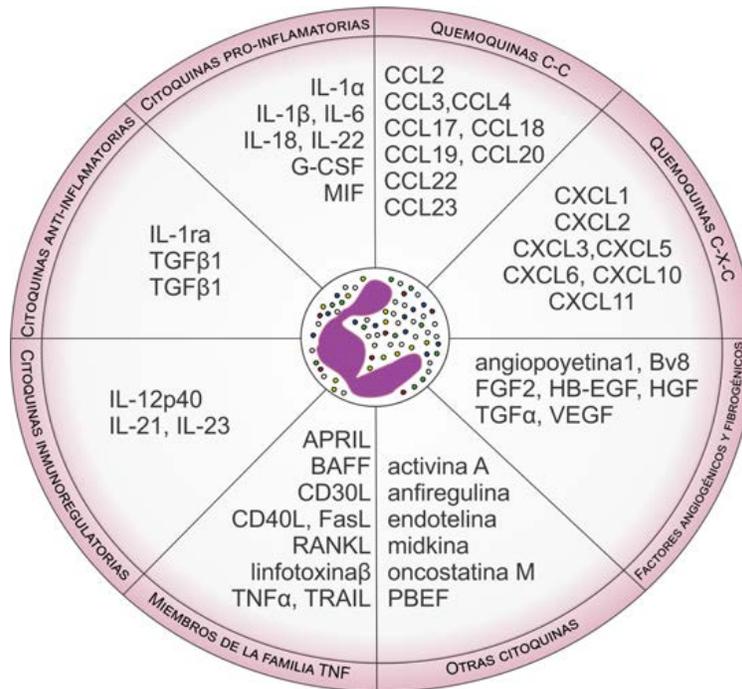
### **Secreción de citoquinas**

Las citoquinas representan un componente integral de las redes de señalización entre varios tipos celulares. Ellas constituyen una gran familia de pequeñas proteínas que son producidas por células inmunes y no inmunes, y actúan de manera autócrina, parácrina o exócrina ejerciendo efectos biológicos que conducen al desarrollo de respuestas inflamatorias, inmunes, de reparación de tejidos y angiogénesis <sup>48</sup>.

Por décadas, la contribución de los neutrófilos a las citoquinas producidas en el transcurso de una respuesta inmune no fue considerada relevante en virtud de que el dogma planteaba que son células terminalmente diferenciadas con baja capacidad sintética. Sin embargo, los hallazgos de las últimas dos décadas, realizados gracias al avance de las técnicas de detección y cuantificación, mostraron que los neutrófilos activados pueden sintetizar citoquinas *de novo*, y esta capacidad se ha tornado ampliamente aceptada <sup>49</sup>.

Se ha demostrado que los neutrófilos humanos, bajo una estimulación apropiada, expresan y producen, ya sea *in vitro* o *in vivo*, numerosas citoquinas pro y antiinflamatorias. Entre ellas TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1ra), IL-6, quemoquinas como CXCL1,

CXCL8, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, CCL23, factores angiogénicos y estimuladores de colonias como G-CSF y VEGF, y factores de crecimiento (HB-EGF) (ver **Figura 1**). Estos hallazgos evidencian que los neutrófilos están involucrados en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos, como angiogénesis, cicatrización de heridas, enfermedades autoinmunes y neoplásicas, además de estar implicados en las enfermedades inflamatorias clásicas <sup>49</sup>.



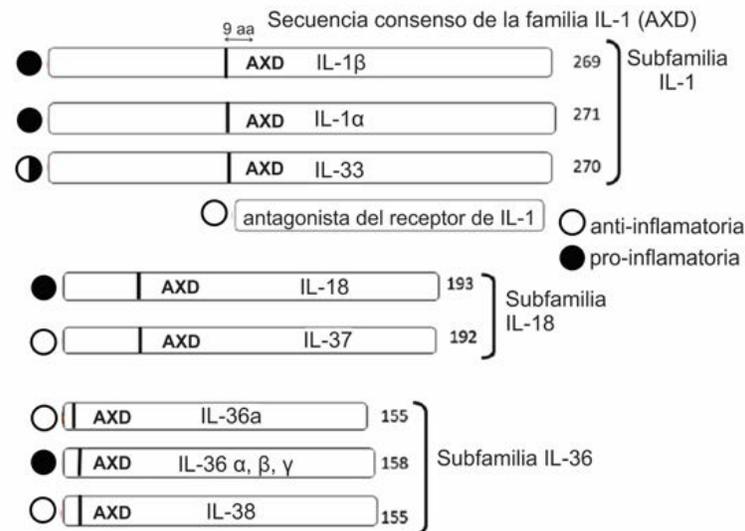
**Figura 1.** La imagen muestra las citoquinas que son expresadas y producidas por los neutrófilos humanos. *Imagen tomada y modificada de* <sup>49</sup>.

En muchos casos, las concentraciones de citoquinas producidas por neutrófilos de manera individual resultan reducidas en comparación con las secretadas por monocitos y macrófagos. Sin embargo, esto no descarta su relevancia en el contexto de la respuesta inmune, dado que los neutrófilos usualmente superan a los leucocitos mononucleares por 1 o 2 órdenes de magnitud en los procesos infecciosos o inflamatorios agudos. Este aspecto, en conjunto con su activa producción y liberación desde la médula ósea, permite suponer que las citoquinas producidas por neutrófilos podrían condicionar la evolución y el éxito de las etapas subsiguientes de la respuesta antiinfecciosa, dependiendo del perfil de citoquinas secretadas <sup>49</sup>.

## Familia de la Interleuquina 1

La IL-1 pertenece a una familia de 11 citoquinas que incluye proteínas pro y antiinflamatorias. A éstas se las conoce como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra (antagonista del receptor de la IL-1), IL-18, IL-33, IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$ , IL-36 $\gamma$ , IL-36Ra, IL-37, e IL-38.

La familia de citoquinas de la IL-1 y sus receptores afectan en gran medida al amplio espectro de respuestas inmunológicas e inflamatorias. Todos los miembros de la familia se dividen en 3 subfamilias (IL-1; IL-18 e IL-36) basados en una secuencia consenso y el principal receptor sobre el que actúan. Con la excepción de IL-1ra, las 10 citoquinas restantes carecen de péptido señal y no son secretadas de manera directa por la vía clásica de retículo endoplasmático (RE) – aparato de Golgi. Las mismas se encuentran en una distribución difusa en el citoplasma como precursores y cada una contiene una secuencia consenso de tres aminoácidos conservados A – X – D, donde A es un aminoácido alifático, seguido de cualquier aminoácido (X), y luego un aspártico (D). Se conoce que si las mismas son clivadas 9 aminoácidos río arriba de esta secuencia consenso, la proteína puede plegarse de manera óptima en forma de barril y puede unirse a su receptor<sup>50</sup> (**Figura 2**).



**Figura 2** La figura detalla las tres subfamilias de la familia de la IL-1. El número de aminoácidos que conforma cada molécula se indica al final del precursor de la citoquina. Además, se señala la secuencia consenso AXD para cada citoquina, y el sitio de clivaje 9 aminoácidos río arriba de la misma con una barra vertical. Este sitio constituye la localización óptima del N-terminal. El círculo lleno representa las citoquinas proinflamatorias y el vacío las antiinflamatorias. Como la IL-1Ra tiene péptido señal y es secretada directamente, no posee secuencia consenso. *Imagen tomada y modificada de*<sup>50</sup>.

Las citoquinas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se unen a un receptor conservado, el IL-1R1, que tiene un dominio intracelular conocido como TIR, que deviene del término en inglés “*Toll/IL-1 receptor*”

(TIR), porque es altamente homólogo al que portan los TLR. Estos receptores señalizan vía la proteína citoplasmática de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88, por sus siglas en inglés) y la quinasa 4 asociada al receptor de IL-1 (IRAK4, por sus siglas en inglés), que termina en última instancia con la activación de factores de transcripción como el factor NF- $\kappa$ B, o las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés) <sup>51</sup>.

De este modo, tanto estas dos citoquinas como una amplia variedad de productos microbianos, desencadenan manifestaciones inflamatorias similares, producto de su capacidad de inducir a la ciclooxygenasa de tipo 2, múltiples citoquinas y quemoquinas, de incrementar la expresión de moléculas de adhesión y la síntesis de óxido nítrico <sup>50</sup>.

Los efectos de la IL-1 $\beta$  son limitados cuando ésta se une al receptor de IL-1 tipo 2 (IL-1R2). Este receptor carece del dominio TIR y no puede asociarse a MyD88. Consecuentemente no tiene capacidad de señalizar al interior de la célula. El IL-1R2 funciona como un receptor señuelo, ya que une a la IL-1 $\beta$  con mayor afinidad que el IL-1R1, secuestrándola e impidiéndole ejercer sus efectos biológicos <sup>52</sup>. Otra forma de limitar los efectos de la IL-1 $\beta$  es ejercida por el IL-1Ra, el cual se une fuertemente al IL-1R1 e impide la unión de la IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

## **IL-1 $\beta$**

La IL-1 $\beta$  es una citoquina que afecta virtualmente a todas las células y órganos y cumple un papel protagónico en la respuesta inmune, ejerciendo efectos pleiotrópicos tanto en el sistema inmune innato como adaptativo. Si bien la IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  tienen actividades similares, difieren en varios sentidos. En primer lugar, la IL-1 $\beta$  es secretada y circula sistémicamente y sólo la forma procesada es activa. La IL-1 $\alpha$ , por el contrario, generalmente está asociada en su forma precursora a la membrana plasmática de la célula productora, y media una acción local, aunque también ejerce funciones en el núcleo celular actuando como un factor de transcripción. Además, la IL-1 $\beta$  es producida por un número limitado de tipos celulares (monocitos, macrófagos, neutrófilos), mientras que la expresión de IL-1 $\alpha$  está más extendida (es altamente expresada en queratinocitos y células endoteliales). La IL-1 $\beta$  suele ser producida en respuesta a la estimulación de TLR, componentes activados del complemento, otras citoquinas como TNF- $\alpha$  o la propia IL-1 $\beta$ , entre otros <sup>50,53</sup>.

### ***Actividad biológica y rol en la inflamación***

La IL-1 $\beta$  fue originalmente identificada como un importante factor hematopoyético que inducía la expresión de factores estimuladores en células progenitoras, leucocitos y células

estromales, lo que acuerda con su capacidad de mediar la recuperación del compartimento mielóide cuando es administrada a ratones irradiados<sup>54,55</sup>.

La IL-1 $\beta$  es un pirógeno endógeno clásico, ya que actúa sobre el sistema nervioso central induciendo fiebre, la cual incrementa la migración leucocitaria<sup>53</sup>. Además, activa el eje hipotálamo-pituitario-adrenal, promoviendo la secreción de cortisol, el cual ejerce acciones regulatorias sobre la respuesta innata y adaptativa. La IL-1 $\beta$  también promueve la respuesta de fase aguda, amplificando de este modo la resistencia innata a infecciones a través de la producción de proteína C reactiva y lectina de unión manosa y componentes del complemento, y regulando el daño a los tejidos mediante la producción de  $\alpha$ 1-antitripsina. Además, la IL-1 $\beta$  promueve la expresión de moléculas de adhesión, tanto en células inmunes como endoteliales, así como la secreción de quemoquinas que posibilitan la infiltración de leucocitos a los sitios de infección<sup>56-58</sup>.

La IL-1 $\beta$  es capaz también de estimular a la ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2), a la fosfolipasa A de tipo 2 y a la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS). Por esta razón, tanto las células expuestas como animales tratados con IL-1 $\beta$  producen una gran cantidad de prostaglandina-E2, factor activador plaquetario y óxido nítrico<sup>59</sup>.

Se demostró que la IL-1 $\beta$  también participa en la diferenciación de las células B a células plasmáticas<sup>60</sup> y que ejerce efectos moduladores sobre linfocitos inmunes innatos y células T $\gamma\delta$ , siendo además clave en la diferenciación de los linfocitos T CD4 al perfil TH17 y en la inducción de respuestas CD8 antivirales<sup>61</sup>.

Sus múltiples actividades explican por qué esta citoquina resulta clave en la resolución de numerosos procesos infecciosos.

### **IL-1 $\beta$ en el contexto de las enfermedades autoinflamatorias**

Además de su papel esencial en la eliminación de infecciones, la IL-1 $\beta$  también participa y contribuye a la severidad de un número de enfermedades inflamatorias. Algunas de estas patologías incluyen a las enfermedades autoinflamatorias sistémicas, que son síndromes que presentan manifestaciones clínicas comunes: fiebre, neutrofilia, proteínas hepáticas de fase aguda elevadas con dolor en articulaciones, mialgias y fatiga, que remedan los síntomas observados en humanos luego de la administración intravenosa de IL-1 $\beta$ . Entre ellos se encuentra la Fiebre Mediterránea Familiar ocasionada por mutaciones en un gen que codifica a la proteína pirina (capaz de formar inflamomas), o los síndromes autoinflamatorios asociados a criopirina (CAP) como el síndrome autoinflamatorio familiar inducido por el frío, el síndrome de Muckle-Wells, y la enfermedad inflamatoria multisistémica de inicio neonatal (NOMID, por sus siglas en inglés; también conocida como CINCA – de *chronic infantile neurological cutaneous*

*and articular syndrome* en Europa). Los CAP son causados por mutaciones en el gen NLRP3<sup>53</sup>. Una de las características más consistentes de estas enfermedades autoinflamatorias es la rápida y sostenida resolución de la severidad de los síntomas al bloquear las acciones de la IL-1 $\beta$ <sup>62</sup>.

Por otra parte, una señalización de IL-1 $\beta$  exacerbada también demostró ser causa de muerte neuronal. Además, la IL-1 $\beta$  fue encontrada en mayores cantidades en pacientes que sufren de epilepsia, derrame cerebral, enfermedad de Alzheimer y otros desórdenes neuronales<sup>63</sup>.

### ***Síntesis de la IL-1 $\beta$***

Dada la gran cantidad de proceso fisiológicos y patológicos en los que participa la IL-1 $\beta$ , la misma se encuentra sometida a una regulación fina, tanto a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional, como a nivel de su secreción.

Casi todos los productos microbianos inducen la síntesis de IL-1 $\beta$  vía la señalización de los TLR, y se ha visto que se autoinduce en monocitos tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>64</sup>. A diferencia de la mayoría de las citoquinas, las regiones regulatorias de la IL-1 $\beta$  se distribuyen a lo largo de varios miles de pares de bases río arriba del inicio de la transcripción. Además, poseen sitios de unión a NF- $\kappa$ B, proteína activadora 1 y elementos de respuesta a adenosina monofosfato cíclico (AMPC).

Como fue mencionado anteriormente, la IL-1 $\beta$  es sintetizada como un precursor inactivo, la pro-IL-1 $\beta$  de 31 kDa, que requiere procesamiento proteolítico para la adquisición de un estado activo. A los estímulos que conducen a la síntesis de la pro-IL-1 $\beta$  (y en algunas células como los macrófagos, también a la síntesis de los receptores tipo NOD como NLRP3), se los conoce como la primera señal de activación; y al proceso, como primado de las células, ya que este primer estímulo no es suficiente para que la IL-1 $\beta$  sea una citoquina funcional<sup>65</sup>. Para ello es necesario un segundo paso: el procesamiento proteolítico de la proforma.

### ***Procesamiento de la IL-1 $\beta$***

#### **Procesamiento de la IL-1 $\beta$ dependiente de la caspasa-1**

La caspasa-1 fue la primera enzima identificada capaz de clivar a la pro-IL-1 $\beta$  para su transformación en IL-1 $\beta$  madura y funcional<sup>66-68</sup>. Esta enzima pertenece a la familia de las cisteín proteasas, que cortan a las proteínas blanco luego de un residuo de aspártico. Al igual que la pro-IL-1 $\beta$ , la caspasa-1 se encuentra presente en las células como un precursor inactivo, la pro-caspasa-1. Su activación tiene lugar dentro de complejos intracelulares con múltiples

subunidades denominados inflamasomas, los cuales forman un andamiaje para el reclutamiento y activación autocatalítica de la pro-caspasa-1<sup>69</sup>. Una vez activa, la caspasa-1 corta a la pro-IL-1 $\beta$  nueve aminoácidos río arriba de su secuencia consenso (Leu-Arg-Asp) creando el sitio N-terminal óptimo para la actividad biológica de la IL-1 $\beta$ .

La formación de los inflamasomas tiene lugar como consecuencia de la activación de receptores citoplasmáticos pertenecientes a la familia de los NLR, como el NLRP1, NLRP3 y NLRC4 y otros tipos de receptores como AIM2, en respuesta a estímulos específicos (PMAP, o PMAD). Dentro de ellos, el inflamasoma mejor estudiado es el compuesto por NLRP3, por su relevancia fisiopatológica tanto en infecciones como en inflamación estéril<sup>70</sup>.

Como ya se mencionó, los NLR poseen un dominio central de unión a nucleótidos/oligomerización (el NOD), un dominio C-terminal rico en repeticiones de leucina (RRL) y una porción N-terminal que en la mayoría de los NLR comprende dominios que sirven como anclas para otras proteínas, como los dominios CARD o los dominios PYD. Las RRL mediarían el reconocimiento de una señal específica de activación, que conduciría a un cambio conformacional que expondría a los dominios NOD y llevaría a la oligomerización de los receptores. Se cree que las RRL 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 pro-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), o lo hace a través de la proteína adaptadora ASC (del inglés, *Apoptosis-associated Speck-like protein containing CARD*), que posee dominios PYD y CARD (como ocurre con NALP3). La presencia de estos dos dominios en ASC le permiten formar estructuras filamentosas con los dominios PYD hacia el interior y los dominios CARD hacia la parte externa de dichos filamentos. Estos dominios CARD unen luego a los dominios CARD de la procaspasa-1, llevando a su polimerización en filamentos discretos, dónde estas moléculas se encuentran lo suficientemente cerca para inducir su activación autocatalítica. De este modo, se conforma un inflamasoma dónde la pro-IL-1 $\beta$  es clivada generándose su forma activa<sup>65,71</sup>. (Ver <https://www.youtube.com/watch?v=-FNFZ9F1eB4>)

El inflamasoma de NLRP3 se ensambla en respuesta a un diverso conjunto de estímulos, que incluyen productos bacterianos, virales, fúngicos y de protozoos. También se activa frente a la adenosina trifosfato (ATP) y material particulado, como los cristales de ácido úrico, proteína amiloide A sérica, sílica, asbestos y aluminio y a toxinas formadoras de poros. La diversidad de inductores es una característica única de los inflamasomas NLRP3. Es por ello que se postula como improbable que el NLRP3 interactúe con sus activadores, y en lugar de ello se cree que éste sensa alguna señal común que fue gatillada por aquellos<sup>65,72</sup>. Estos inductores son

conocidos como la segunda señal para que la IL-1 $\beta$  pueda ser procesada y eventualmente secretada. Sin embargo, todavía se continúa debatiendo cuál es la señal intracelular que dispara el ensamblado del inflamasoma de NLRP3. Dentro de los mecanismos propuestos se incluyó la liberación de ADN mitocondrial oxidado, la producción de IRO, mitocondrias disfuncionales, desestabilización lisosomal, cambios en los niveles intracelulares de calcio, la formación de poros no específicos en la membrana y el eflujo de potasio<sup>65,73</sup>. No obstante, la disminución del potasio intracelular parece ser una consecuencia común a todos los activadores. Además, se demostró que un medio bajo en potasio es suficiente para gatillar su activación en un sistema libre de células<sup>74</sup>. Por ello, se sugirió que este sería el punto de convergencia de la cascada de activación que generan los activadores del NLRP3. Sin embargo, si este descenso es sentido directamente por el NLRP3 o existe otro evento que se correlaciona con éste, aún no fue dilucidado<sup>70</sup>.

### **Procesamiento de la IL-1 $\beta$ independiente de la caspasa-1**

A pesar del rol indiscutido de la caspasa-1 en el procesamiento de la IL-1 $\beta$ , estudios realizados en ratones *knock out* para esta enzima, demostraron cursos similares en infecciones donde la IL-1 $\beta$  juega un rol importante. Por ejemplo, en un modelo animal de inflamación inducida por turpentina, un estímulo estéril, se observó que los ratones deficientes en el gen de IL-1 $\beta$  se encuentran protegidos de la inflamación exacerbada, mientras que los ratones deficientes en caspasa-1 no lo están<sup>75,76</sup>. Tampoco los ratones deficientes en caspasa-1 se encuentran completamente protegidos contra la artritis y otras enfermedades inflamatorias dependientes de IL-1 $\beta$ . Sin embargo, los ratones caspasa-1<sup>-/-</sup> en modelos desafiados con LPS sí se encuentran protegidos<sup>77-79</sup>. Esto sugiere que existen mecanismos alternativos para el procesamiento de la pro-IL-1 $\beta$  independientes de la caspasa-1, aunque parecen no ser comunes a todas las patologías inflamatorias relacionadas con esta citoquina<sup>80</sup>.

En relación con estos mecanismos, estudios previos determinaron que las serinproteasas derivadas de neutrófilos como la PR3, la elastasa y la catepsina G pueden procesar a la pro-IL-1 $\beta$  en fragmentos de 21 KDa con actividad biológica, que son distintos al generado por la caspasa-1 de 17 KDa<sup>81-83</sup>. Además, se observó que las proteasas derivadas de mastocitos también son capaces de activar a la IL-1 $\beta$ . En este contexto, la quimasa puede convertir a la pro-IL-1 $\beta$  en IL-1 $\beta$  madura clivándola tres aminoácidos río arriba del sitio de clivaje de la caspasa-1<sup>84</sup>. Sin embargo, la actividad relativa de esta IL-1 $\beta$  respecto a la IL-1 $\beta$  derivada de la caspasa-1 no fue determinada<sup>85</sup>.

Si bien es posible bioquímicamente que estas proteasas sean potencialmente capaces de clivar a la proforma de la IL-1 $\beta$ , un interrogante que no fue aun claramente respondido, es cuál

es el contexto en el que estas proteasas procesan a la IL-1 $\beta$ . Las revisiones de la literatura suelen sostener que esto podría suceder en condiciones inflamatorias caracterizadas por la liberación de pro-IL-1 $\beta$  al medio extracelular, donde por ejemplo las proteasas neutrofílicas podrían procesarla. En sustento de esta posibilidad, se ha observado que macrófagos peritoneales tratados con LPS liberan pro-IL-1 $\beta$  en respuesta a estímulos que inducen necrosis o frente al estrés mecánico<sup>86</sup>, haciéndola accesible a proteasas extracelulares.

### ***IL-1 $\beta$ y neutrófilos***

La bibliografía disponible respecto de la producción de IL-1 $\beta$  por los neutrófilos humanos es escasa. La mayor parte de la literatura suele sostener que el aporte de los neutrófilos a la generación de esta citoquina se basa en la capacidad de los mismos de secretar las serinproteasas anteriormente mencionadas para procesarla extracelularmente. Sin embargo, los neutrófilos humanos expresan a la caspasa-1<sup>87-89</sup> y estímulos como el LPS y el GM-CSF incrementan su expresión<sup>89</sup>. Además, los neutrófilos expresan entre otros NLR, al NLPR3<sup>90</sup>.

En estudios previos de nuestro grupo de trabajo<sup>91</sup>, determinamos que en respuesta a LPS o LPS en combinación con ATP, los neutrófilos humanos generan IL-1 $\beta$  activa a través de un mecanismo dependiente de caspasa-1, y probablemente, también por medio de serinproteasas como la PR3 y/o elastasa. Estos estudios demostraron que de modo similar a lo que ocurre en monocitos humanos, pero a diferencia de lo que acontece en macrófagos murinos, la estimulación sólo con LPS (primera señal) es capaz de inducir la secreción, aunque con una menor extensión y con una cinética más lenta. Nosotros especulamos que de modo similar a lo que ocurre en monocitos, el ATP liberado por neutrófilos podría ser responsable de disparar autócrinamente la activación de caspasa-1 en respuesta al LPS.

Nuestros hallazgos también indicaron que existe una fracción de la pro-IL-1 $\beta$  que puede ser liberada al sobrenadante, sugiriendo que, dependiendo del balance de proteasas y sus inhibidores, la misma podría ser sustrato de las proteasas extracelulares, tal como se señaló anteriormente<sup>52</sup>.

Además, nuestras investigaciones indicaron que los IRO producidos por neutrófilos pueden jugar un rol dual en la secreción de IL-1 $\beta$ , siendo requeridos para la liberación de la forma madura luego de la inducción con LPS y ATP, pero regulando negativamente a la actividad de la caspasa-1. A su vez, demostramos que los IRO no son necesarios para la activación del inflamasoma<sup>91</sup>.

## **Impacto de la IL-1 $\beta$ producida por los neutrófilos en procesos infecciosos**

Como se ha mencionado anteriormente, si bien los monocitos o los macrófagos producen mayores cantidades de IL-1 $\beta$ , los neutrófilos pueden superarlos en número en uno o dos órdenes de magnitud en los focos infecciosos. Por lo tanto, la contribución de los neutrófilos a la producción de esta citoquina en el contexto de una infección podría no ser despreciable. En años recientes, diversos estudios han sustentado el rol de los neutrófilos como una fuente relevante de IL-1 $\beta$  en procesos infecciosos *in vivo*. Entre estos, en un modelo murino de infección cutánea por *Staphylococcus aureus*, se demostró que los neutrófilos constituyen la fuente más abundante de IL-1 $\beta$  durante la infección. Además, por medio de transferencia adoptiva de neutrófilos expresando IL-1 $\beta$  a ratones deficientes en esta citoquina, se reveló que en ausencia de IL-1 $\beta$  producida por cualquier tipo celular, la IL-1 $\beta$  neutrofílica fue suficiente para restaurar el impedido reclutamiento de neutrófilos, la formación de abscesos en ratones infectados deficientes en IL-1 $\beta$  y la resolución de la infección <sup>92</sup>.

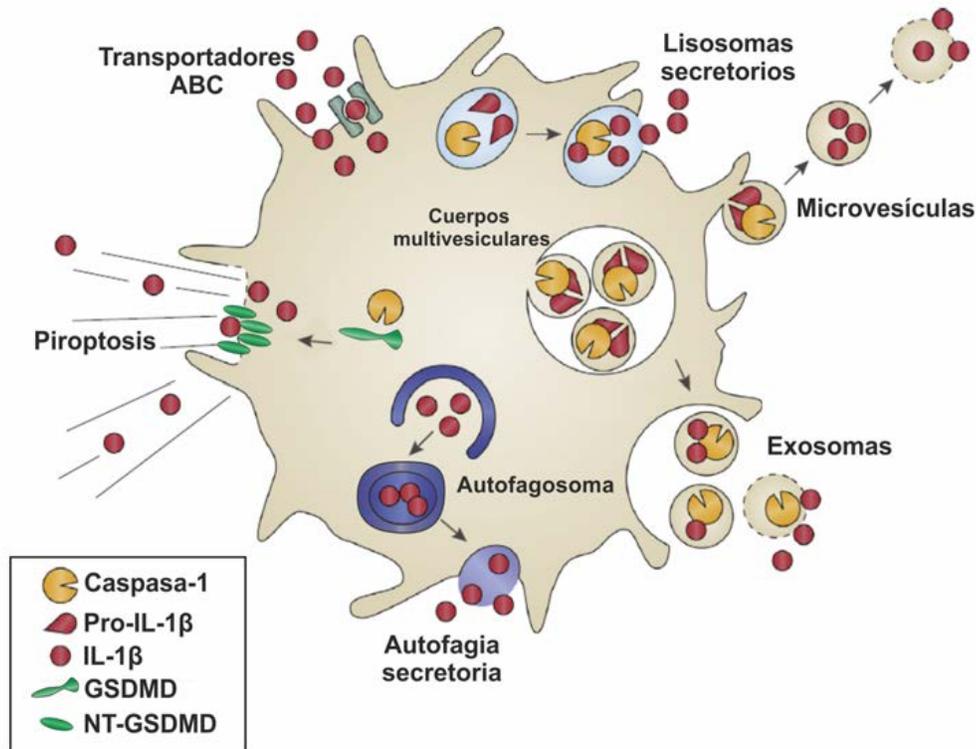
Otros estudios reportaron que la contribución de la IL-1 $\beta$  neutrofílica es de suma importancia en: enfermedades pulmonares <sup>93,94</sup>, frente a infecciones con *Pseudomonas aeruginosa* <sup>95,96</sup>; en infecciones en la córnea por *Streptococcus pneumoniae* <sup>97</sup> y otros estreptococos del grupo B <sup>98</sup>; en respuesta al desafío con Salmonela <sup>99</sup>; y en etapas tempranas de la infección por el virus sincicial respiratorio <sup>100</sup>.

### ***Mecanismos de secreción propuestos para la IL-1 $\beta$***

Las proteínas que van a ser secretadas, típicamente siguen la vía convencional de secreción que consiste básicamente en ser translocadas al RE, ya sea co o post-traduccionalmente, gracias a la presencia de una secuencia conocida como péptido señal en su extremo N-terminal. Luego de pasar por el RE, viajan al Golgi, donde son susceptible a otras modificaciones post-traduccionales, y luego son incorporadas a vesículas para su secreción. Este tráfico puede ser interrumpido farmacológicamente, por ejemplo, con compuestos como brefeldina A (BFA) <sup>101</sup> o monensina <sup>102</sup>, que inhiben la secreción y conducen a una acumulación intracelular de estas proteínas.

Como se ha mencionado, la IL-1 $\beta$  carece de este péptido señal. En 1990, Rubartelli y colaboradores determinaron que en monocitos activados con LPS, la BFA era capaz de inhibir la secreción de IL-6 y TNF $\alpha$ , pero por el contrario incrementaba la secreción de IL-1 $\beta$ . Esta fue la primera evidencia directa de que la IL-1 $\beta$  era secretada por una vía no convencional <sup>103</sup>. Aun cuando a lo largo de casi treinta años se han propuesto diferentes mecanismos para explicar la

forma en que la IL-1 $\beta$  es secretada, hasta el momento no existe un consenso sobre las características del mismo en la comunidad científica. La mayoría de los estudios se realizaron empleando monocitos, macrófagos y células dendríticas. Teniendo en cuenta la diversidad de mecanismos propuestos, se especula que podrían existir múltiples vías para conducir a la IL-1 $\beta$  al espacio extracelular. A continuación, se describirán los principales mecanismos de secreción propuestos, los cuales se esquematizan en la **Figura 3**.



**Figura 3.** Mecanismos propuestos para explicar la secreción no convencional de IL-1 $\beta$ . *Imagen tomada y modificada de* <sup>104</sup>.

### Secreción mediante exocitosis de lisosomas secretorios

Los lisosomas secretorios son lisosomas modificados que poseen características clásicas tanto de los endolisosomas como de los gránulos secretorios de las células especializadas. Los mismos son movilizados hacia la membrana plasmática cuando la célula encuentra un estímulo que eleva los niveles de calcio intracelulares. Los estudios del grupo de Rubartelli determinaron que una porción de la pro-IL-1 $\beta$  y de la caspasa-1 se encontraban presentes en vesículas positivas para catepsina D y LAMP-1, por lo tanto, les adjudicaron un origen endolisosomal <sup>105,106</sup>. Por otro lado, la pro-IL-1 $\beta$  era encontrada en el interior de la célula y la forma madura en el espacio extracelular, lo que los llevó a sugerir que el clivaje ocurría dentro de las vesículas, pero

inmediatamente antes de la secreción<sup>107</sup>. Sin embargo, estos estudios no lograron explicar cómo la pro-IL-1 $\beta$  y la casapasa-1 accedían a esos lisosomas.

### **Secreción mediante liberación de vesículas extracelulares (VE): microvesículas (MV) y exosomas (Ex)**

Las vesículas extracelulares (VE) son consideradas hoy en día un mecanismo adicional de comunicación intercelular que le permite a las células intercambiar proteínas, lípidos y material genético. Si bien en general son nombradas de esta manera, constituyen de hecho un grupo heterogéneo. Las VE pueden clasificarse en dos grandes categorías según su tamaño y origen: microvesículas (MV) y exosomas (Ex)<sup>108</sup>.

Las MV en general poseen 50 nm a 1000 nm de diámetro y son generadas por gemación y posterior fisión de la membrana plasmática, con la consecuente liberación de las vesículas al espacio extracelular<sup>109</sup>.

Los Ex, por el contrario, oscilan entre 30 y 100 nm de diámetro y son vesículas intraluminales formados por invaginación de la membrana endosomal durante la maduración de CMV. Éstos son intermediarios del sistema endosomal, que al fusionarse con la membrana plasmática, median la liberación de las vesículas (Ex) contenidas en ellos<sup>110</sup>.

Tanto las MV como los Ex pueden fusionarse con otras células transfiriendo contenido citosólico a las mismas, o lisarse y liberarlo en solución. Su composición puede ser altamente variada, incluyendo inflamomas<sup>111</sup> y otros complejos multimoleculares.

La liberación IL-1 $\beta$  en MV fue observada en células THP-1 (línea monocítica), células de la microglía, astrocitos, células dendríticas tratadas con LPS y agonistas del receptor P<sub>2</sub>X<sub>7</sub>, y en plaquetas activadas con trombina. Resulta interesante señalar que las MV de células dendríticas poseen en su membrana el receptor P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> y la estimulación con ATP (su ligando) induce la liberación de su contenido. Además se observó que IL-1 $\beta$  contenida dentro de estas MV tiene actividad biológica<sup>112</sup>.

Por su parte, la liberación en Ex fue propuesta por el grupo de Dubyak y colaboradores, basándose en la cosecreción de la IL-1 $\beta$  con el CMH II luego de la estimulación de macrófagos murinos con ATP extracelular<sup>111</sup>.

### **Secreción mediante transportadores ABC**

Otros estudios determinaron que la inhibición farmacológica de los transportadores ABC, así como la regulación negativa con oligonucleótidos antisentido del transportador ABCA1 inhibe la liberación de IL-1 $\beta$  en macrófagos y células de Schwann, sugiriendo que cumplen un

papel en el proceso de secreción. Sin embargo, aún se desconoce si cumplen un rol directo en la secreción o participan de un paso intermedio <sup>113</sup>.

### **Secreción por inducción de piroptosis**

La piroptosis es un tipo de muerte celular que se da típicamente en células inflamatorias, y es acompañada por disrupción de la membrana plasmática, hecho que permite la externalización de IL-1 $\beta$  y componentes citoplasmáticos. Este proceso de muerte es organizado, pero proinflamatorio, lo que lo diferencia de la apoptosis. Sin embargo, ambas formas de muerte dependen de la activación de caspasas, un requerimiento que las diferencia de la necrosis. Morfológicamente la piroptosis está caracterizada por la hinchazón de la célula, y su posterior estallido. Éste es un resultado directo del clivaje de la proteína Gasdermina D (GSDMD) por caspasa 11 (ratón) y caspasa-1, -4 y -5 en humanos. Las caspasas-1 y 11 la escinden en dos fragmentos (N-terminal y C-terminal) después de un residuo aspártico en la posición 276 en humanos. El fragmento N-terminal de GSDMD (NT-GSDMD) se une a fosfatidilinositoles fosfatos y a fosfatidilserina, moléculas presentes en la cara interna de la membrana plasmática, y luego se polimeriza, formando los poros por donde la IL-1 $\beta$  sería liberada <sup>114</sup>.

### **Secreción por autofagia secretoria**

En años recientes, algunos estudios determinaron que ligandos de los TLR promueven el secuestro de la IL-1 $\beta$  en autofagosomas y propusieron a la autofagia como un nuevo mecanismo de secreción <sup>115</sup>. Se tratará este tema más adelante.

La gran variedad de mecanismos de secreción propuestos permite especular que podrían existir diferencias en las vías de secreción en distintos tipos celulares. Sin embargo, estudios realizados por diferentes grupos de investigación en un mismo tipo celular, arrojaron como resultado que el mismo agonista inducía la secreción de la IL-1 $\beta$  por distintos mecanismos. Por lo tanto, no es posible descartar que dichas diferencias se deban a que esta citoquina pueda ser liberada por dos o más vías.

Al momento de iniciar los estudios de nuestro grupo, no existían trabajos que hubiesen investigado los mecanismos de secreción de IL-1 $\beta$  en neutrófilos. El hecho de que tanto el LPS como los IRO inducen autofagia en los neutrófilos, y que según nuestros estudios previos los IRO son necesarios para la exportación de la IL-1 $\beta$  inducida por LPS y ATP <sup>91</sup>, nos condujo a plantear la posibilidad de que la autofagia estuviese involucrada en la secreción de la IL-1 $\beta$  en neutrófilos. Por tal motivo, a continuación, se describirán las características de este proceso y los distintos mecanismos descritos hasta el presente.

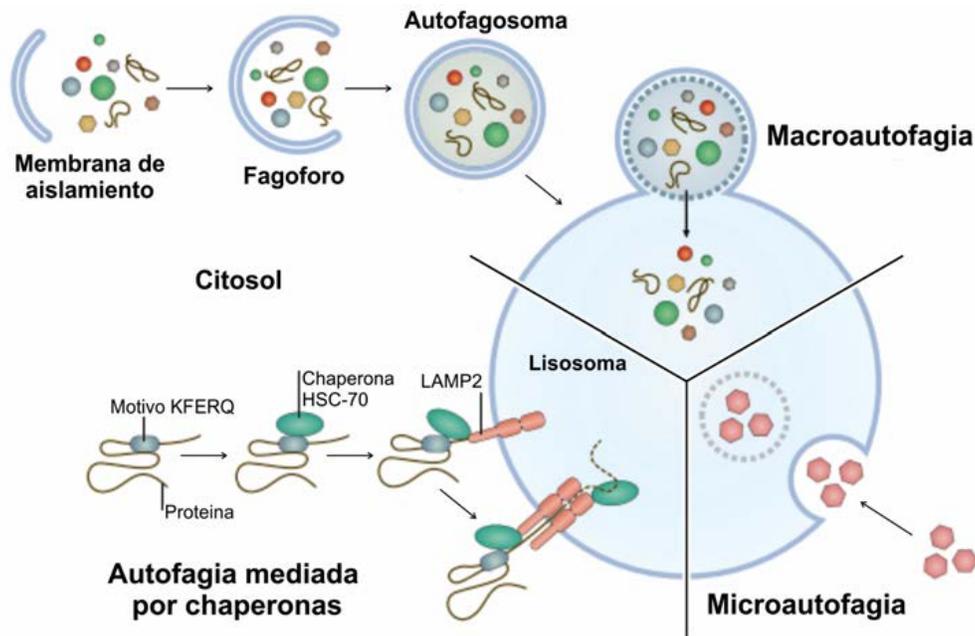
## **Autofagia**

La autofagia es un proceso intracelular ubicuo que afecta a todos los tipos celulares de los eucariotas, incluyendo a los mamíferos. Es un proceso conservado a lo largo de la evolución que, en la definición genérica, media la degradación de péptidos y proteínas, permitiendo a las células sobrevivir a una infinidad de condiciones de estrés. Por lo tanto, la autofagia mantiene la homeostasis celular, permitiendo a las células sobrellevar situaciones críticas. Sin embargo, este proceso funciona también en condiciones homeostáticas de la célula, regulando el recambio de proteínas y organelas citoplasmáticas <sup>116</sup>.

Si bien el mecanismo de autofagia degradativa es el más ampliamente estudiado y conocido, en años recientes se ha obtenido evidencia de que la autofagia puede estar también involucrada en la secreción no convencional de proteínas que carecen de péptido líder, en un proceso conocido como autofagia secretoria <sup>117</sup>.

### ***Mecanismos de autofagia degradativa***

Si bien se utiliza el término autofagia como un concepto genérico por el que materiales citoplasmáticos son llevados a los lisosomas, en células animales, o a las vacuolas, en plantas y levaduras, actualmente se puede encontrar en la literatura un consenso en dividir a la autofagia degradativa en tres grandes mecanismos: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (AMC) <sup>118</sup> (ver **Figura 4**).



**Figura 4.** Mecanismos descritos para la autofagia degradativa. La macroautofagia, con la formación del autofagosoma y su posterior fusión con lisosomas; la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas, dependiente de la chaperona HSC-70 y LAMP2. Imagen tomada y modificada de <https://www.novusbio.com/research-areas/autophagy>.

## Macroautofagia

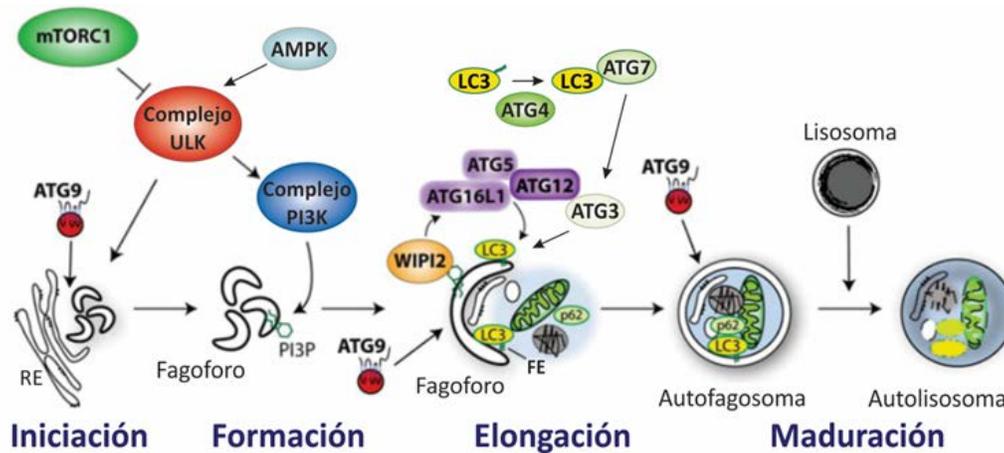
La macroautofagia es el mecanismo más estudiado y es conocido por su rol en el metabolismo catabólico del control de calidad y recambio de proteínas. Funciona como un mecanismo citoprotectivo, gatillado por diferentes estímulos entre los que se incluyen la privación de nutrientes (o ayuno), el estrés oxidativo, la hipoxia, agregados proteicos y moléculas tóxicas. Constitutivamente opera en niveles bajos, pero puede ser inducida frente a las condiciones mencionadas <sup>119</sup>.

La macroautofagia comienza con la formación de una membrana de aislamiento y de un fagoforo, es decir, una estructura de membrana que se elonga para encerrar componentes citoplasmáticos. La formación del fagoforo está regulada por la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K, por sus siglas en inglés) de clase III <sup>120</sup>. Esta enzima forma fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P, por sus siglas en inglés), a partir de fosfatidilinositol, y permite el reclutamiento de factores específicos. Estos son conocidos como proteínas relacionadas a la autofagia (ATG, por *AuTophagy-related proteins* en inglés) y son los responsables de la ejecución de este proceso y de la formación de organelas con doble membrana especializadas denominadas autofagosomas <sup>117</sup>. El origen de la membrana que va a formar al fagoforo es discutido, pero se han implicado como fuentes tanto al RE, como a la membrana plasmática, al aparato de Golgi y a la mitocondria <sup>119</sup>.

El proceso se inicia cuando una serie de proteínas ATG se ensamblan formando complejos funcionales que son activados y reclutados a las membranas que darán origen al fagóforo. Estos comprenden al complejo ULK que incluye a ULK1, ULK2, ATG13, RBCC1/FIP200 y ATG101; el complejo I de la PI3K clase III formado por PIK3C3/VPS34, PIK3R4/p150, BECN1/Beclin 1 y ATG14; las proteínas WIPI y dos complejos de conjugación tipo ubiquitina, uno que conjuga ATG12 a ATG5 en asociación con ATG16L1 (ATG7 y ATG10) y otro que dirige la lipidación de los miembros de la familia de ATG8 (ATG7, ATG3), la cual incluye seis miembros, entre los cuales se encuentran las proteínas de cadena liviana 3 asociadas a microtúbulos (LC3, por sus siglas en inglés) A, B y C<sup>121</sup> (**Figura 5**).

Precisamente, un paso clave en la formación del autofagosoma es la lipidación de LC3 (también conocida como ATG8). Esta proteína es sintetizada como pro-LC3 y clivada en el extremo C-terminal por la cisteína proteasa ATG4, formando LC3-I. Cuando se inicia el proceso autofágico, la LC3-I es activada por la ATG7, y conjugada covalentemente por la ATG3 a fosfatidiletanolamina (FE) de ambas membranas del fagoforo para formar LC3-II<sup>122</sup>. El fagóforo luego se elonga hasta rodear por completo la carga que va a ser incorporada, y posteriormente fusiona sus extremos dando origen al autofagosoma. Por las razones expuestas, la presencia de vesículas con LC3 en el interior de la célula es considerada como un parámetro de la inducción de autofagia.

Una vez formado, el autofagosoma se fusiona con el lisosoma originando un autolisosoma<sup>123</sup>. La conexión de los autofagosomas con los microtúbulos facilita su transporte hacia los lisosomas<sup>119,124</sup>. Cuando llega a destino, la membrana externa del autofagosoma se fusiona con la del lisosoma. La exposición a las proteasas residentes del lumen ácido del lisosoma provoca la degradación de la membrana interna del autofagosoma, y consecuentemente, la degradación de la carga autofagosomal (**Figura 5**). Los fragmentos que han sido degradados son exportados al citoplasma por medio de permeasas lisosomales para su utilización en procesos biosintéticos o la generación de energía<sup>125</sup>. En mamíferos es común que la macroautofagia converja con la vía endocítica. Si esto ocurre antes de la fusión con lisosomas, los autofagosomas pueden intersectar a los endosomas tempranos o tardíos para formar anfisomas, que luego se fusionarán con los lisosomas para formar los autolisosomas<sup>126,127</sup>.

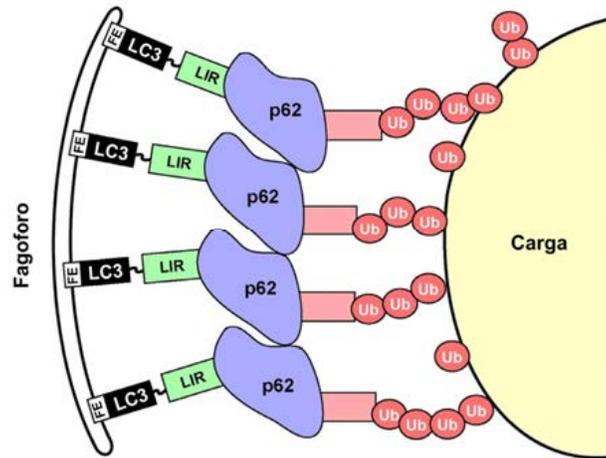


**Figura 5.** Esquema del modelo propuesto para la vía de macroautofagia en mamíferos. Se muestran las proteínas clave que median la iniciación, y la formación del fagoforo, así como la elongación y cierre del autofagosomas. (RE) retículo endoplasmático, (PI3P) fosfatidilinositol-3-fosfato, (FE) fosfatidiletanolamina. *Imagen tomada y modificada de* <sup>128</sup>.

La macroautofagia no específica puede ser inducida en respuesta a la privación de nutrientes o energía para permitir la supervivencia de la célula. Sin embargo, este proceso puede ser también altamente selectivo, para el mantenimiento de la célula y su homeostasis <sup>129,130</sup>. Algunas de las cargas conocidas son los peroxisomas, mitocondrias y proteínas ubiquitinadas <sup>131-133</sup>.

En la macroautofagia selectiva, se producen interacciones fuertes entre la carga seleccionada y el fagoforo en elongación. Este contacto se produce mediante el LC3-II ubicado en la membrana interna del fagoforo y proteínas de la familia de receptores tipo-secuestosoma-1 (receptores de autofagia), entre las cuales se encuentra p62/SQSTM1 (*sequestosome-1*), NBR1 y NDP52, entre otros. Los miembros de esta familia poseen una región de interacción con LC3 denominada LIR (por sus siglas en inglés).

La molécula LC3 recluta proteínas que poseen LIR en ambas caras del fagoforo. Aquellas que son reclutadas por la cara externa incluyen proteínas que están involucradas en la formación del autofagosoma, el transporte o la fusión de los mismos, mientras que las reclutadas en la cara interna incluyen receptores y sus cargas, y lo hacen en el centro del fagoforo, lo que facilita la curvatura de la membrana. De este modo, LC3 recluta a p62, que a su vez es capaz de unir a través del dominio C-terminal a los sustratos de autofagia. Muchos de estos sustratos están ubiquitinados <sup>134</sup>. Por ello, la intervención de p62 en la macroautofagia selectiva es estimulada por fosforilación y ubiquitinación, incrementando la interacción y la co-agregación con sustratos ubiquitinados <sup>135</sup> (**Figura 6**).



**Figura 6.** Interacciones necesarias para la unión de la carga, al fagoforo en formación, en la macroautofagia selectiva. La porción C-terminal (en rosa) de p62 interactúa con cadenas de ubiquitina asociadas a la carga. La región de interacción con LC3 (LIR) interactúa con LC3, que se encuentra anclada a la membrana del fagoforo por fosfatidiletanolamina (FE). Imagen tomada y modificada de <sup>135</sup>.

Los receptores tipo sequestrósoma-1 están involucrados en la autofagia de componentes celulares muy diversos, como proteínas mal plegadas, organelas dañadas, bacterias, cápsides virales y varias proteínas de señales y complejos.

## Microautofagia

La microautofagia refiere a un proceso por el cual el contenido citoplasmático entra al lisosoma por invaginación o deformación de la membrana lisosomal <sup>136</sup>. La mayoría de los estudios respecto a la microautofagia fueron hechos en levaduras, y el estudio de este proceso en mamíferos fue más lento, ya que no se ha podido detectar la invaginación en los lisosomas secundarios y la correspondencia funcional de los genes participantes en levaduras. Estudios recientes demostraron que existe un proceso degradativo similar a la microautofagia de levaduras, pero que ocurre en los CMV en lugar de los lisosomas. Este proceso, denominado microautofagia endosomal (ME), contribuiría a la degradación en masa de proteínas presentes en el citosol. Sin embargo, también se observó que algunas proteínas pueden ser selectivamente degradadas por la ME luego de la unión a la proteína 8 de *shock* térmico de 70 KDa (HSC-70). Durante la ME, la HSC-70 se une directamente a fosfatidilserina en la membrana de los endosomas tardíos, a diferencia de lo que ocurre en la AMC <sup>137</sup> (Descrita a continuación). Las membranas de los endosomas tardíos contienen la maquinaria para la invaginación (los complejos de clasificación endosomal requeridos para la maquinaria de transporte, [ESCRT], por sus siglas en inglés), la formación de los CMV y la liberación del contenido al lumen lisosomal <sup>138</sup>.

Es importante remarcar que el proceso de ME es diferente a lo que ocurre con la carga de componentes a los CMV para la liberación de Ex. Si bien ambos comparten la maquinaria de las ESCRT, el destino final de las cargas es distinta. En la ME las proteínas citoplasmáticas cargadas en CMV van a ser sujeto de degradación en este compartimento o luego de una potencial fusión con lisosomas. A diferencia de esto, otros CMV contienen elementos que van a ser liberados al medio extracelular <sup>138</sup>.

### **Autofagia mediada por chaperonas**

La AMC, a diferencia de la micro y macroautofagia, que pueden o no ser selectivas, es altamente específica. Todos los sustratos de la misma comparten el pentapéptido KFERQ en su secuencia <sup>139</sup>. Basado en análisis de inmunoprecipitación y de secuenciación se estima que el 40% de las proteínas citosólicas poseen este motivo <sup>138,140</sup>. Dichas proteínas son desdobladas por la acción de chaperonas citosólicas y translocadas directamente a través de la membrana lisosomal donde son luego degradadas en el lumen de esa organela. Las proteínas que van a ser susceptibles de degradación por este mecanismo, deben estar en solución y tener expuesto el motivo KFERQ que será reconocido por HSC-70. Esta es una forma de reconocer proteínas mal plegadas o que se desensamblan de sus complejos. Si bien muchos de estos sustratos se organizan en complejos proteicos en el citosol, sólo se vuelven disponibles para degradación por la AMC como subunidades simples. La inhabilidad de la AMC de degradar inclusiones proteicas explica por qué es un mecanismo tan exitoso para el control de calidad de proteínas que permanecen sin plegarse y en solución. Sin embargo, la AMC no puede remover proteínas severamente alteradas que no permanecen en solución <sup>141</sup>.

La AMC degrada un gran número de proteínas, incluyendo enzimas glucolíticas, factores de transcripción y sus inhibidores, proteínas que unen calcio y lípidos, subunidades del proteasoma y proteínas involucradas en el tráfico vesicular <sup>141</sup>. Durante la AMC el motivo KFERQ es reconocido por la proteína HSC-70 y por otras cochaperonas <sup>142</sup>. Una vez en la membrana lisosomal, el sustrato se une a monómeros del receptor de AMC que es la proteína LAMP2 <sup>143</sup>. La unión del sustrato con su receptor lleva a la multimerización de LAMP2, y cuando el ensamblado finaliza, el complejo es estabilizado por la chaperona de *shock* térmico de 90 KDa (HSP-90) desde el lado del lumen lisosomal. Luego de la translocación del sustrato, el complejo es desensamblado y LAMP2 vuelve a su estado monomérico donde luego puede volver a formar otro complejo para una nueva ronda de translocación <sup>144</sup>. La regulación de la translocación ocurre a nivel de la unión del sustrato con el LAMP2, que es el paso limitante de la AMC <sup>145</sup>. En general, cambios en los niveles de LAMP2 en la membrana lisosomal modulan la actividad de la

AMC, y estos no son producidos por la síntesis *de novo* de la proteína, sino por cambios en su degradación, y la dinámica y organización del mismo en la membrana lisosomal<sup>144-146</sup>.

### ***Mecanismo de autofagia secretoria***

Como se ha mencionado anteriormente, existen proteínas que carecen de la señal para ser secretadas por la vía convencional de RE-Golgi, y se valen de mecanismos no convencionales de secreción. Entre ellos se encuentra la autofagia secretoria. La misma se asocia específicamente con la vía de autofagia regida por las proteínas ATG, que controlan la biogénesis de las membranas de los autofagosomas. En contraste con la autofagia degradativa, con la cual comparte la maquinaria autofágica y parte de su mecanismo, la autofagia secretoria puede confluir en la secreción de componentes citoplasmáticos en lugar de su degradación. De ambas formas, la célula se libera de material citoplasmático capturado, pero con consecuencias y repercusiones biológicas diferentes<sup>147</sup>.

Al comienzo de los estudios realizados en este trabajo de tesis, el conocimiento de este mecanismo de secreción era muy limitado. Las investigaciones realizadas en estos años, nutrieron el conocimiento sobre el mismo.

Estudios en levadura sobre la secreción de la proteína de unión a Acetil CoA 1, que carece de péptido señal, indicaron que el proceso involucra la participación de los genes *ATG*<sup>148,149</sup> y de las proteínas de la vía de los CMV, como la ESCRT-I, el t-SNARE de superficie SSo1 y el Grh1, el gen de levaduras ortólogo al de las proteínas de reordenamiento y apilamiento del Golgi (*GRASP*, por sus siglas en inglés) de 65 KDa (*GRASP65*) y *GRASP55*<sup>148-151</sup>.

Los estudios sobre este mecanismo en mamíferos, se centraron fundamentalmente en la secreción de la IL-1 $\beta$ , comenzando por las investigaciones realizadas por Dupont y colaboradores en macrófagos murinos derivados de médula ósea (MMO)<sup>115</sup>. En dicho reporte, los autores determinaron que la citoquina era capturada desde el citoplasma y transportada hacia el medio extracelular a través de un mecanismo que involucra la participación de ATG5, de la proteína *GRASP55* y la proteína Rab8a1 (una GTPasa hasta entonces involucrada en el control del “sorting” polarizado post-Golgi y la exocitosis de proteínas). Los autores observaron que la autofagia basal inhibe la secreción de IL-1 $\beta$ , en acuerdo con los reportes previos, pero la autofagia inducida, en su caso por privación de nutrientes, aumenta la secreción estimulada por agonistas del inflammasoma. Su modelo propone que la autofagia permitiría translocar a la IL-1 $\beta$  citosólica al lumen de vacuolas autofágicas, seguida por exocitosis de las mismas.

Es importante señalar, que otros estudios alcanzaron resultados que contrastan con los de Dupont y colaboradores, respecto de las consecuencias de la autofagia en la secreción de esta

citoquina. Por un lado, se observó que la autofagia inhibe la activación del inflammasoma y la secreción de IL-1 $\beta$ , en MMO y células dendríticas <sup>152-154</sup>. En esta misma dirección, Harris y colaboradores determinaron que la estimulación de estas células con agonistas de TLR lleva a la captura de la pro-IL-1 $\beta$  en autofagosomas para su degradación por la vía autofágica. Ellos establecieron que el tratamiento con rapamicina, un activador de la autofagia, reduce el contenido de pro-IL-1 $\beta$  intracelular e inhibe la secreción de la IL-1 $\beta$  madura en células estimuladas con LPS y aluminio, quitosano o ATP; mientras que la inhibición de la autofagia aumentó la secreción de IL-1 $\beta$ , consistente con un rol de la autofagia como limitadora de la secreción de IL-1 $\beta$  <sup>152</sup>.

Los estudios anteriormente mencionados fueron realizados con macrófagos, o monocitos murinos o humanos. Sin embargo, existen diferencias marcadas entre estos tipos celulares y los neutrófilos en cuanto a la regulación de la activación del inflammasoma, la producción de IL-1 $\beta$  activa y su secreción <sup>91</sup>. Por este motivo, por la controversia planteada sobre el rol de la autofagia en la secreción de IL-1 $\beta$  y por el escaso conocimiento existente en los mecanismos de autofagia en neutrófilos, que, en este trabajo de tesis en continuidad con los estudios previos de nuestro grupo, estudiamos la participación de la autofagia en la secreción de IL-1 $\beta$  por neutrófilos humanos.

## Antecedentes del grupo

En estudios previos realizados por nuestro grupo, analizamos la cinética de secreción de la IL-1 $\beta$  por neutrófilos humanos en respuesta a la estimulación con LPS y ATP <sup>155</sup>. Nuestra intención fue determinar, en conjunto con resultados que obtuvimos previamente <sup>91</sup>, los tiempos apropiados para el estudio del mecanismo de exportación de la IL-1 $\beta$  por neutrófilos. Como se observa en el **Anexo Figuras 1 y 2**, la máxima secreción de la IL-1 $\beta$  en respuesta a LPS y ATP fue observada a 5 hs posestimulación (p.e.) con el LPS, siendo éste un tiempo apropiado para la evaluación de la IL-1 $\beta$  en el sobrenadante de cultivo de neutrófilos. Por otra parte, como se evidencia en el **Anexo figura 2**, bajos niveles de IL-1 $\beta$  fueron detectados en el sobrenadante entre las 3 y 4 hs p.e., resultando apropiados para la detección de la IL-1 $\beta$  a nivel intracelular. En ensayos adicionales, se determinó que tanto los inhibidores de la autofagia temprana, como la 3-metil adenina (3-MA) y Wortmanina (WN), como los bloqueantes del flujo autofágico, Bafilomicina A1 (Baf A1) y E64d, inhiben la secreción de IL-1 $\beta$  inducidas por LPS, y LPS y ATP, pero no de IL-8 (**Anexo Figura 3A, C, D, F, G, I, J**). A su vez, la viabilidad de estas células no fue afectada por los tratamientos (**Anexo Figura 3B, E, H**). También se observó que la inhibición de la expresión de ATG5 en la línea celular PLB-985, previamente diferenciada a un perfil

neutrófilo, inhibe la secreción de IL-1 $\beta$  (**Anexo Figura 3M, N**). Por otra parte, la estimulación de la autofagia por privación de nutrientes promovió la secreción de esta citoquina, sin afectar la secreción de IL-8 o la viabilidad de los neutrófilos (**Anexo Figura 4**).

Estos hallazgos sugirieron que la autofagia se encuentra involucrada en el mecanismo que conduce a la secreción de IL-1 $\beta$  al medio extracelular. Esta posibilidad fue además sostenida por observaciones adicionales que indicaron que parte de la IL-1 $\beta$  intracelular se localiza en vesículas que solapan con el marcador autofágico LC3B.

# Objetivos

## Objetivo general

Considerando la relevancia de la IL-1 $\beta$  en el desarrollo de la inflamación, el presente trabajo de tesis tuvo como objetivo general, investigar los mecanismos que subyacen a la exportación de la IL-1 $\beta$  en los neutrófilos humanos mediante un estudio sistemático y cuantitativo, con el fin de contribuir a la identificación de los mecanismos que controlan el desarrollo de inflamación mediada por neutrófilos.

## Objetivos específicos

- Determinar si un mecanismo de autofagia media la translocación de la IL-1 $\beta$  citoplasmática a vesículas y en consecuencia permite su secreción.
- Confirmar, mediante un estudio cuantitativo, que la promoción de la autofagia promueve la translocación de la IL-1 $\beta$  a vesículas.
- Confirmar que las vesículas conteniendo IL-1 $\beta$  no transitan a una vía degradativa clásica.
- Determinar si la autofagia media la secreción de pro-IL-1 $\beta$ .
- Determinar si la IL-1 $\beta$  es secretada en forma soluble o en vesículas.
- Determinar el mecanismo que conduce a la translocación de la IL-1 $\beta$  a vesículas y a la fusión de las mismas con la membrana plasmática.
- Determinar el papel de las serinoproteasas en la regulación de la secreción de IL-1 $\beta$ .
- Determinar el papel de la autofagia en el destino de componentes del inflammasoma.

# **Materiales y métodos**

Los procedimientos experimentales llevados a cabo en este trabajo fueron evaluados y aprobados por el Comité de Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina y los Comités de Docencia y Bioseguridad del Instituto de Medicina Experimental (IMEX) – CONICET, Academia Nacional de Medicina.

## Materiales y reactivos utilizados

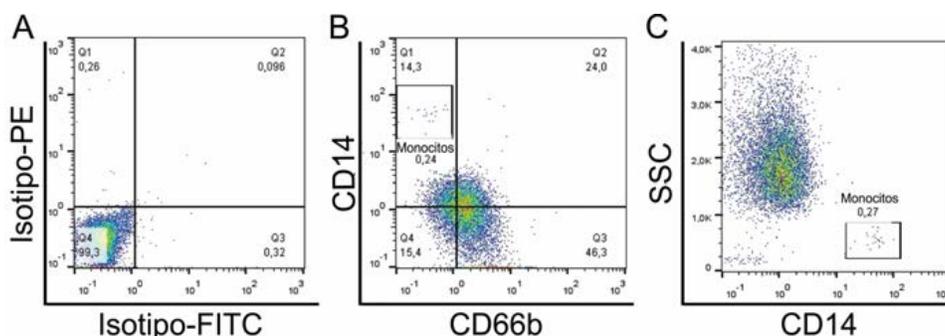
Los medios de cultivo RPMI 1640 y Earle's Balanced Salt Solution (EBSS), el sustrato TMB, la sonda LysoTracker™ Red DND-99, el persulfato de amonio y el PageRuler fueron adquiridos de Thermo Fisher Scientific Life Technologies (Massachusetts, MA). El suero fetal bovino (SFB) y la seroalbúmina bovina fueron adquiridos de Internegocios (Buenos Aires, Argentina). El Ficoll-Paque y el marcador de peso molecular Rainbow RPN800 fue adquirido de GE Healthcare (Munich, Germany). Las placas con fondo de vidrio para MLC en tiempo real fueron adquiridas de Greiner Bio One. Las cámaras Lab-Tek se compraron a from Nalgene Nunc International, New York, NY, USA. BD OptEIA™ Human IL-1 $\beta$  ELISA Set II fue adquirido de BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ). Quantikine Human Pro-IL-1 $\beta$ /IL-1F2 Immunoassay fue adquirido de R&D (Minneapolis, MN). Los anticuerpos secundarios fueron comprados de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA): Alexa Fluor® 647 AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), cat.# 111-606-144; Alexa Fluor® 488 AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) #111-546-144; DyLight 549 conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-mouse IgG (H+L), cat. # 115-506-062; Cy™3 AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L), cat. # 115-166-146. El TO-PRO-3 fue adquirido de Life Technologies (Carlsbad, CA). El anticuerpo anti-CD14 conjugado a ficoeritrina fue comprado a eBioscience (San Diego, CA). El medio de montaje Aqua-Poly/Mount Coverslipping Medium fue adquirido de Polysciences (Warrington, PA). El anticuerpo policlonal de conejo anti LC3B cat. #sc28266 utilizado fue el de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX); el anticuerpo monoclonal de conejo anti IL-1 $\beta$  (clon AS10) cat. #LS-C26495 fue comprado a LifeSpan BioScience y el Cat. # 552289 a BD Pharmingen conjuntamente con el control de isotipo purificado de ratón IgG1  $\kappa$ , cat.# 555746. La IgG policlonal de conejo fue de Jackson ImmunoResearch. Los inhibidores VPS34-IN1 y 3-metiladenina fueron adquiridos de Cayman. Las sondas FAM-FLICA® Caspase-1 Assay Kit y FAM-FLISP FLCK Serine protease kit fueron adquiridas de Immunochemistry Technologies, (MN, EEUU). El *cocktail* de inhibidores de proteasas utilizado fue de Roche (Basilea, Suiza). La membrana de PVDF fue adquirida a Millipore (Massachusetts, Estados Unidos). Todos los demás reactivos utilizados fueron comprados a Sigma Aldrich (St. Louis, MO).

## Obtención de los neutrófilos

Se emplearon neutrófilos obtenidos de sangre periférica humana de donantes sanos bajo consentimiento informado. Todos los estudios fueron realizados cumpliendo las salvaguardas previstas en la Declaración de Helsinki.

Los neutrófilos fueron purificados mediante gradiente de Ficoll-Triyosom de densidad 1,078 g/ml y sedimentación en dextrán 6% siguiendo el protocolo descrito previamente <sup>91</sup>. Los glóbulos rojos contaminantes fueron removidos por lisis hipotónica con H<sub>2</sub>O destilada fría. Luego se realizó un lavado con solución fisiológica y las células (>97% de granulocitos neutrófilos determinado por citometría de flujo) fueron resuspendidas a 5x10<sup>6</sup>/ml en RPMI 1640 con rojo fenol y 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina (100 unidades/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) (medio completo).

Luego del aislamiento se determinó la pureza de la población mediante marcación con anticuerpos anti-CD14 conjugado a ficoeritrina (PE) y CD66b (FITC) por citometría de flujo (**Figura 7**). Como se muestra en la **Figura 7B**, la marcación con CD66b y CD14 arrojó porcentajes de contaminación con monocitos similares que al utilizar sólo la marcación con CD14 (**Figura 7C**). Por lo tanto, a lo largo de esta tesis se utilizó únicamente el nivel de expresión de este último marcador para determinar el porcentaje de monocitos contaminantes en las preparaciones de neutrófilos. Este tipo de análisis es apropiado debido a que la expresión de CD14 en monocitos supera en más de un orden de magnitud a la detectada en los neutrófilos, permitiendo una identificación sencilla de cada población.



**Figura 7.** Pureza de las preparaciones de neutrófilos. Gráficos de puntos representativos de las poblaciones al finalizar el aislamiento de los neutrófilos. Gráfico de puntos de los controles de isotipo (A), expresión de CD14 vs. CD66b (B) y expresión de SSC-H vs CD14 (C). La región delimitada en B (0,24%) y C (0,27%) representan los monocitos contaminantes (población CD14<sup>alto</sup>).

En nuestros estudios, sólo se emplearon aquellos aislamientos donde el nivel de contaminación con monocitos no excedió el 0,5% y los parámetros *forward scatter (FSC)* y *side scatter (SSC)* fueron compatibles con los correspondientes a neutrófilos no activados.

Para reducir la posibilidad de que los neutrófilos se activaran espontáneamente, los mismos fueron empleados al término de la purificación. Además, los reactivos utilizados fueron estériles y libres de endotoxinas.

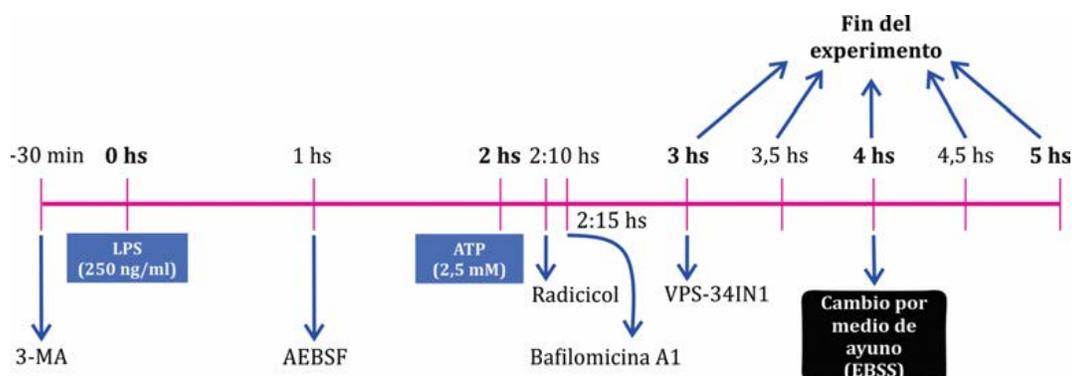
## **Protocolo para estimular la síntesis y el procesamiento de la IL-1 $\beta$**

Se aplicó el mismo protocolo que en nuestros estudios previos demostró que en respuesta a LPS, los neutrófilos humanos sintetizan IL-1 $\beta$  y son capaces de procesarla y secretarla, especialmente cuando son estimulados posteriormente con ATP<sup>91,155</sup>. Para ello, los neutrófilos fueron estimulados o no con LPS (250 ng/ml) y luego de dos horas fueron tratados con ATP (2,5 mM). A distintos tiempos postestimulación (p.e.) con el LPS, se recuperaron los sobrenadantes y los pellets celulares. En dichos sobrenadantes se procedió a determinar la concentración de IL-1 $\beta$  y/o pro-IL-1 $\beta$  por ELISA. En los pellets celulares se realizaron diferentes determinaciones por microscopía láser confocal (MLC), cuantificación de citoquinas por ELISA y Western blot.

En adelante, cuando se indiquen tiempos p.e., corresponderán a aquellos transcurridos desde la estimulación con el LPS.

En algunos experimentos, para promover el proceso de autofagia, a las 4 hs p.e., a menos que se indique lo contrario, se procedió a reemplazar el medio de cultivo por medio completo (RPMI 1640 con 10% SFB) o por medio de ayuno (solución salina balanceada de Earle; EBSS) y 30 minutos más tarde se recuperaron los sobrenadantes y los pellets celulares y se procedió como se indicó arriba.

En otros experimentos, a los tiempos indicados se emplearon inhibidores de serinproteasas (AEBSF), inhibidores de la inducción de autofagia (3-MA y VPS34-IN), del flujo autofágico (Bafilomicina A1) y de la chaperona HSP90 (Radicol) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Esquema de estimulación de los neutrófilos. En la línea de tiempo se detallan los momentos en los cuales se realizaron los tratamientos indicados, en la mayoría de los experimentos a lo largo del trabajo de tesis.

## Cuantificación de citoquinas intra y extracelulares por ELISA

Luego de la estimulación indicada, se recolectaron los sobrenadantes de los neutrófilos. En algunos casos, se prepararon extractos de los pellets celulares para la detección de IL-1 $\beta$  o pro-IL-1 $\beta$  utilizando un buffer conteniendo Tritón 0,1% con el agregado de inhibidores de proteasas (utilizado 10 veces más concentrado que la recomendación del fabricante) y AEBSF adicional (1 mM), para inactivar a la gran cantidad de proteasas que contiene el neutrófilo. En dichas muestras se determinó la concentración proteica mediante un kit de ELISA (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) específico para IL-1 $\beta$ . En algunos ensayos además se utilizó un kit específico para la pro-IL-1 $\beta$ . En ambos casos, se siguieron las instrucciones provistas por los fabricantes.

Para los casos en que se determinó el contenido de IL-1 $\beta$  en vesículas extracelulares, al terminar el experimento, se centrifugaron las muestras con una centrifugación de 12 segundos en una microcentrífuga Haereus (en adelante denominado *spin*; al cabo de esos segundos alcanza 13000 x g) para remover a las células. Las células fueron centrifugadas 15 minutos a 2000 x g para remover el *debris* celular. Luego los sobrenadantes se centrifugaron por 20 minutos a 16.000 g a 4°C. El *pellet* conteniendo microvesículas fue recolectado y congelado a -20°C en PBS. El sobrenadante fue sometido a una nueva centrifugación por 2 hs a 100000 x g en una ultracentrífuga (Beckman Coulter L7-55). Al cabo de la misma, se separaron los sobrenadantes y los *pellets* conteniendo exosomas, los cuales fueron también congelados a -20°C. El día de la cuantificación, los *pellets* conteniendo microvesículas y exosomas se permeabilizaron con Tritón 0,1%, antes de la cuantificación de las citoquinas, en paralelo con la determinación en los sobrenadantes para cuantificar los niveles de IL-1 $\beta$  solubles.

## Estudios de microscopía láser confocal (MLC)

Se realizaron empleando un microscopio láser confocal FluoView FV1000 (Olympus, Tokyo, Japan) equipado con un objetivo PLAPON 60X de apertura numérica 1.42. Se tomaron imágenes de áreas de 41.943  $\mu\text{m}$  de lado con resolución de 1024x1024 (tamaño de pixel = 41  $\mu\text{m}$ ), a menos que se indique lo contrario. Estas imágenes fueron analizadas mediante el programa FIJI/ImageJ (NIH Image, Bethesda, EEUU).

## Estudios de citometría de flujo

Se realizaron empleando un citómetro FACscalibur (BD Pharmingen, EE. UU) o un citómetro Cyflow (Cysmex Partec, Alemania). Los datos fueron analizados con el programa FlowJo v7.6.2 (FlowJo LLC, EE. UU).

## Fijación, permeabilización e inmunomarcación de las células para MLC y citometría de flujo

Luego de transcurridos los tiempos de incubación descritos para cada protocolo, se procedió a centrifugar a los neutrófilos con un *spin* de 12 segundos para la obtención de los *pellets* celulares y se los fijó con PFA 4% por 30 minutos en oscuridad. Posteriormente, las células se incubaron por 15 minutos con PBS-Glicina 0,1 M para bloquear los sitios aldehído libres que pudieran haber quedado luego de la fijación, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con acetona pura fría (-20°C) por 7 minutos. A continuación, luego de una centrifugación, se rehidrataron los pellets con PBS y se realizó un bloqueo *overnight* (ON: 16 h) a 4°C con PBS con 5% de suero de cabra (*Buffer* de bloqueo).

Para las inmunomarcaciones dobles, las muestras fueron incubadas con el o los anticuerpos primarios o su isotipo correspondiente en *buffer* de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente (TA). Pasado este tiempo, se realizó un lavado con PBS y se incubó a las células con el o los anticuerpos secundarios correspondientes por 45 minutos a TA. Posteriormente, las mismas se sometieron a otro lavado con PBS y en los casos indicados se marcó el ADN con TO-PRO-3.

En algunos casos se realizaron inmunomarcaciones triples, para las cuales se realizaron dos aproximaciones. La primera fue utilizar dos anticuerpos primarios de la misma especie, y un tercero de otro origen. En este caso se siguió el protocolo recomendado por Jackson (<https://www.jacksonimmuno.com/technical/products/protocols/double-labeling-same-species-primary/example-a>). En primer lugar, se incubó con uno de los anticuerpos primarios o su isotipo, en estos casos de origen conejo, por 1 hora a TA y luego se realizó un lavado con PBS.

Posteriormente se incubó con un exceso del anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488-Fab fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) por 45 minutos a TA y se realizó un lavado con PBS. Por último, se incubó con los anticuerpos primarios restantes o sus respectivos isotipos y luego con los anticuerpos secundarios correspondientes, siguiendo el mismo protocolo que para las marcaciones dobles.

La segunda aproximación fue utilizar un anticuerpo primario marcado y dos anticuerpos primarios sin marcar. En este caso, como primer paso se realizó la marcación como fue descrita anteriormente para las marcaciones dobles, con los anticuerpos primarios sin marcar y sus correspondientes anticuerpos secundarios. Luego se realizó un bloqueo adicional, en este caso con IgG total de ratón sin marcar (0,5 mg/ml) por 45 minutos a TA. Sin lavar se agregó el anticuerpo primario marcado o su correspondiente isotipo y se los incubó por 45 minutos adicionales.

Al finalizar la marcación, aquellos preparados que iban a ser observados por MLC se citocentrifugaron por 5 minutos a 500 rpm en una citocentrífuga (Hettich, Tuttlingen, Alemania) y se montaron con AquaPolymount. En algunos casos, las células fueron sembradas antes del experimento en cámaras Lab-Tek previamente tratadas con Poly-L-lisina 0,01% para su adherencia. Transcurrido el experimento, las células adheridas fueron fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas siguiendo el mismo protocolo descrito para células en suspensión.

Por otro lado, aquellas células que iban a ser analizadas por citometría de flujo se diluyeron con Isoflow y se adquirieron con el citómetro de flujo.

## **Cuantificación de las imágenes obtenidas por MLC**

Para la cuantificación de las imágenes obtenidas mediante el microscopio confocal se empleó el programa de análisis de imágenes FIJI/ImageJ (NIH Image, Bethesda, EEUU) y se programaron macros para automatizar el proceso. En todos los casos, los valores fueron obtenidos para cada célula individual, cuyas áreas fueron establecidas generando regiones de interés (ROI, por sus siglas en inglés) sobre la base de la imagen generada en el canal de la IL-1 $\beta$ . Estas ROI se crearon a partir de máscaras que incluyen la fluorescencia del área total celular obtenidas al aplicar un umbral de intensidad de fluorescencia bajo. La cuantificación se realizó seleccionando aquellos campos en los que la densidad celular fuera baja para permitir una separación correcta de las células al momento de realizar el análisis. Para ello, se aplicó la herramienta *watershed* para separar aquellas células que estuvieran en contacto y así generar ROI individuales conteniendo sólo una célula. Como paso final las ROI fueron corregidas

manualmente. Se descartaron las células que fueron mal segmentadas por el programa y aquellas correspondientes a otros granulocitos como los eosinófilos.

### ***Cuantificación de la intensidad de fluorescencia total y vesicular***

Para el análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia vesicular de IL-1 $\beta$ , se programó un macro con el cual se cuantificó la intensidad de la fluorescencia total por célula y la intensidad de fluorescencia vesicular para cada tratamiento. Este macro involucró el siguiente procedimiento:

- 1- Para cada imagen se sustrajo un valor de intensidad de fondo o *background* obtenido al realizar un promedio de intensidades en la región nuclear.
- 2- Se determinó arbitrariamente un umbral para la intensidad vesicular y otro para el compartimento celular en su totalidad. Los mismos se establecieron para las imágenes de cada experimento independiente realizado, utilizándose el mismo valor umbral para todos los tratamientos de un mismo experimento.
- 3- A partir de ambos valores umbrales se crearon dos máscaras por cada foto.
- 4- Luego de restar el valor *background* correspondiente, se aplicaron ambas máscaras, y se midió la intensidad en ambos compartimentos celulares (total y vesicular).
- 5- Luego se evaluaron las intensidades vesiculares y celulares totales por célula, las cuales fueron expresadas en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) y, en los casos indicados, se tomaron ambos valores y se calculó la siguiente relación:

$$\frac{\textit{intensidad vesicular}_{(célula i)}}{\textit{intensidad total celular}_{(célula i)}} \cdot 100 = \% \textit{ intensidad vesicular por célula}$$

dónde *i* corresponde a cada célula individual de esa imagen.

- 6- Por último, en los casos indicados, se realizó un promedio de todos los valores por célula obtenidos.

### ***Cuantificación del área vesicular colocalizante por célula***

Para el análisis cuantitativo del área colocalizante por célula entre dos proteínas analizadas, se programó un macro en el que a partir de cada imagen se estableció la intensidad de marca para el compartimento vesicular en el canal correspondiente a cada proteína. Para ello se siguieron los siguientes pasos específicos:

- 1- Para cada imagen se sustrajo un valor de fondo o *background* que se obtuvo al realizar un promedio de intensidades en la región nuclear.

- 2- Se crearon dos máscaras para la intensidad vesicular, una para cada canal. Para ello se eligió arbitrariamente un umbral de intensidad para cada uno de los canales a analizar. Los mismos se establecieron para las imágenes de cada experimento independiente realizado, utilizándose el mismo valor umbral para todos los tratamientos de un mismo experimento.
- 3- Se guardaron las máscaras que se generaron a partir de los umbrales aplicados y se obtuvieron imágenes binarias para cada canal, en las cuales se asignó un valor de 1 a los píxeles en los que se detectó señal y 0 a aquellos píxeles que no superaron el umbral.
- 4- Se generó una nueva imagen a partir de la multiplicación de los valores de cada píxel de las fotos binarias generadas en el paso previo. En dicha imagen, en aquellos casos dónde hubiera colocalización de señal, el producto resultante sería 1 y el píxel se mantendría, mientras que en ausencia de colocalización, es decir, en el caso de que la intensidad apareciera en uno solo de los canales, el producto resultante sería 0, y por ende, el píxel no aparecería.
- 5- Se cuantificó el número de píxeles correspondientes al área colocalizante obtenidos en la última imagen generada y el número de píxeles correspondientes al área total celular. Se tomaron ambos valores y se calculó la siguiente relación:

$$\frac{\text{área vesicular colocalizante}_{(célula i)}}{\text{área total celular}_{(célula i)}} \cdot 100 = \% \text{ área colocalizante por célula}$$

dónde  $i$  corresponde a cada célula individual de esa imagen.

- 6- Por último, en los casos indicados, se realizó un promedio con todos los valores obtenidos por célula.

### ***Coefficientes de colocalización de Manders***

Para un análisis de colocalización que nos permitiera conocer cuánto de la fluorescencia total correspondiente a una proteína (por ejemplo, IL-1 $\beta$ ) se superpone en el mismo compartimiento con la de la otra proteína, se emplearon los coeficientes de Manders (M1 y M2)<sup>156</sup>. Estos últimos miden, por cada componente, la cantidad de fluorescencia que se encuentra colocalizando, relativizada a la fluorescencia total del mismo en ese compartimiento. Estos coeficientes son independientes de la intensidad de la señal de cada píxel y oscilan en un rango entre 0, para elementos que no colocalizan, y 1 para aquellos en los que toda la señal se encuentra colocalizando.

Para el análisis de los coeficientes de colocalización de Manders (M1 y M2) entre dos proteínas analizadas, se programó un macro en el que a partir de cada imagen se estableció la

intensidad de fluorescencia para el compartimento vesicular en cada canal. Para ello se procedió con los siguientes pasos específicos:

- 1- Para cada imagen se sustrajo un valor de fondo o *background* que se obtuvo al realizar un promedio de intensidades en la región nuclear.
- 2- Se crearon dos máscaras para la intensidad vesicular, una para cada canal. Para ello se eligió arbitrariamente un umbral de intensidad para cada uno de los canales a analizar. Los mismos se establecieron para las imágenes de cada experimento independiente realizado, utilizándose el mismo valor umbral para todos los tratamientos de un mismo experimento.
- 3- Luego se utilizó el *plugin* *coloc2* del programa FIJI/ImageJ.
- 4- Por último, se realizó un promedio con todos los valores obtenidos por célula.

## **Estudios en tiempo real (*time lapse*) por MLC**

Para los estudios de microscopía en tiempo real se utilizó el microscopio confocal acoplado a una cámara que regula la temperatura y el % de CO<sub>2</sub> (MIU-IBC-I, Olympus, Tokio, Japón). La mezcla de gases utilizada fue la Hemo3 (5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>, Air Liquide, Argentina). Según el experimento se determinó la cantidad de tiempo de estudio de la muestra y los intervalos con los que se adquirieron las imágenes con una resolución de áreas de 105.8 μm de lado con resolución de 512x512 (tamaño de pixel = 207 μm). Se emplearon cámaras con fondo de vidrio (*Cellview glass bottom dishes*) pretratadas con Poly-L-lisina 0,01% por al menos media hora. Luego se realizaron tres lavados con PBS 1X y se sembraron las células sobre la misma para la realización de los tratamientos indicados y posterior marcación.

## **Marcación mediante sondas fluorescentes para estudios por MLC**

Para la detección de caspasa-1 activa, los neutrófilos fueron tratados con LPS por 2 h y estimulados con ATP en presencia de FAM-FLICA, según las indicaciones del fabricante. Esta sonda (FAM-YVAD-FMK) está constituida por la secuencia reconocida por la caspasa-1 (YVAD) rodeada en uno de sus extremos por carboxifluoresceína (FAM, compuesto fluorescente verde) y en el otro extremo por fluorometilcetona (FMK). La caspasa-1 es incapaz de clivar a la sonda FLICA y en lugar de ello establece una unión covalente con el FMK de la secuencia blanco que la inactiva irreversiblemente. Esto permite detectar la presencia de caspasa-1 activa luego de su excitación a 488 nm.

Alternativamente, luego del tratamiento con LPS y ATP, se agregó la sonda FAM-FLISP-FLCK para la marcación de serinproteasas activas. Su principio de acción es similar al descrito previamente para la sonda FAM-FLICA. El FAM-FLISP-FLCK al unirse al sitio activo de las serinproteasas las inactiva, pero la sonda fluorescente se mantiene acoplada a ellas. Ello permite detectar la presencia de serinproteasas activas luego de su excitación a 488 nm. Esta sonda se utilizó según las recomendaciones del fabricante.

Por otro lado, en algunos experimentos se adicionó LysoTracker™ Red DND-99. Esta sonda consiste en un fluoróforo vinculado a una base débil que está sólo parcialmente protonada a pH neutro permitiéndole atravesar membranas celulares. En compartimientos donde el pH es ácido, la sonda queda retenida y fluoresce al ser excitada a 543 nm. La misma se utilizó según las recomendaciones del fabricante.

## **Preparación de extractos celulares totales para Western Blot**

Los neutrófilos fueron estimulados según las condiciones experimentales descritas anteriormente para cada tratamiento, utilizando  $5 \times 10^6$  células por condición. Para la obtención de los extractos celulares totales, luego de 3,5 hs p.e. se procedió a lavar a los neutrófilos con PBS. Luego se les adicionó 50  $\mu$ l de buffer de lisis con el agregado de inhibidores de proteasas (utilizado 10 veces más concentrado que la recomendación del fabricante) y AEBSF adicional (1 mM), para inactivar a la gran cantidad de proteasas que contiene el neutrófilo. Los lisados se calentaron a 95°C por un período de 3 minutos, se agitaron con vórtex y se volvieron a calentar por 7 minutos adicionales. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos, se descartaron los *pellets* con los restos celulares y se conservaron los sobrenadantes conteniendo todas las proteínas solubilizadas de la célula (núcleo/citosol). Las muestras se almacenaron hasta su utilización para Western Blot a -80°C.

La concentración proteica de los lisados fue cuantificada utilizando el reactivo de Bradford según las recomendaciones del fabricante.

## **Ensayo de Western Blot**

Las muestras proteicas obtenidas de los lisados celulares fueron resueltas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE), utilizando en la siembra los siguientes marcadores de peso moleculares: RAINBOW y Page-Ruler.

Las muestras fueron desnaturalizadas por el agregado de buffer de siembra (6X) e incubadas a 95°C por 5 minutos. Se sembraron 50 µg de proteína en cada calle del gel. La separación de las proteínas se realizó en geles de 12% de poliacrilamida. La electroforesis del gel se desarrolló en buffer de corrida (Tris-Glicina-SDS) utilizando el aparato de electroforesis de BioRad (Mini-Protean 3System, BioRad, Hercules, CA, EE. UU) conectado a una fuente BioRad (PAL3000). Las condiciones de corrida fueron de 100 V. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride) Immobilon-P® utilizando el sistema de BioRad (Mini-Protean 3System, BioRad). La electrotransferencia se realizó en buffer de transferencia (Tris-Glicina-Metanol) en frío, a 400 mA, por 1,5 hs.

Las membranas fueron bloqueadas con *buffer* de bloqueo (TBS 1X; 0,1% v/v Tween-20, 1% BSA) por 1 hora a TA. Luego fueron incubadas con el anticuerpo primario diluido en buffer de bloqueo por 12 horas a 4°C con agitación. Se realizaron 3 lavados con TBS-T (TBS 1X, pH =7,4 – Tween 20 0,1%) por 10 minutos a TA y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP, *horseradish peroxidase*) por 1 hora a TA con agitación. Finalmente se realizaron tres lavados con TBS-T.

Las membranas se revelaron utilizando la incubación con ECL en cuarto oscuro o en el G:Box HR16 (Syngene, Cambridge, Reino Unido). Las mismas fueron expuestas a placas de revelado Kodak film BioMax XAR.

Para el análisis de distintas proteínas en una misma membrana se despegaron los anticuerpos primarios y secundarios previamente utilizados (proceso conocido como “*stripping*”) utilizando 10 ml de un buffer *stripping* conteniendo 0,5 M Tris (pH= 6,8) y 2% de SDS + 70 µl de β-mercaptoetanol por 30 minutos a 55 °C con agitación manual cada 10 minutos. Luego se lavó con TBS (*Buffer* TRIS (pH=7,4)) y se mantuvo con agitación a TA por 10 minutos. Se readicionó TBS y se volvió a agitar por 10 minutos, pero esta vez a 4°C. Finalmente, la membrana se cambió de depósito y se la incubó con buffer de bloqueo por 4 horas, para posteriormente proseguir con la técnica de inmunomarcación anteriormente descrita para el Western Blot.

## **Análisis estadístico**

El análisis estadístico en general fue realizado con ANOVA de dos factores, seguido por el post test de Bonferroni para comparaciones múltiples. En algunos casos se utilizó el test de Mann–Whitney para grupos no pareados, o alternativamente el modelo lineal generalizado (GLZ) seguido de ANOVA. Los estadísticos fueron calculados mediante el programa GraphPad

Prism v6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA o el programa InfoStat, Córdoba, Argentina, para el análisis GLZ. La significancia estadística fue definida como  $p < 0,05$ .

# **Resultados**

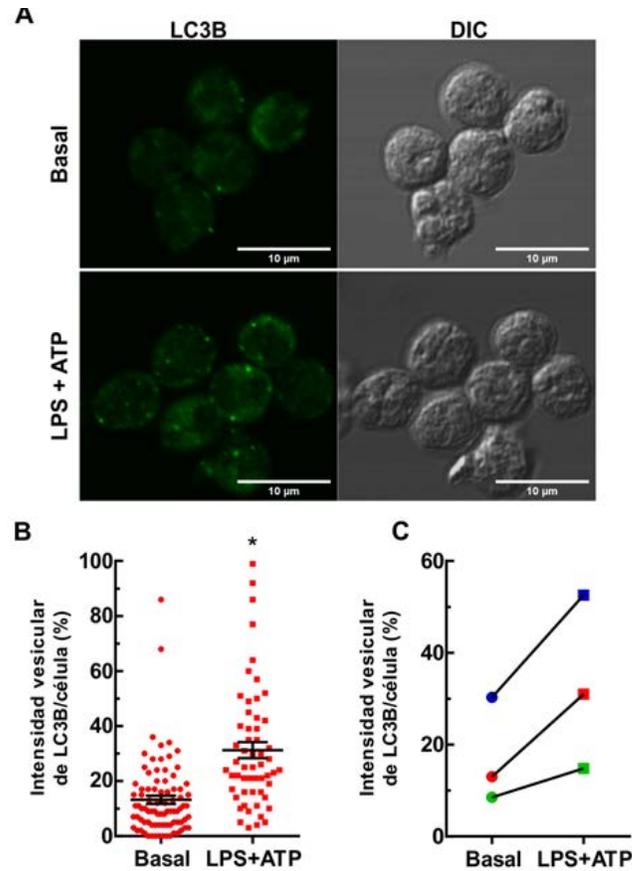
## Exportación de la citoquina IL-1 $\beta$ por los neutrófilos humanos

### *Activación del flujo autofágico por estimulación de neutrófilos con LPS y ATP*

Como hemos mencionado, nuestros hallazgos previos sugirieron que la autofagia se encuentra involucrada en el mecanismo que conduce a la secreción de IL-1 $\beta$  <sup>155</sup>. Con el objeto de confirmar si el proceso autofágico es requerido para la incorporación de la IL-1 $\beta$  a vesículas desde las cuáles es luego conducida al medio extracelular, decidimos realizar estudios cuantitativos aplicando técnicas de MLC, los cuales, mediante la determinación de la localización intracelular de la citoquina, pudiesen aportar evidencias para sustentar esa posibilidad.

Para ello, en primer lugar, optimizamos el procedimiento de inmunomarcación y los métodos de cuantificación de imágenes. En estos estudios tuvimos en consideración que la molécula LC3 es una proteína citoplasmática que se conjuga a la fosfatidiletanolamina presente en la membrana de los autofagosomas cuando se gatilla un proceso autofágico. Por ello, mediante MLC puede ser detectada en forma libre en el citoplasma o en forma de puntos discretos que corresponden a la LC3 asociada a autofagosomas en células que se encuentran experimentando autofagia. Esta particularidad de LC3 nos permitió investigar, en primer lugar, si el tratamiento de neutrófilos con LPS y ATP induce el flujo autofágico.

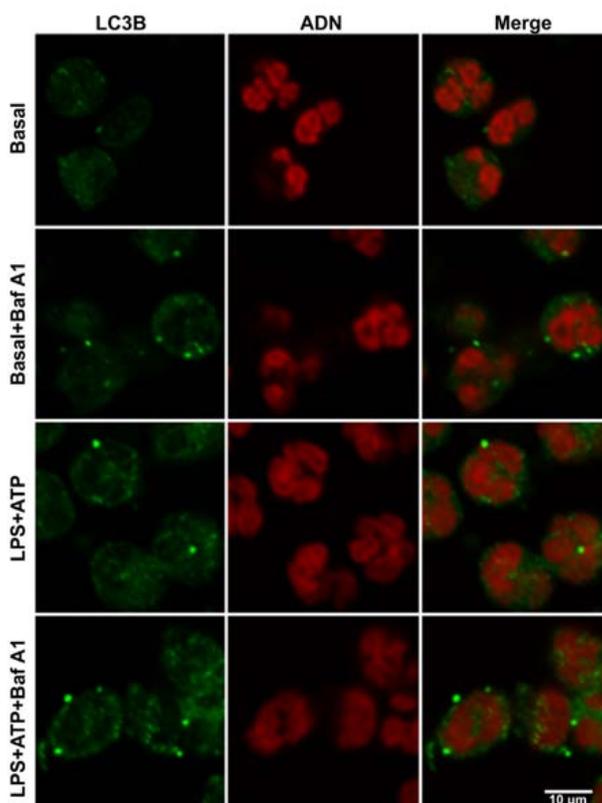
Para ello estimulamos a los neutrófilos con LPS y ATP como se describió en los materiales y métodos y luego de tres horas, inmunomarcamos a la isoforma B de LC3 (LC3B) y capturamos imágenes por MLC. Luego procedimos a realizar las cuantificaciones de la intensidad total y vesicular de LC3B y calculamos el porcentaje de intensidad de LC3B vesicular por célula mediante el software FIJI/ImageJ. Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento de los neutrófilos con LPS y ATP incrementó los puntos LC3B positivos (LC3B+) con respecto a las células tratadas sólo con vehículo (basal), lo que se vio reflejado en el aumento del porcentaje de intensidad de LC3B vesicular (**Figura 9**). Estos resultados estaban en acuerdo con la posibilidad de que el tratamiento con LPS y ATP induzca un aumento de la autofagia.



**Figura 9.** El tratamiento de neutrófilos con LPS+ATP incrementa el número de vesículas autofágicas. (A) Se muestran imágenes representativas de neutrófilos tratados con vehículo (basal) o con LPS+ATP (B) El gráfico de puntos muestra el porcentaje de intensidad de LC3B vesicular por célula de un experimento representativo de tres realizados. Las barras negras indican la media  $\pm$  SEM de 84 (basal) y 56 (LPS+ATP) células analizadas. \* $p < 0,05$  (Mann Whitney test). (C) Los datos representan la media del porcentaje de la intensidad vesicular de LC3B por célula realizados con tres dadores diferentes con un mínimo de 35 células analizadas por condición. Las cuantificaciones fueron realizadas utilizando un macro específico con el software FIJI/ImageJ.

Sin embargo, un aumento en el número de puntos LC3B+ no es indicativo *per sé* de un incremento en la autofagia, ya que este hecho también podría ocurrir si el tratamiento con LPS y ATP indujese un bloqueo del flujo autofágico. Para descartar esta posibilidad, analizamos en paralelo el impacto del tratamiento de las células con Baf A1, 15 minutos después de la estimulación con el ATP. El agregado de Baf A1 produce una interrupción en el flujo autofágico ya que por su capacidad de inhibir a la V-ATPasa, bloquea la fusión de los lisosomas con los autofagosomas, impidiendo así el reciclado de sus componentes, entre ellos el LC3B. Ello tiene como consecuencia, una acumulación de vesículas conteniendo LC3B (autofagosomas) si el flujo autofágico se encuentra activo, hecho que puede ser visualizado como un aumento en el número de puntos discretos en el citoplasma. Por el contrario, en células en las cuales la presencia de puntos discretos es consecuencia de un flujo autofágico bloqueado por el

tratamiento (y del reciclado de LC3B obstruido), el agregado de Baf A1 no debería modificar marcadamente el número de puntos discretos identificables en las imágenes de microscopía. Por lo tanto, la realización del ensayo en paralelo con Baf A1 permite discriminar entre ambas posibilidades. Los resultados mostrados en la **Figura 10** indicaron un incremento tanto de puntos como de intensidad de los mismos en células estimuladas con LPS y ATP en presencia de Baf A1 en comparación con aquellas no tratadas con este inhibidor. Estos hallazgos nos permitieron confirmar que la estimulación con LPS y ATP induce el flujo autofágico en los neutrófilos.

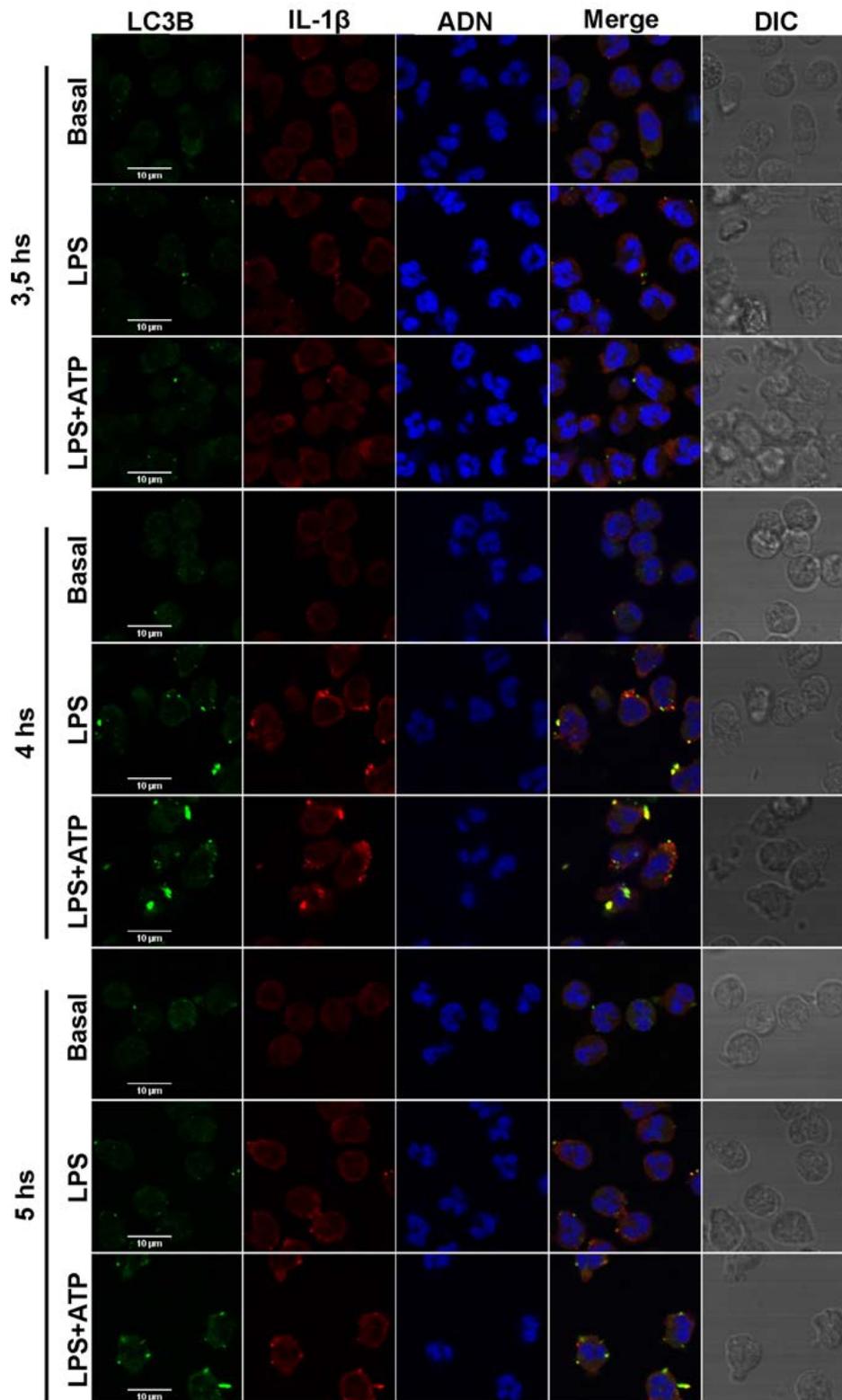


**Figura 10.** La estimulación de neutrófilos con LPS+ATP promueve el flujo autofágico. Los neutrófilos fueron estimulados o no con LPS (250 ng/ml), dos horas después fueron tratados o no con ATP (2,5 mM) y 15 minutos más tarde fueron incubados con Baf A1 (100 nM) o vehículo. A las 3 hs p.e. con LPS, las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas con un anticuerpo específico anti-LC3B (verde) y el ADN fue marcado con yoduro de propidio. Las imágenes se adquirieron por MLC. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes.

### ***Participación de la autofagia en la secreción de IL-1 $\beta$ en neutrófilos humanos***

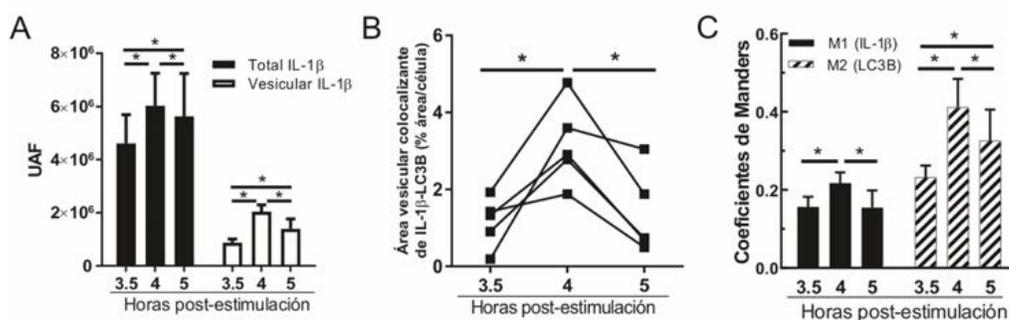
Como ya mencionamos, en estudios previos de nuestro grupo, habíamos determinado que los mayores niveles de IL-1 $\beta$  extracelular se detectan a las 5 hs p.e. con el LPS (**Anexo Figuras 1**

y 2). En dichos estudios pudimos observar que la IL-1 $\beta$  puede ser encontrada colocalizando con LC3B. Por ello, razonamos que si la autofagia es requerida para que la IL-1 $\beta$  sea translocada desde el citoplasma a vesículas, estos acontecimientos deberían ocurrir previo al momento en que se observan los mayores niveles de secreción de la IL-1 $\beta$ . Para corroborar esta posibilidad, realizamos un estudio cinético examinando la distribución intracelular de la IL-1 $\beta$  y evaluando si esta citoquina colocalizaba con el marcador de autofagia LC3B por inmunomarcación y MLC a distintos tiempos luego de la estimulación con LPS. Realizamos este análisis desde las 3,5 hs, momento en que la IL-1 $\beta$  es detectada eficazmente en el citoplasma, hasta las 5 hs, tiempo al cual esta citoquina ya se encuentra presente en altos niveles en el medio extracelular (**Figura 11**).



**Figura 11.** Localización de la IL-1 $\beta$  intracelular a distintos tiempos luego de la estimulación con LPS o LPS+ATP. Los neutrófilos fueron estimulados por 2 hs con LPS y luego tratados o no con ATP. A las 3,5; 4 y 5 p.e. las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas con anticuerpos anti-L-1 $\beta$  (rojo) y LC3B (verde), y con TO-PRO-3 (azul) para marcar el ADN. Las imágenes se adquirieron por MLC y son representativas de 5 experimentos.

Como se muestra en la **Figura 11**, a las 3,5 horas p.e. en aquellas células que fueron estimuladas con LPS y ATP la distribución de IL-1 $\beta$  fue tanto citoplasmática como vesicular. Puede observarse que algunas de las vesículas IL-1 $\beta$ + se solaparon con la señal de LC3B. A las 4 hs p.e., se observaron mayores niveles de IL-1 $\beta$  con una mayor proporción de la citoquina con distribución vesicular, y la gran mayoría de estas vesículas fueron positivas también para LC3B. Por último, a las 5 hs se observaron menores niveles de IL-1 $\beta$  vesicular y menor cantidad de la misma se encontró colocalizando con LC3B. Como muestra la **Figura 11** detectamos un comportamiento similar en células estimuladas sólo con LPS. Para confirmar nuestra apreciación, realizamos la cuantificación de las imágenes capturadas por MLC. Mediante el programa FIJI/ImageJ evaluamos la IL-1 $\beta$  total y vesicular por célula, el área ocupada por las vesículas en las que IL-1 $\beta$  y LC3B colocalizaban (área vesicular colocalizante) como una medida del nivel de colocalización de ambos parámetros, así como los coeficientes de colocalización de Manders (**Figura 12**).



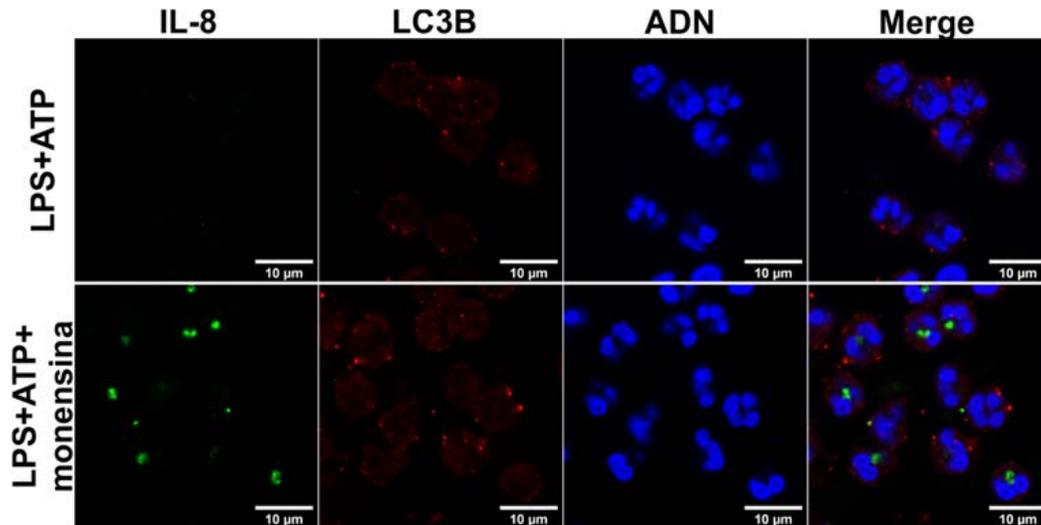
**Figura 12.** Cuantificación de las imágenes de los experimentos en los que analizó la cinética de la distribución de la IL-1 $\beta$  intracelular, luego de la estimulación de los neutrófilos con LPS+ATP. (A) Cuantificación de la intensidad de IL-1 $\beta$  total y vesicular a las 3,5; 4 y 5 hs. p.e. expresado en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF). (B) Promedios del porcentaje del área vesicular colocalizante de IL-1 $\beta$  y LC3B por célula (C) Evaluación de los coeficientes de colocalización de Manders para IL-1 $\beta$  (M1) y LC3B (M2). Las cuantificaciones se realizaron en 5 experimentos independientes con un mínimo de 35 células analizadas a cada tiempo por cada ensayo. \*  $p < 0,05$ , Modelo lineal generalizado (GLZ) con ANOVA.

En concordancia con lo observado en la **Figura 11**, las cuantificaciones de la intensidad de IL-1 $\beta$  total y vesicular (**Figura 12A**) y del área vesicular colocalizante entre IL-1 $\beta$  y LC3B vesicular (**Figura 12B**) indicaron que a las 4 horas los valores alcanzan su máximo, y luego a las 5 horas estos descienden.

Para cuantificar el grado de colocalización entre IL-1 $\beta$  y LC3B se evaluaron los coeficientes de Manders (**Figura 12C**). Estos oscilan en un rango que va de 0, para elementos que no colocalizan, a 1 para aquellos que lo hacen en su totalidad. Las imágenes analizadas mostraron que estos coeficientes se incrementaron a las 4 hs p.e., en comparación a los evaluados a las 3,5

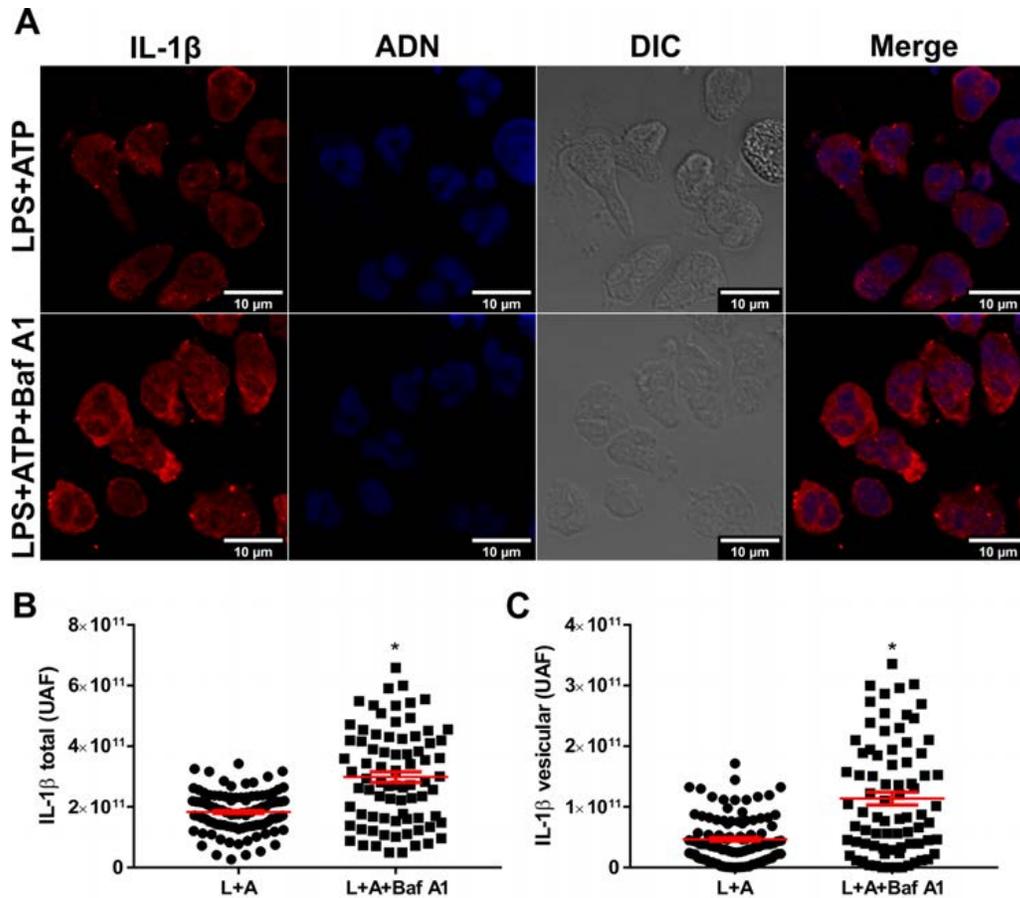
hs p.e., indicando una mayor colocalización de estas dos proteínas. A las 5 hs p.e. los valores de estos parámetros descendieron. En conjunto, estos hallazgos acuerdan con las observaciones previas que mostraron que a las 5 horas p.e. la liberación de IL-1 $\beta$  alcanzó su nivel máximo (**Anexo figuras 1 y 2**) y sustentan que la autofagia sea requerida para la translocación de la IL-1 $\beta$  citosólica a vesículas.

En ensayos adicionales también realizamos experimentos control analizando la distribución de la IL-8, una citoquina cuya liberación esta mediada por la vía canónica de secreción de proteínas. Estos experimentos fueron realizados con el fin de garantizar que nuestras condiciones experimentales no condujeran a la detección artefactual de colocalización entre LC3B y cualquier proteína intracelular independientemente de la vía por la cual es secretada. Con este propósito se estimuló a los neutrófilos con LPS a tiempo cero, luego de 2 hs se los trató con ATP y a las 4 hs se fijaron y se procedió a la inmunomarcación. Tal como era de esperar para una proteína cuya secreción sigue la vía RE-Golgi, bajo las mismas condiciones experimentales en que la IL-1 $\beta$  es detectada, fue prácticamente imposible determinar la expresión de la IL-8 (**Figura 13**). Para confirmar que la incapacidad de visualizar a la IL-8 se debiera a que la misma es secretada muy rápidamente luego de su producción y no fuese un defecto de nuestro sistema de detección, realizamos ensayos adicionales incluyendo monensina. Este es un agente que bloquea la secreción de proteínas sintetizadas en ribosomas adheridos a RE, inhibiendo al transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> transmembrana del aparato de Golgi. Como se puede observar en las imágenes, la adición de monensina permitió la detección de la IL-8 pero en ningún caso la misma colocalizó con LC3B (**Figura 13**). Estos resultados no sólo respondieron nuestro interrogante, sino que además confirmaron que la IL-1 $\beta$  es secretada por los neutrófilos por una vía que difiere de la vía canónica de secreción de proteínas.



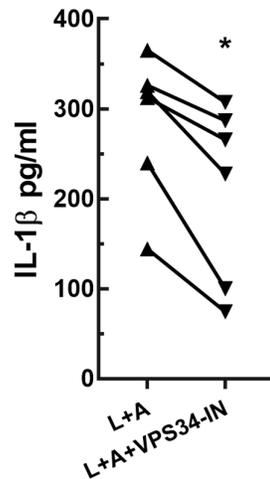
**Figura 13.** La interleuquina 8 (IL-8), citoquina secretada por la vía canónica de secreción de proteínas no colocaliza con LC3B. Los neutrófilos fueron estimulados con LPS (250 ng/ml), en ausencia (arriba) o presencia (abajo) de monensina y dos horas después fueron tratados con ATP (2,5 mM). A las 4 hs p.e., las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas con un anticuerpo anti-IL-8 (verde), anti-LC3B (rojo) y el ADN fue marcado con TO-PRO-3. Las imágenes se adquirieron por MLC.

Para fortalecer los resultados obtenidos hasta el momento respecto del papel de la autofagia en la vía de secreción de la IL-1 $\beta$ , decidimos realizar ensayos adicionales con Baf A1, para bloquear el flujo autofágico. Nosotros razonamos que, si la Baf A1 era agregada poco después de la estimulación con el ATP, la IL-1 $\beta$  debería acumularse a tiempos tempranos p.e. (3 hs). Como puede observarse en la **Figura 14A** y del resultado de cuantificación de las imágenes obtenidas (**Figura 14B**), tal como esperábamos, los niveles de intensidad de IL-1 $\beta$  total y vesicular se vieron incrementados por acción de la Baf A1. Cabe recordar, que previamente habíamos observado, el tratamiento con Baf A1 inhibió la secreción de IL-1 $\beta$  (**Anexo Figura 3**).



**Figura 14.** Impacto del tratamiento con Baf A1 sobre la expresión y distribución intracelular de la IL-1β. Los neutrófilos fueron estimulados con LPS a tiempo cero, con ATP a las 2 hs, y 15 minutos después fueron tratados o no Baf A1. A las 3 hs p.e. se fijaron, permeabilizaron e inmunomarcaron con un anticuerpo anti-IL-1β y se tomaron las imágenes por MLC (A). Las cuantificaciones de las imágenes adquiridas por MLC (B y C) fueron realizadas utilizando un macro específico con el software FIJI/ImageJ. Los gráficos de puntos muestran la intensidad total de IL-1β por célula (B) y la intensidad de IL-1β vesicular por célula (C), expresadas en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF). Las barras rojas indican la media  $\pm$  SEM de 98 (LPS + ATP) y 78 (LPS+ATP+Baf A1) células analizadas representativas de dos experimentos. (\*  $p < 0,05$ , Modelo lineal generalizado (GLZ) con ANOVA)

En experimentos adicionales quisimos determinar si la inhibición de la inducción de la autofagia una vez que la IL-1β hubiese sido sintetizada afectaba su secreción. Para ello empleamos un inhibidor específico de la PI3K de clase III, el VPS34-IN1, que es la enzima clave que participa en la inducción del proceso autofágico y lo adicionamos 3 horas después de la estimulación con LPS (**Figura 15**).

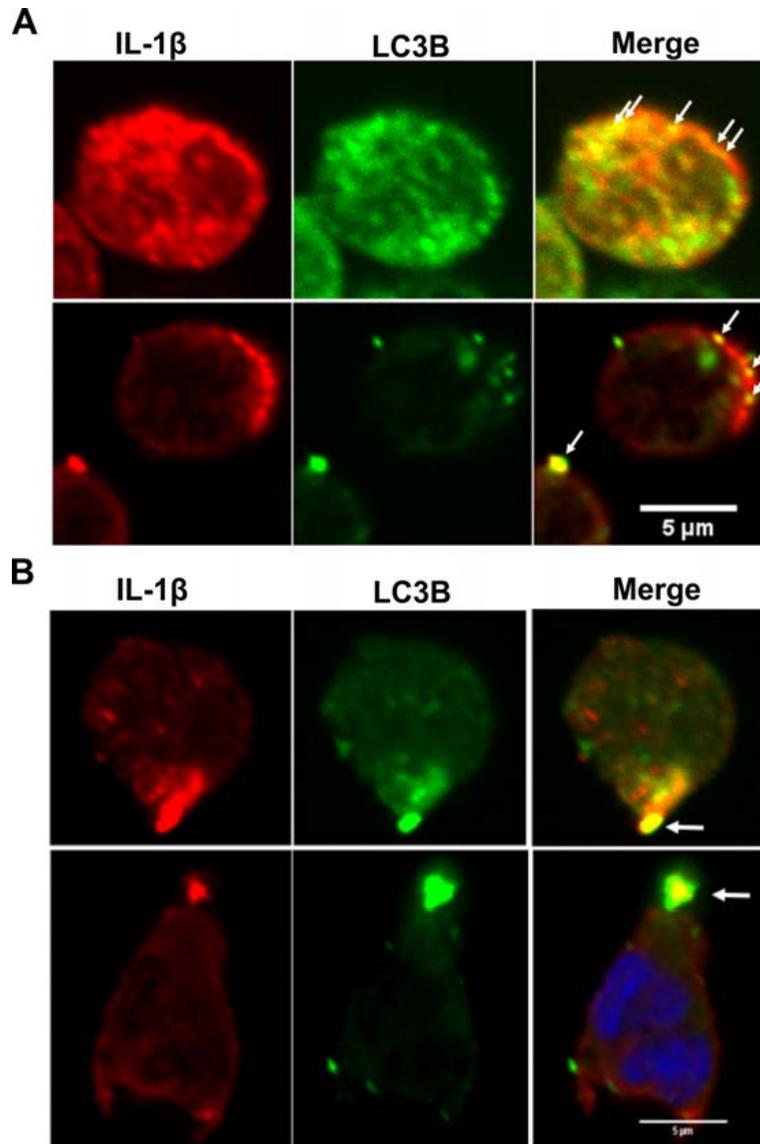


**Figura 15.** Efecto del tratamiento con VPS34-IN1 sobre la secreción de IL-1 $\beta$ . Los neutrófilos fueron estimulados con LPS (250 ng/ml), dos horas más tarde se les adicionó ATP (2,5 mM) y a las 3 horas p.e. se agregó VPS34-IN1 (1  $\mu$ M) o vehículo. A las 5 hs p.e. se recuperaron los sobrenadantes y se cuantificaron los niveles de IL-1 $\beta$  por ELISA. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes realizados por duplicado. \*  $p < 0,05$  Test de Wilcoxon para muestras no paramétricas.

Luego de la cuantificación de la IL-1 $\beta$  por ELISA observamos una disminución en la secreción de IL-1 $\beta$  en presencia del inhibidor de la autofagia.

En conjunto, los hallazgos obtenidos con Baf A1 y VPS34-IN se corresponden con la posibilidad de que tanto la incorporación de IL-1 $\beta$  citosólica a las vesículas sea obstaculizada si el flujo autofágico es interrumpido, como con la necesidad de un flujo autofágico activo para que la IL-1 $\beta$  sea secretada.

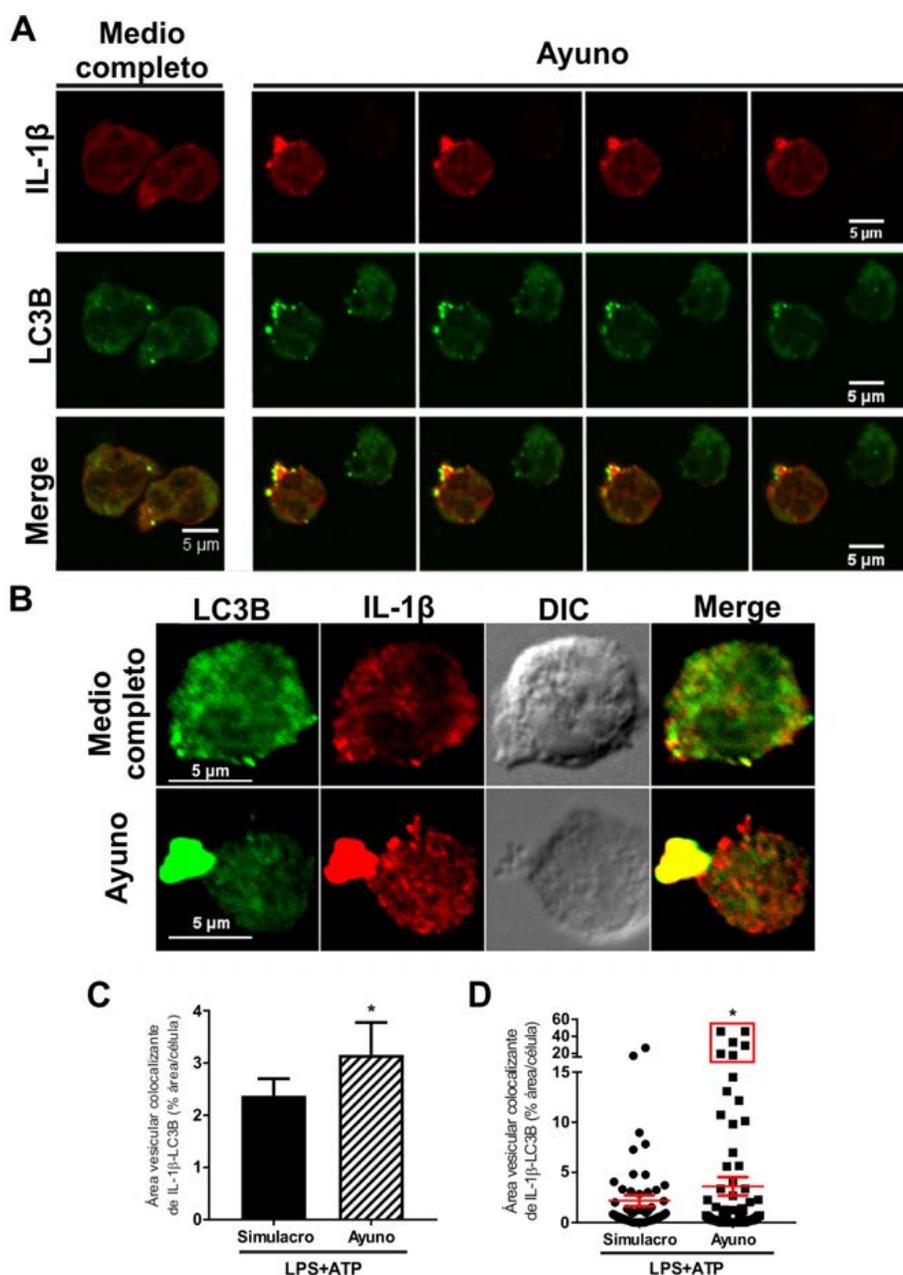
Por otra parte, el análisis de cientos de imágenes mostró que a las 4 hs p.e. la IL-1 $\beta$  podía ser encontrada colocalizando con LC3B en vesículas que se disponían cerca de la membrana plasmática (**Figura 16A**). En muchas ocasiones, estas vesículas se encontraban concentradas en un polo de la célula (**Figura 16B**). Estos hallazgos también acuerdan con la hipótesis de que la IL-1 $\beta$  es secretada desde un compartimento autofágico, teniendo en cuenta que éste es el tiempo previo a aquel en que la mayor secreción de IL-1 $\beta$  es observada.



**Figura 16.** Distribución de la fluorescencia de la IL-1 $\beta$  y LC3B en neutrófilos estimulados con LPS+ATP. Las células se fijaron a las 4 hs p.e., luego fueron permeabilizadas e inmunomarcadas con anticuerpos específicos anti-IL-1 $\beta$  (rojo) y LC3B (verde). El ADN fue marcado con TO-PRO-3 (azul). Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal. Las flechas blancas indican compartimentos donde se solapa la fluorescencia cerca de la membrana plasmática de las células (A) o en un polo del neutrófilo (B). Las imágenes son representativas de experimentos con 10 dadores independientes.

Como ya mencionamos, en estudios previos determinamos que la estimulación de la autofagia por ayuno promueve la secreción de IL-1 $\beta$ <sup>155</sup> (**Anexo Figura 4A**). Con el objeto de realizar un estudio cuantitativo que nos permitiera definir un modelo para el mecanismo de secreción, en este trabajo, realizamos ensayos tratando a los neutrófilos con LPS y ATP y luego estimulando o no la autofagia por ayuno. Posteriormente, procedimos a la inmunomarcación de IL-1 $\beta$  y LC3B, a la captura de imágenes por MLC y su cuantificación (**Figura 17**). En la **Figura 17A**, el segmento mostrado de las células que fueron sometidas a ayuno corresponde a imágenes

tomadas en distintos planos focales xy a lo largo de un mismo eje z (*z stack*). En dichas imágenes podemos observar que la colocalización de IL-1 $\beta$  y LC3B se encontró incrementada en comparación con la detectada en los neutrófilos que no estuvieron sometidos al tratamiento de ayuno. Además, en la **Figura 17B** también observamos que el ayuno incrementa la aparición y el tamaño de vesículas LC3B positivas que solapan con la señal de la IL-1 $\beta$ . La cuantificación de las imágenes adquiridas indicó que la estimulación del proceso autofágico por privación de nutrientes incrementó el porcentaje del área vesicular colocalizante de IL-1 $\beta$  con LC3B por célula (**Figura 17C**). Al graficar la distribución del área vesicular colocalizante de IL-1 $\beta$  con LC3B por célula para un experimento representativo, (**Figura 17D**, donde cada punto representa los valores correspondientes a células individuales), es posible distinguir aquellas células en que el ayuno incrementó marcadamente el porcentaje del área vesicular colocalizante por célula, que se corresponden con las observadas en la **Figura 17B**, (células identificadas con un cuadrado rojo).

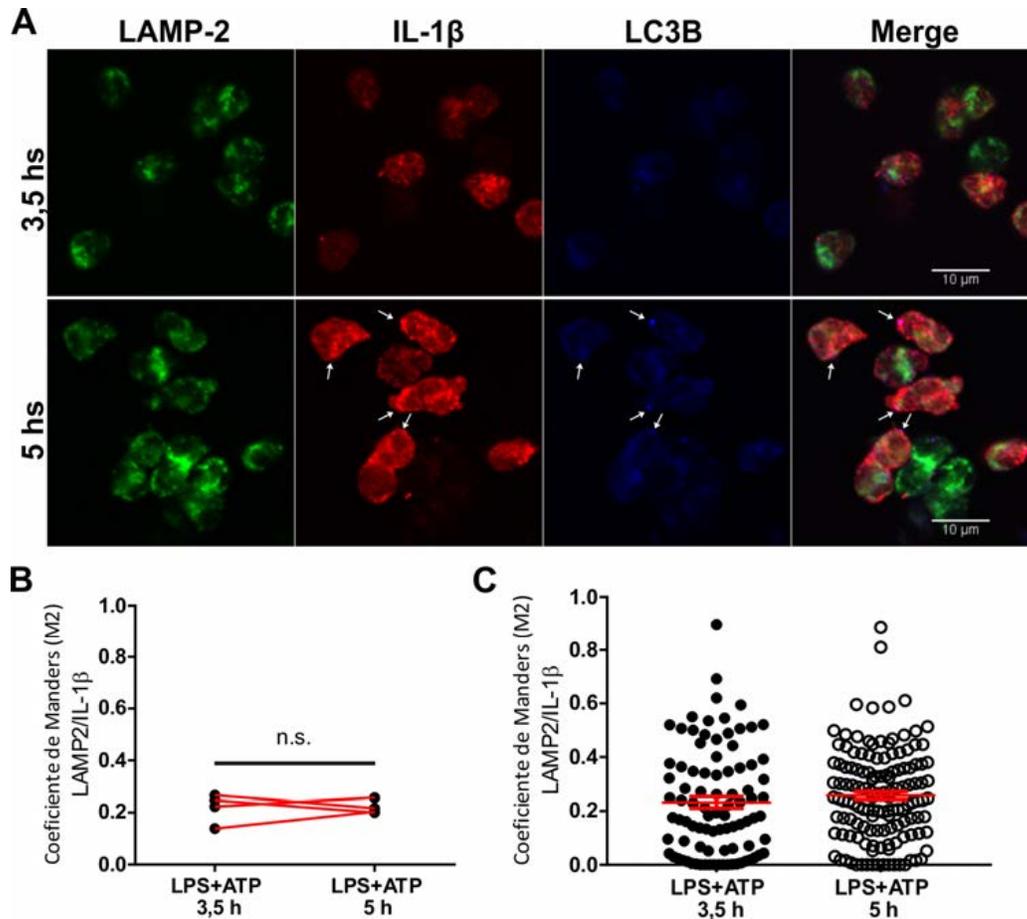


**Figura 17.** Efecto de la estimulación de la autofagia por ayuno en la distribución intracelular de la IL-1 $\beta$ . Los neutrófilos fueron estimulados o no con LPS y 2 hs después fueron tratados o no con ATP. A las 3,5 hs p.e., el medio celular fue remplazado por medio completo (simulacro) o con Solución de sales balanceadas de Earle (ayuno) y cultivados por media hora adicional. (A, B) Las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas con anticuerpos anti-IL-1 $\beta$  (rojo) y LC3B (verde). Las imágenes son representativas de 4 experimentos independientes. (A; panel de ayuno) Las imágenes pertenecen a un *z stack* colectado a intervalos de 0,3  $\mu$ m. (C, D) Cuantificaciones de los experimentos mostrados en (A) mediante el programa FIJI/ImageJ. (C) Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM del porcentaje de área vesicular colocalizante de IL-1 $\beta$  y LC3B por célula de dos experimentos independientes. (D) Gráfico de puntos de uno de los experimentos representados en (C). Las barras rojas indican la media  $\pm$  SEM de 66 (Simulacro) y 90 (Ayuno) células analizadas. El cuadrado rojo señala las células que corresponden a aquellas con grandes vesículas mostradas en B. \* $p < 0,05$  Análisis Mann–Whitney.

### ***Evidencia de que las vesículas conteniendo IL-1 $\beta$ no transitan a una vía degradativa clásica***

Los resultados detallados hasta el momento indicaron que previamente a ser detectada en el medio extracelular, la IL-1 $\beta$  puede ser encontrada intracelularmente junto con la proteína marcadora de autofagia LC3B. Además, revelaron que, si el proceso autofágico es estimulado, se observa un incremento marcado en la colocalización de ambas proteínas. Sin embargo, estos hallazgos no indican si la IL-1 $\beta$  contenida en las vesículas está en su tránsito para ser secretada o a ser degradada tras una posible fusión de las vesículas con un compartimiento lisosomal. Con el propósito de descartar esta última posibilidad, realizamos ensayos adicionales sabiendo que según la literatura la macroautofagia degradativa involucra la fusión de los autofagosomas con los lisosomas. Como mencionamos en la introducción, algunos investigadores sostienen que el verdadero compartimiento lisosomal de los neutrófilos son los CMV y CML, que se caracterizan por la presencia del marcador lisosomal LAMP-2. Por ello, analizamos la colocalización de la IL-1 $\beta$  con LAMP-2 (**Figura 18**). Para ello, estimulamos o no a los neutrófilos con LPS y ATP, los fijamos a las 3,5 y a las 5 hs. p.e., los permeabilizamos y realizamos una marcación triple con anticuerpos anti-LAMP-2, anti-IL-1 $\beta$  y anti-LC3B (**Figura 18A**). Adicionalmente realizamos la cuantificación de la colocalización de IL-1 $\beta$  y LAMP-2, mediante el programa FIJI/ImageJ para obtener el coeficiente de Manders M2 que es un indicador de la cantidad de la totalidad de la IL-1 $\beta$  vesicular que colocaliza con LAMP-2. (**Figura 18B**).

En acuerdo con los resultados previos, observamos colocalización entre IL-1 $\beta$  y LC3B (**Figura 18A**, flechas blancas). Sin embargo, los resultados de estos experimentos mostraron muy bajos niveles de colocalización de IL-1 $\beta$  con LAMP-2 y no arrojaron diferencias en la colocalización de LAMP-2 e IL-1 $\beta$  a las 3,5 hs y 5 hs p.e. Estos hallazgos descartaron que la IL-1 $\beta$  vesicular esté siendo conducida a una vía autofágica degradativa clásica y fortalecieron la hipótesis indicando que la autofagia direcciona a la IL-1 $\beta$  al medio extracelular.



**Figura 18.** Cinética de la distribución intracelular de LAMP-2, IL-1 $\beta$ , LC3B luego de la estimulación de los neutrófilos con LPS+ATP. Los neutrófilos fueron estimulados por 2 hs con LPS y luego tratados o no con ATP. A las 3,5 y 5 p.e. las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas con anticuerpos anti-LAMP-2 (verde), anti-IL-1 $\beta$  (rojo) y anti-LC3B (Azul). Las imágenes se adquirieron por MLC y son representativas de 5 experimentos. (A) Localización intracelular de las proteínas señaladas luego de la estimulación con LPS+ATP por los tiempos indicados. Las flechas blancas indican puntos de colocalización de IL-1 $\beta$  y LC3B. (B) Valores promedio de los coeficientes de colocalización de Manders (M2) para LAMP-2 e IL-1 $\beta$  de cada uno de 5 experimentos independientes en los cuales un mínimo de 35 células fue analizado a cada tiempo. Los mismos son indicativos de la proporción de toda la IL-1 $\beta$  vesicular que colocalizó con LAMP-2. (C) Coeficientes de colocalización de Manders (M2) correspondientes a las células individuales de uno de los dadores analizados en (B). (n.s., no significativo)

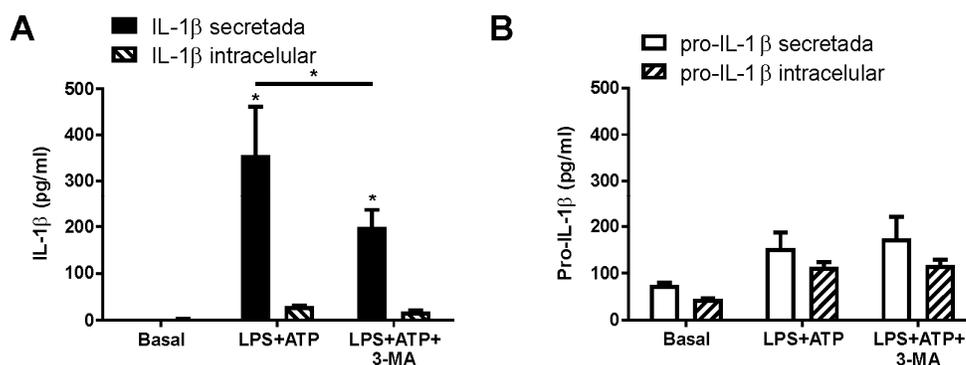
### ***Impacto de la autofagia en la secreción de pro-IL-1 $\beta$***

Teniendo en cuenta que el *kit* de ELISA empleado en este estudio para cuantificar a la IL-1 $\beta$  es altamente específico para la forma madura de esta citoquina, quisimos dilucidar si la pro-IL-1 $\beta$  es también secretada por neutrófilos a estos tiempos, y si la autofagia se encuentra involucrada en dicha exportación. En este sentido, merece señalarse que en estudios previos, determinamos que a tiempos mayores de estimulación (18 hs) no sólo la IL-1 $\beta$ , sino también la pro-IL-1 $\beta$  es liberada por los neutrófilos luego de la estimulación con LPS y ATP<sup>91</sup>. Por ello, para

determinar si a tiempos más tempranos (5 hs) la pro-IL-1 $\beta$  es también secretada por neutrófilos y si la autofagia está involucrada en la secreción de esta proforma, evaluamos el impacto de la inhibición y de la promoción de la autofagia, tanto sobre los niveles de IL-1 $\beta$  y pro-IL-1 $\beta$  intracelular, como de los secretados, mediante ensayos de ELISA específicos para cada isoforma (**Figura 19**).

En primer lugar, pudimos observar que ambas proteínas fueron liberadas al medio extracelular luego de la estimulación de los neutrófilos con LPS y ATP. Sin embargo, los niveles de pro-IL-1 $\beta$  secretados luego de la estimulación no fueron significativamente distintos a los observados en condiciones basales (**Figura 19B**).

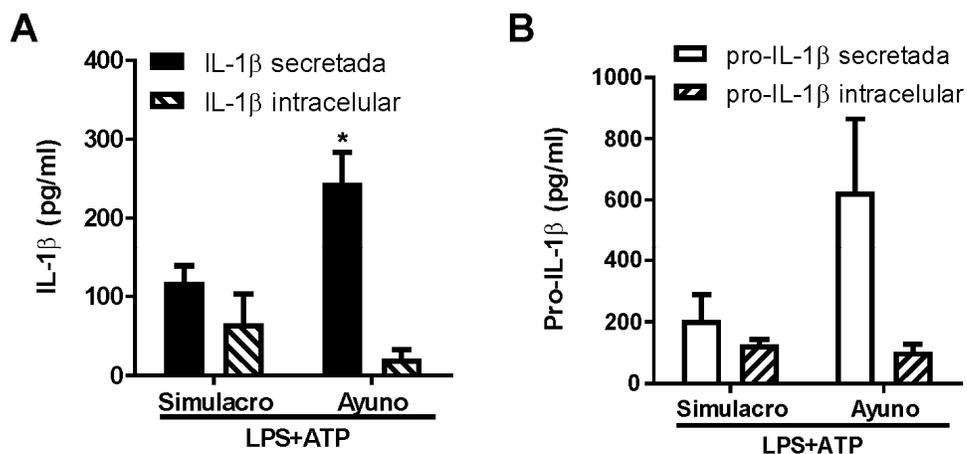
Cuando realizamos los ensayos en presencia del inhibidor de autofagia 3-MA, en acuerdo con nuestros resultados previos, se observó que la liberación de IL-1 $\beta$  fue significativamente reducida (**Figura 19A**). Sin embargo, la secreción de la pro-IL-1 $\beta$  no fue modulada (**Figura 19B**). A su vez, el tratamiento con 3-MA de células estimuladas con LPS y ATP no afectó los niveles intracelulares de ambas isoformas en relación a los observados en neutrófilos estimulados con LPS y ATP no tratados con el inhibidor (**Figura 19**).



**Figura 19.** Secreción de pro-IL-1 $\beta$  en respuesta a la estimulación con LPS+ATP e impacto de la inhibición de la autofagia. Los neutrófilos fueron pretratados o no con 3-MA, 30 minutos después fueron estimulados o no con LPS y dos horas después fueron tratados o no con ATP. A las 5 hs p.e. los sobrenadantes de cultivo y los pellets celulares fueron recuperados y las concentraciones de IL-1 $\beta$  (A) y pro-IL-1 $\beta$  (B) fueron cuantificadas en cada fracción por ELISA específicos. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. ANOVA de dos factores con post test de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  vs. basal o entre LPS+ATP tratados o no con 3-MA.

En ensayos adicionales, analizamos si la promoción de la autofagia por ayuno era capaz de inducir la secreción de la pro-IL-1 $\beta$ . Para ello, luego de estimular a los neutrófilos o no con LPS y ATP realizamos el cambio de medio por medio completo (simulacro) o por medio de ayuno (**Figura 20**). Como era de esperar, de acuerdo a nuestros resultados previos, la estimulación de la autofagia promovió la liberación de la IL-1 $\beta$  madura. No se observaron diferencias

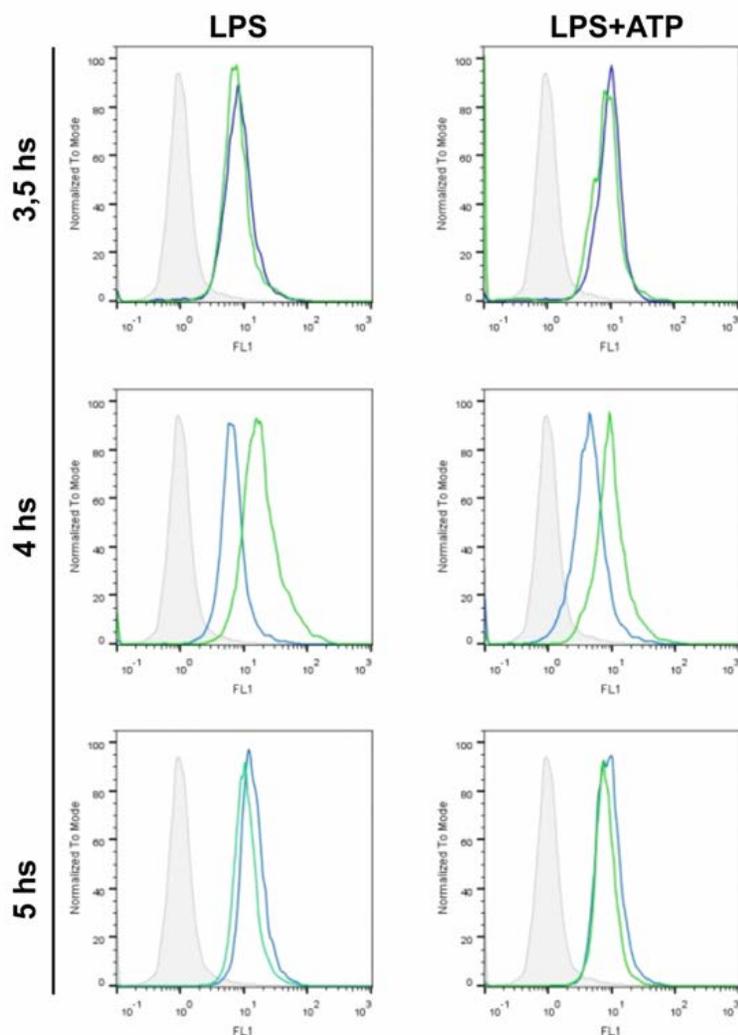
significativas en los niveles intracelulares de IL-1 $\beta$  en relación a los niveles presentes en células no sometidas a ayuno. Por otra parte, tampoco se modularon significativamente los niveles de pro-IL-1 $\beta$  extra e intracelulares. Cabe aclarar que se observó una gran dispersión entre los niveles extracelulares de la citoquina de los diferentes dadores.



**Figura 20.** Rol de la promoción de la autofagia en la secreción de IL-1 $\beta$  y la pro-IL-1 $\beta$ . Las figuras detallan las concentraciones de IL-1 $\beta$  (A) y pro-IL-1 $\beta$  (B) en sobrenadantes de cultivo (secretada) y en los pellets celulares (intracelular) de neutrófilos estimulados con LPS+ATP en los que el medio celular fue remplazado a las 4 hs por medio completo (simulacro) o con Solución de sales balanceadas de Earle (ayuno). Los datos fueron cuantificados por ELISA específicos y representan la media  $\pm$  SEM de cinco experimentos independientes realizados por duplicado. \*p < 0,05 vs. Simulacro. ANOVA de dos factores con post test de Bonferroni.

En conjunto, los resultados de las **Figuras 19** y **20** confirmaron que la estimulación de neutrófilos con LPS y ATP conduce también a la secreción de pro-IL-1 $\beta$  a las 5 hs p.e. con LPS. Estos también sugieren que la autofagia promueve la liberación de la IL-1 $\beta$  madura, pero no modula la secreción de la pro-IL-1 $\beta$ .

En los experimentos de la **Figura 19**, nos sorprendió que al contrario de lo que hubiéramos esperado, no se haya observado un aumento de los niveles de IL-1 $\beta$  intracelular en presencia de 3-MA, aun cuando la secreción de IL-1 $\beta$  se encontró inhibida. Este hallazgo fue inesperado, ya que suponíamos que la IL-1 $\beta$  se acumularía en el interior de la célula. No obstante, especulamos que la acumulación intracelular podría llevar a la degradación de la IL-1 $\beta$  por otros mecanismos y que 5 hs podría ser un tiempo demasiado prolongado para detectarla intracelularmente. Por este motivo, decidimos realizar ensayos adicionales para evaluar el impacto de la inhibición de la autofagia con 3-MA sobre la expresión intracelular de IL-1 $\beta$  a distintos tiempos p.e. con LPS. En estos ensayos la IL-1 $\beta$  intracelular fue determinada mediante inmunomarcación intracitoplasmática y citometría de flujo (**Figura 21**).



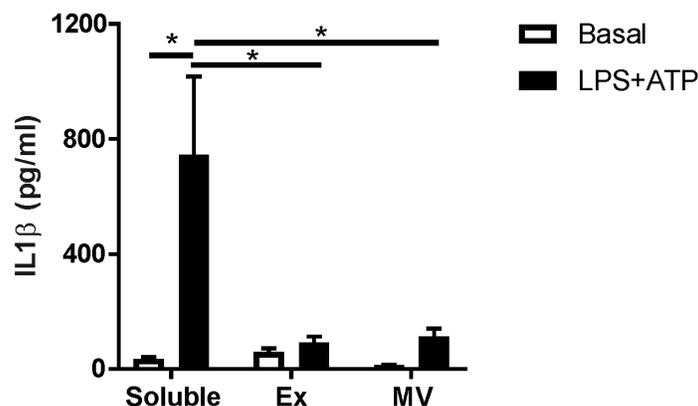
**Figura 21.** Los neutrófilos fueron estimulados con LPS o LPS+ATP en presencia o ausencia de 3-MA (5mM) agregado 30 minutos antes de la estimulación con LPS. A las 3 hs, 4 hs o 5 hs p.e. las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas con un anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  y su expresión fue cuantificada por citometría de flujo. Los histogramas son representativos de 4 experimentos independientes. Control de isotipo (Gris lleno); neutrófilos estimulados en ausencia (azul) o presencia (verde) de 3-MA.

Los resultados no mostraron diferencias en los niveles intracitoplasmáticos de IL-1 $\beta$  entre neutrófilos tratados o no con 3-MA a las 3,5 hs p.e.. Sin embargo, sí se detectó una acumulación de la misma a las 4 hs p.e. en aquellos neutrófilos tratados con 3-MA, con o sin el agregado de ATP. Este efecto fue transitorio, ya que a las 5 hs p.e. se observaron niveles similares de IL-1 $\beta$  en ausencia y presencia de 3-MA. Estos resultados son consistentes con aquellos obtenidos en las cuantificaciones realizadas por ELISA a las 5 hs p.e. (**Figura 20A**). En conjunto con las observaciones que indicaron que la 3-MA inhibe la secreción de IL-1 $\beta$  (**Figura 19A y Anexo Figura 3**), estos hallazgos sugieren que en los neutrófilos tratados con 3-MA y estimulados con LPS o LPS y ATP, se produce una acumulación de la IL-1 $\beta$  que rápidamente sufre degradación.

## ***Identificación de la forma en que la IL-1 $\beta$ es liberada al medio extracelular***

Durante el transcurso de nuestras investigaciones, Zhang y colaboradores <sup>157</sup> intentaron aportar nuevos datos sobre el mecanismo de secreción de IL-1 $\beta$ . En sus estudios, no emplearon células mieloides, sino células HEK transfectadas con los genes para pro-caspasa-1 y pro-IL-1 $\beta$ . Estos autores obtuvieron evidencia de que en su sistema la IL-1 $\beta$  es liberada por autofagia secretoria, y que la forma madura de esta citoquina es incorporada a una vesícula de simple membrana que luego va a dar origen a un autofagosoma. En este la IL-1 $\beta$  quedaría contenida entre ambas membranas. Los autores propusieron que una vez que el autofagosoma se fusiona a la membrana plasmática, la IL-1 $\beta$  sería liberada en forma soluble (**Ver Anexo Figura 5**).

Considerando estos antecedentes, analizamos la forma en la que la IL-1 $\beta$  es liberada por los neutrófilos, es decir, si en forma soluble o dentro de VE. Para ello, una vez recolectados los sobrenadantes de cultivo, procedimos a realizar centrifugaciones seriadas para aislar a las MV y los Ex contenidos en ellos, conservando el sobrenadante restante. Posteriormente, lisamos las distintas fracciones de VE y analizamos su contenido de IL-1 $\beta$  en paralelo con el contenido del sobrenadante libre de VE (soluble) (**Figura 22**).

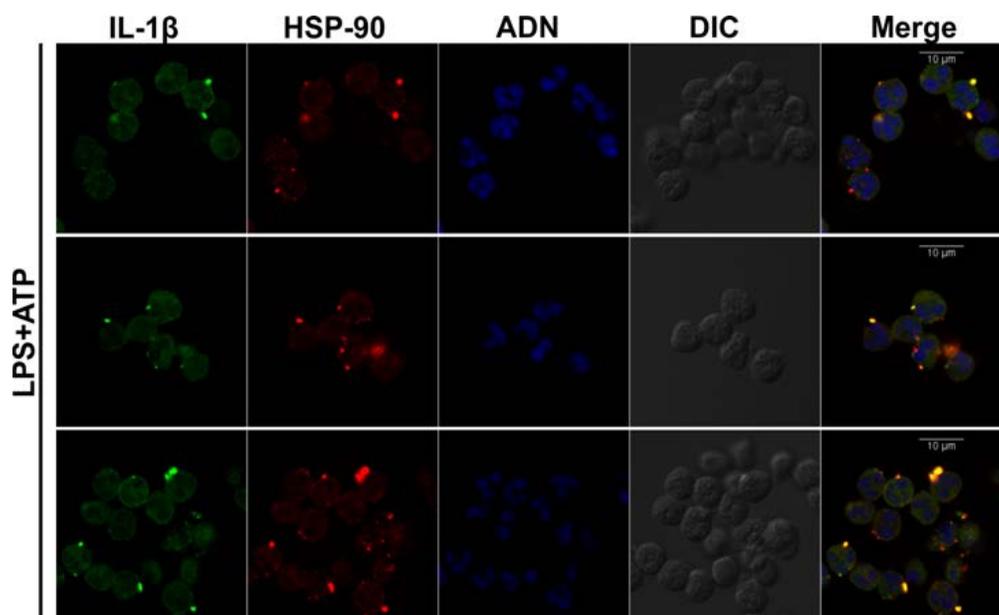


**Figura 22.** Secreción diferencial de IL-1 $\beta$  en el sobrenadante y en vesículas extracelulares. Los neutrófilos fueron estimulados o no con LPS y dos horas después tratados o no con ATP. Luego de 5 horas p.e., las células fueron centrifugadas diferencialmente para la obtención de MV y Ex, tal como se describió en materiales y métodos. El día de la cuantificación, las fracciones conteniendo MV y Ex fueron permeabilizadas con TRITON X-100 0,1% y empleadas para cuantificar por ELISA a la IL-1 $\beta$  contenida en VE, en paralelo con la presente en los sobrenadantes libres de VE (soluble). Los datos representan la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. \*p < 0,05. ANOVA de dos factores con post test de Tukey.

Como se observa en la **Figura 22** los resultados sugieren que la IL-1 $\beta$  fue liberada mayoritariamente en forma soluble, aunque una mínima proporción (<15%) de la misma fue secretada también en Ex y MV. En conjunto estos resultados serían compatibles con el modelo propuesto por Zhang y colaboradores <sup>157</sup>.

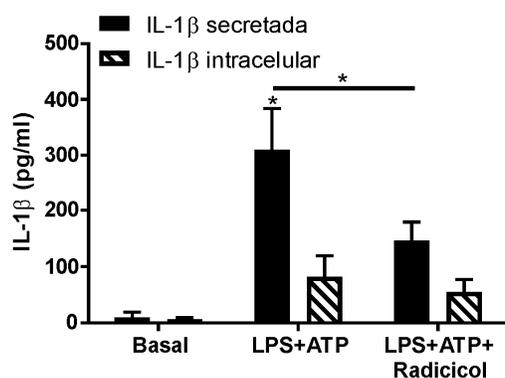
### ***Papel de la chaperona HSP-90 en el mecanismo de secreción de la IL-1 $\beta$***

Según el modelo planteado por Zhang y colaboradores <sup>157</sup>, la isoforma incorporada a la vesícula sería la IL-1 $\beta$  madura, la cual requeriría cierto grado de flexibilidad para ingresar a la misma. Sus resultados sugirieron que el proceso de translocación involucra a la chaperona HSP-90, la cual transportaría a la IL-1 $\beta$  a la membrana de la vesícula. Para determinar si este mecanismo también tiene lugar en neutrófilos humanos, realizamos experimentos para determinar si la HSP-90 está involucrada en la secreción de IL-1 $\beta$ . En primer lugar, estimulamos a los neutrófilos con LPS y ATP, y determinamos la expresión y distribución de la chaperona HSP-90 y analizamos por MLC si ésta colocalizaba con la IL-1 $\beta$  por inmunomarcación. Como se muestra en la figura (**Figura 23**), se observó un importante solapamiento de los canales correspondientes a la IL-1 $\beta$  vesicular y la HSP-90, sugiriendo que esta última podría tener rol en la secreción de IL-1 $\beta$  en los neutrófilos.



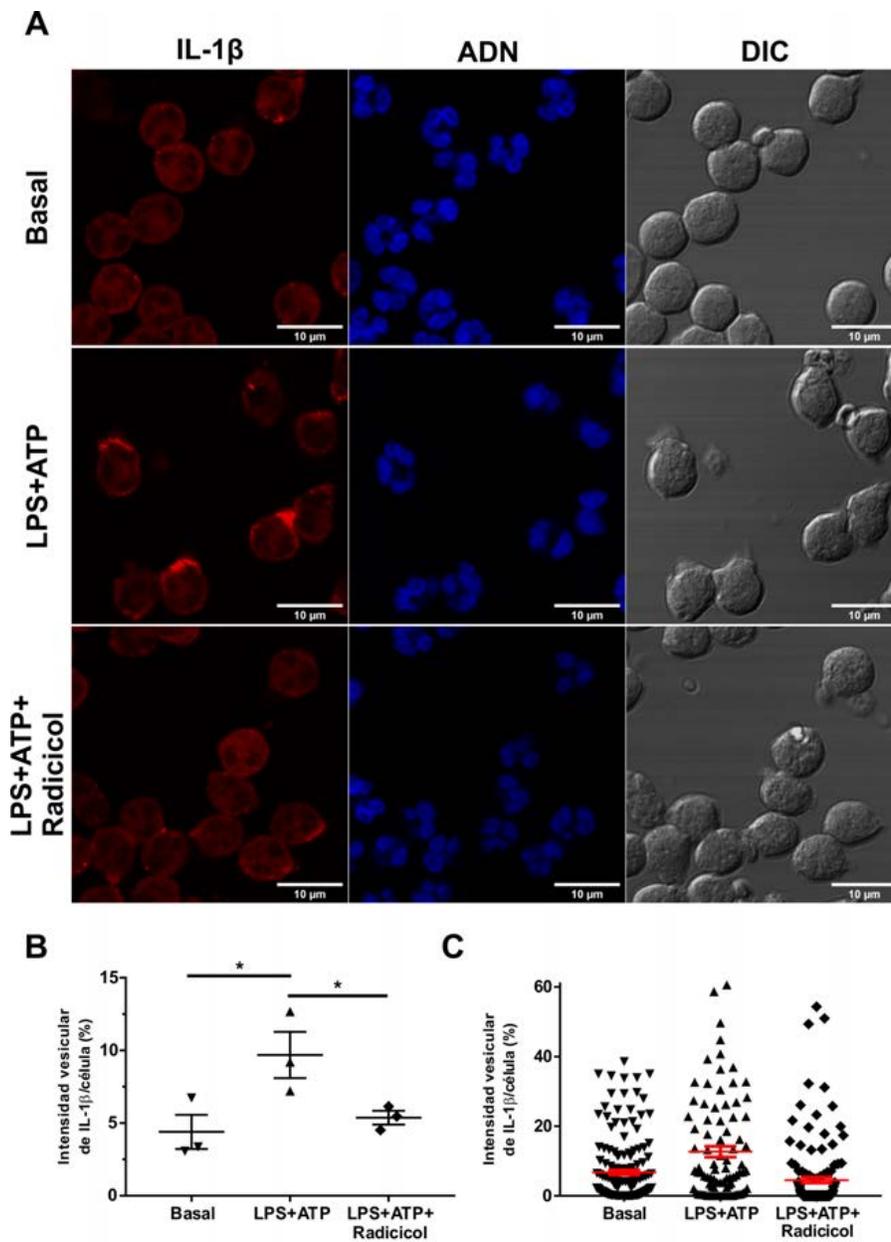
**Figura 23.** Colocalización de IL-1 $\beta$  con HSP-90. Los neutrófilos fueron estimulados con LPS+ATP y luego de 4 hs p.e. se fijaron, permeabilizaron e inmunomarcaron con anticuerpos específicos anti-IL-1 $\beta$  (verde) y anti-HSP-90 (rojo). El ADN fue marcado con TO-PRO-3 (azul). Se muestran tres campos microscópicos independientes representativos de 4 experimentos independientes.

Para conocer cuál es la implicancia de HSP-90 en el proceso de secreción de la IL-1 $\beta$ , decidimos analizar el efecto de un inhibidor de esta chaperona sobre la secreción de IL-1 $\beta$ . Para ello, empleamos radicicol, un compuesto que se une al dominio de unión a nucleótidos de la HSP-90 impidiendo su interacción con el ATP, y así inhibiendo su acción<sup>158</sup>. A tal fin, estimulamos a los neutrófilos con LPS y ATP y luego de diez minutos del agregado de este último, adicionamos el inhibidor a los cultivos. A las 5 horas p.e., colectamos los sobrenadantes y tanto en ellos como en los pellets respectivos, cuantificamos a la IL-1 $\beta$  por ELISA (**Figura 24**).



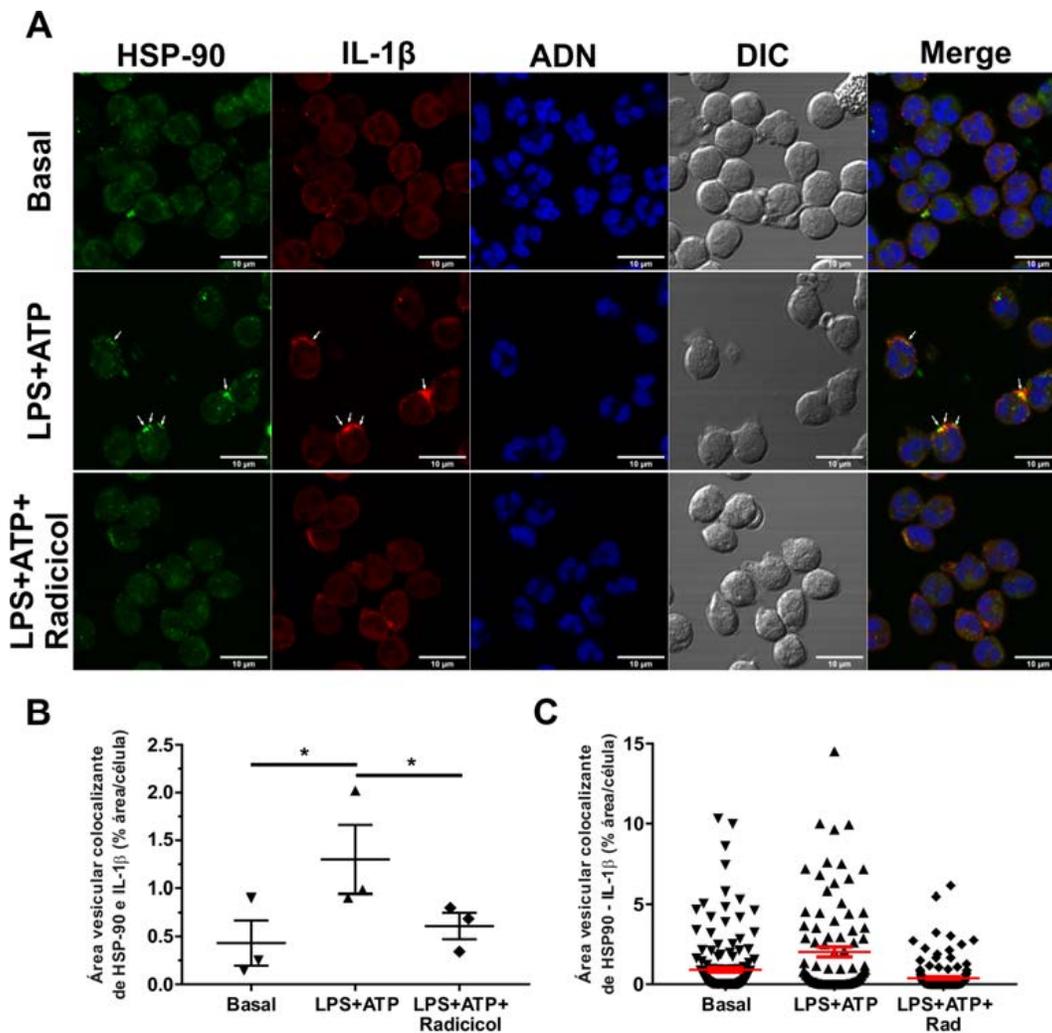
**Figura 24.** Impacto de un inhibidor de HSP-90 sobre la secreción de la IL-1 $\beta$ . Concentración de IL-1 $\beta$  a las 5 hs p.e. en los sobrenadantes de cultivo y en los pellets de neutrófilos estimulados o no con LPS+ATP en ausencia o presencia de Radicol (1 $\mu$ M) agregado 10 minutos después de la estimulación con ATP. Los datos fueron cuantificados por ELISA y representan la media  $\pm$  SEM de 5 experimentos independientes realizados por duplicado. \*  $p < 0,05$  vs. su respectivo basal o entre LPS+ATP tratado o no con Radicol. ANOVA de dos factores con post test de Bonferroni.

Los resultados obtenidos indicaron que el radicicol inhibe la secreción de IL-1 $\beta$ . De modo similar a lo observado con otros compuestos que inhiben la secreción, no observó una acumulación de la IL-1 $\beta$  a las 5 hs. p.e., sugiriendo que si la IL-1 $\beta$  no es secretada, es rápidamente degradada. Teniendo en cuenta la selectividad de este inhibidor por HSP-90, nuestros hallazgos sugieren que esta chaperona está involucrada en el proceso de autofagia secretoria que conduce a la IL-1 $\beta$  a ser liberada. Por ello, realizamos ensayos adicionales para dilucidar si HSP-90 podría estar implicada en la incorporación de la IL-1 $\beta$  a las vesículas. Nosotros pensamos que, de ser así, el tratamiento con radicicol debería reducir la cantidad de IL-1 $\beta$  encontrada en vesículas. Por este motivo, estimulamos a los neutrófilos de la misma manera que se indicó para la **Figura 24**, a excepción de que finalizamos el experimento a las 4 horas p.e., momento en que procedimos a su fijación y permeabilización para su posterior inmunomarcación (**Figura 25**). La cuantificación de las imágenes adquiridas por MLC de tres experimentos independientes mostró una reducción del porcentaje de IL-1 $\beta$  vesicular en presencia de radicicol.



**Figura 25.** Análisis de la distribución intracelular de IL-1 $\beta$  en células tratadas o no con radical. (A) Los neutrófilos fueron estimulados o no con LPS+ATP, a las 2:10 p.e. se agregó o no radical (1  $\mu$ M) al cultivo y a las 4 hs p.e. se fijaron, permeabilizaron e inmunomarcaron con anticuerpos específicos anti-IL-1 $\beta$  (B) Cuantificación de la intensidad de IL-1 $\beta$  vesicular por célula. Cada valor del gráfico muestra el promedio de las intensidades de IL-1 $\beta$  vesicular por célula de cada experimento independiente, en los cuales se analizaron en cada uno al menos 80 células por dador. Las barras negras representan media  $\pm$  SEM de dichos datos. (C) Gráfico de puntos de uno de los experimentos representados en (B). Las barras rojas representan la media  $\pm$  SEM de los datos de ese experimento. \*  $p < 0,05$ , Modelo lineal generalizado (GLZ) con ANOVA. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

Para confirmar que la función chaperona de HSP-90 es requerida para la translocación de IL-1 $\beta$  a las vesículas, analizamos la colocalización de IL-1 $\beta$  y HSP-90 en las imágenes tomadas por MLC de neutrófilos tratados o no con radical (**Figura 26**).



**Figura 26.** Efecto del radicicol sobre la distribución intracelular de IL-1 $\beta$  y HSP-90. (A) Los neutrófilos fueron estimulados o no con LPS+ATP. A las 2:10 p.e. se agregó o no radicicol (1  $\mu$ M) al cultivo. A las 4 horas p.e. las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas con anticuerpos específicos anti-HSP-90 (verde), anti-IL-1 $\beta$  (rojo) y el ADN se marcó con TO-PRO-3 (azul). Las imágenes se adquirieron por MLC. Las flechas blancas indican ejemplos de compartimentos en los que se detectó colocalización de IL-1 $\beta$  y HSP-90. (B) Cuantificación de las áreas vesiculares en las que HSP-90 e IL-1 $\beta$  colocalizaron por célula. Cada valor del gráfico muestra el promedio de las áreas colocalizantes por célula de cada experimento independiente, en cada uno de los cuales al menos 80 células fueron analizadas. Las barras negras representan la media  $\pm$  SEM de dichos datos. (C) Gráfico de puntos de uno de los experimentos representados en (B). Las barras rojas representan la media  $\pm$  SEM de los datos de ese experimento. \*  $p < 0,05$ , Modelo lineal generalizado (GLZ) con ANOVA. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

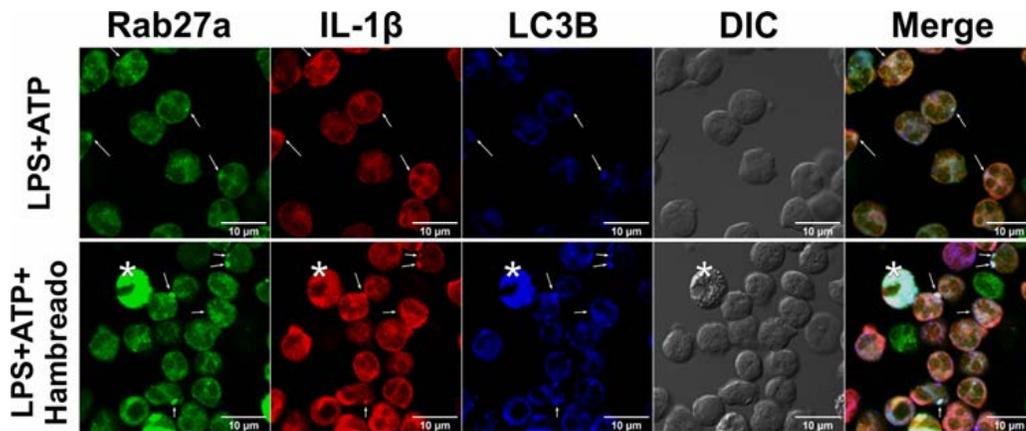
A partir de la cuantificación de las imágenes de tres dadores independientes, determinamos que cuando los neutrófilos fueron estimulados con LPS y ATP, el tratamiento con radicicol redujo el porcentaje de IL-1 $\beta$  vesicular (**Figura 25**) y el grado en que la IL-1 $\beta$  y HSP-90 colocalizaban

(Figura 26). Estos resultados, conjuntamente con el hecho que el radicicol inhibe la secreción de IL-1 $\beta$  detectada por el ELISA a las 5 horas p.e. (Figura 24), sugieren que la chaperona HSP-90 contribuye a la translocación de IL-1 $\beta$  a un compartimiento vesicular.

### ***Presencia de la GTPasa pequeña Rab27a en las vesículas que contienen IL-1 $\beta$***

Los neutrófilos son células singulares, en cuanto a que poseen una variedad de proteínas dentro de vesículas, que deben ser movilizadas diferencialmente para ejercer sus funciones adecuadamente. Es conocido que el tráfico vesicular es regulado por miembros de la familia Rab de GTPasas pequeñas que controlan la identidad de membrana a la cual una vesícula debe fusionarse y actúan reclutando moléculas efectoras, factores de adhesión y las llamadas proteínas SNARE, responsables de la especificidad de las reacciones de fusión de membranas<sup>159</sup>. Estudios previos determinaron que la maquinaria secretoria de una vesícula del neutrófilo define el destino de esa organela en particular, independientemente del contenido de su carga. Por ello, dos gránulos con carga idéntica podrían ser funcionalmente diferentes basados, por ejemplo, en las GTPasas-Rab asociadas con sus membranas<sup>160</sup>.

Dado que la molécula Rab27a está presente en distintos gránulos movilizables de los neutrófilos y se encuentra involucrada en su exocitosis, y que estudios previos demostraron que sólo los gránulos azurófilos que contienen Rab27a pueden ser excitados<sup>159,160</sup>, quisimos comprobar si esta molécula está presente en autofagosomas que contienen IL-1 $\beta$ . Con este fin estimulamos a los neutrófilos con LPS y ATP y luego los sometimos o no a ayuno con el fin de potenciar la colocalización de IL-1 $\beta$  y LC3B y así favorecer la detección de Rab27 en vesículas mediante MLC (Figura 27).



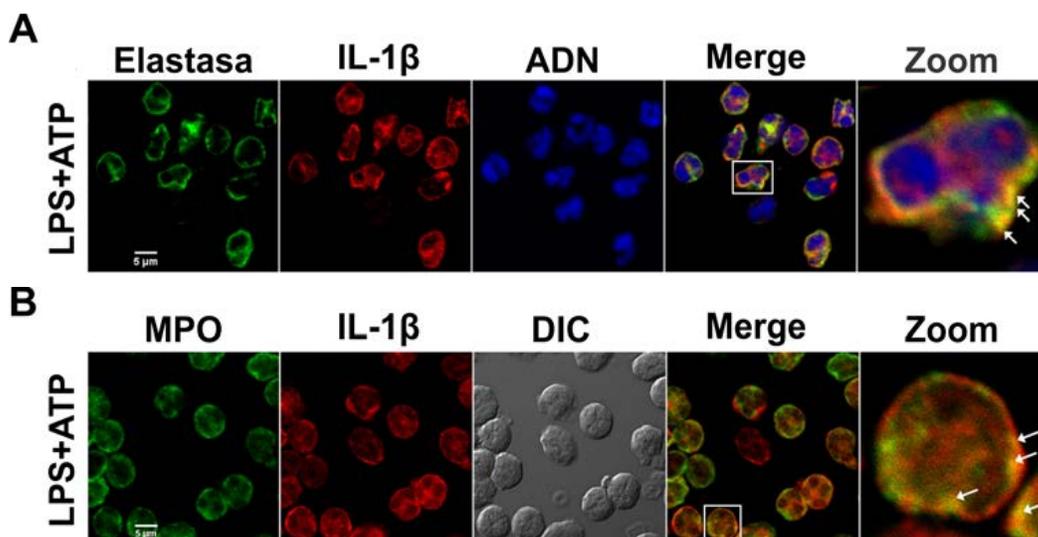
**Figura 27.** Distribución intracelular de IL-1 $\beta$ , LC3B y Rab27a. Los neutrófilos fueron estimulados con LPS y dos horas más tarde tratados con ATP. A las 3:15 hs las células fueron sometidas o no a ayuno y a las 3:45 hs. fueron fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas con anticuerpos anti-Rab27a (verde), anti-IL-1 $\beta$  (rojo) y anti-LC3B (Azul). Las flechas blancas indican puntos de colocalización entre Rab27a, IL-1 $\beta$  y LC3B. El \* corresponde a un eosinófilo. Las imágenes se adquirieron por MLC y son representativas de experimentos con 2 dadores independientes.

Las imágenes mostraron solapamiento de la fluorescencia en los tres canales en áreas vesiculares, indicando colocalización de las tres proteínas en un mismo compartimento. Además, se observó una intensa colocalización de IL-1 $\beta$  con Rab27a. Estos resultados apoyan la idea de que las vesículas que contienen IL-1 $\beta$  son organelas movilizables capaces de fusionarse con la membrana plasmática para la consecuente liberación de su contenido.

### ***Papel de las serinproteasas neutrofílicas en la secreción de la IL-1 $\beta$***

Los neutrófilos tienen cuatro tipos de gránulos secretorios: azurófilos, específicos, de gelatinasa y vesículas secretorias, y como mínimo otros dos tipos de organelas movilizables, los CMV/endosomas tardíos y endosomas en reciclaje<sup>159</sup>. Estudios previos reportaron que los autofagosomas pueden fusionarse con endosomas formando estructuras llamadas anfisomas<sup>161</sup>. Otros reportes mostraron que los gránulos pueden fusionarse entre sí en el citosol antes de hacerlo con la membrana plasmática para su secreción<sup>85</sup>. Además, las organelas movilizables sufren movimientos azarosos altamente dinámicos que incrementan la probabilidad de interacciones entre la maquinaria de tráfico vesicular, proteínas motoras y vesículas fusionables<sup>159</sup>. Es por esto que nosotros pensamos que los autofagosomas podrían fusionarse con los gránulos azurófilos. Estos gránulos contienen, entre otros componentes, poderosas serinproteasas como la elastasa, la PR3 y la catepsina G. Mediante estudios *in silico* realizados por nuestro grupo (**Anexo Figura 6**), se comprobó que tanto la forma inmadura como la madura de la IL-1 $\beta$  presentan múltiples sitios de corte potenciales para estas serinproteasas. Tomando en cuenta que en nuestros ensayos previos<sup>91</sup> observamos que el Elafin, un inhibidor de elastasa

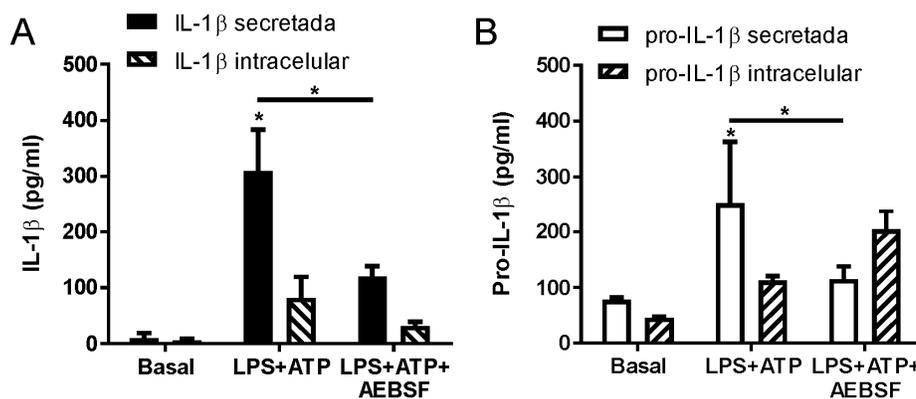
y PR3 disminuía parcialmente los niveles de secreción de IL-1 $\beta$  inducidos por LPS y ATP, especulamos que para ejercer estos efectos, las serinproteasas deberían coincidir, al menos parcialmente, con la IL-1 $\beta$  en un compartimento vesicular. Entonces, de ser así, algunos gránulos azurófilos deberían colocalizar con vesículas conteniendo IL-1 $\beta$ . Para evaluar esta posibilidad analizamos mediante MLC si la IL-1 $\beta$  colocalizaba con elastasa y con MPO, un marcador de gránulos azurófilos. Como muestra la **Figura 28**, a las 3,5 hs p.e se evidenciaron áreas vesiculares colocalizantes (flechas blancas) de IL-1 $\beta$  con elastasa (**Figura 28A**) y con MPO (**Figura 28B**) luego de la estimulación de los neutrófilos con LPS y ATP.



**Figura 28.** Distribución intracelular de proteínas de gránulos azurófilos y de la IL-1 $\beta$ . Los neutrófilos fueron estimulados con LPS y 2 hs después tratados con ATP. A las 3,5 hs p.e. las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas con los anticuerpos específicos para las proteínas indicadas: (A) Elastasa (verde) y (B) la MPO (verde), IL-1 $\beta$  (rojo). El ADN fue marcado con TO-PRO-3 (azul). Las imágenes fueron adquiridas por MLC. Las flechas blancas indican ejemplos de compartimentos donde IL- $\beta$  colocaliza con la elastasa o la MPO. Con recuadros blancos se indican las células que fueron ampliadas (zoom). Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes.

Como determinamos previamente en esta tesis (**Figuras 19 y 20**) sólo la secreción de la forma madura de la IL-1 $\beta$  está mediada por autofagia, por lo que únicamente dicha isoforma sería incorporada a autofagosomas. De acuerdo al análisis realizado previamente en nuestro laboratorio con el software público PROSPER, la secuencia madura de la IL-1 $\beta$  (aminoácidos 116-269) contiene múltiples sitios potenciales de clivaje para las serinproteasas (5 para la elastasa y 6 para la Catepsina G) (**Anexo Figura 6**). Esto sugiere que la fusión entre autofagosomas y los gránulos azurófilos podría tener como consecuencia, dependiendo del estado de activación de las serinproteasas, la degradación de la IL-1 $\beta$ . Con el fin de poner a prueba esta posibilidad, determinamos los efectos del inhibidor de serinproteasas AEBSF sobre los niveles de la IL-1 $\beta$

madura (**Figura 29A**) y de la proforma (**Figura 29B**), tanto de la proteína secretada como del remanente intracelular. Este compuesto inhibió significativamente la secreción de la IL-1 $\beta$  y de la pro-IL-1 $\beta$  inducidas por LPS y ATP. Sin embargo, no moduló los niveles intracelulares de la IL-1 $\beta$  ni de la pro-IL-1 $\beta$ , aunque se evidenció una tendencia a la acumulación de esta última.



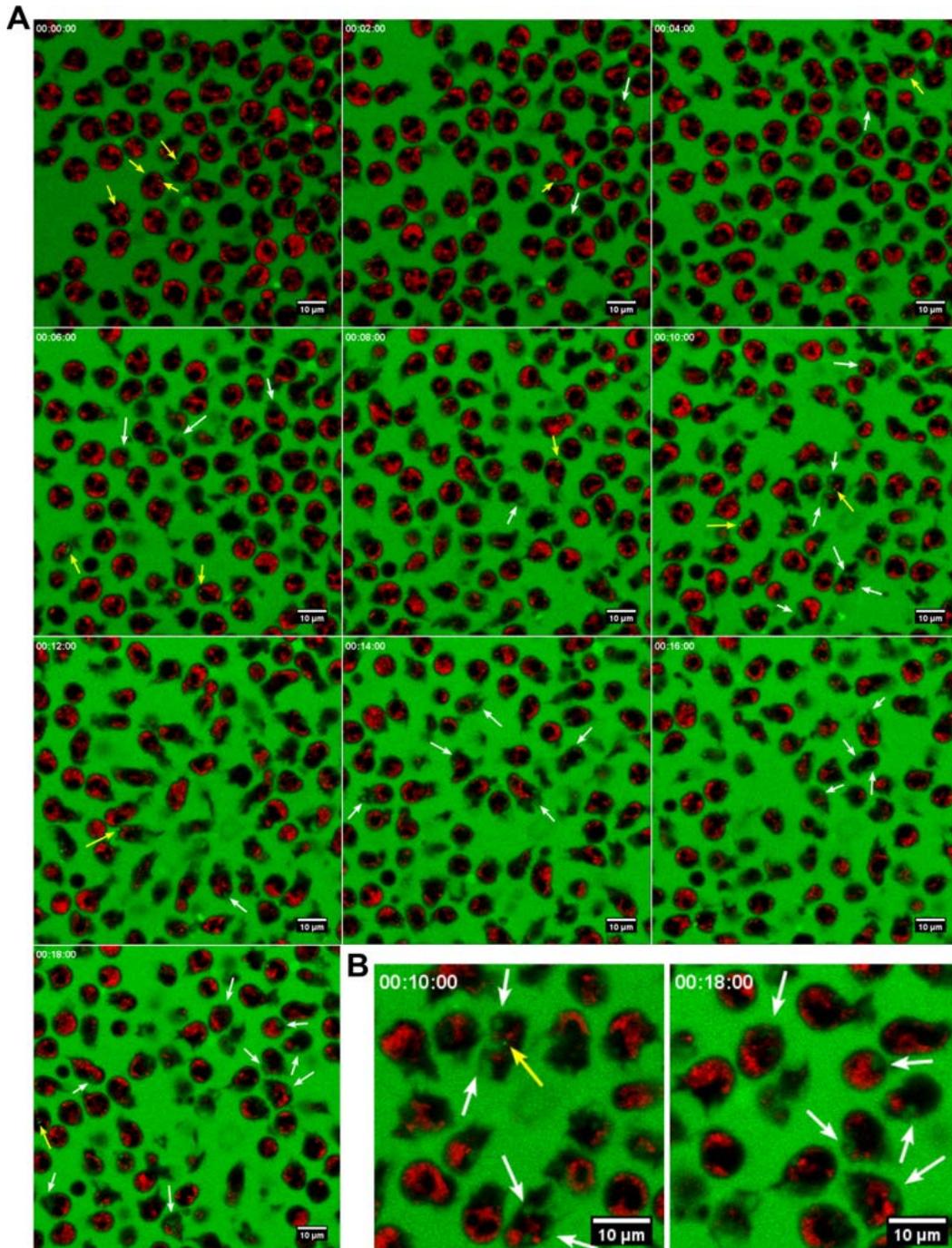
**Figura 29.** Rol de las serinproteasas en la secreción de la IL-1 $\beta$  y de la pro-IL-1 $\beta$ . Concentración de (A) IL-1 $\beta$  y (B) pro-IL-1 $\beta$ , en sobrenadantes de cultivo y en los pellets celulares de neutrófilos estimulados o no por 5 hs con LPS+ATP, en ausencia o presencia de AEBSF (1 mM) agregado 1 hora después de la estimulación con LPS. Las concentraciones fueron cuantificadas por ELISA específicos y representan la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes realizados por duplicado. ANOVA de dos factores con post test de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  vs. su respectivo basal, o entre LPS+ATP tratado o no con AEBSF.

Como señalamos, nosotros especulábamos que la inhibición de las serinproteasas impediría la degradación de la IL-1 $\beta$  madura presente en las vesículas híbridas producto de la fusión de autofagosomas con gránulos azurófilos, lo que ocasionaría un incremento en los niveles de IL-1 $\beta$  intracelulares. Sin embargo, el comprobar que esto no ocurrió y detectar una tendencia, aunque no significativa, a un aumento de los niveles de pro-IL-1 $\beta$  como consecuencia del tratamiento con el AEBSF, nos condujo a cuestionarnos la hipótesis original y proponernos un nuevo modelo que pudiese explicar esos hallazgos.

Los resultados obtenidos podrían ser compatibles con la posibilidad de que las serinproteasas también contribuyeran al procesamiento de la pro-IL-1 $\beta$ . Sin embargo, dado que, de acuerdo a nuestros datos previos sólo la IL-1 $\beta$  madura es incorporada a los autofagosomas, para que esta última posibilidad fuese factible, las serinproteasas deberían salir de los gránulos azurófilos y localizarse en el citoplasma. Estudios previos de otros grupos comprobaron que este evento tiene lugar durante el proceso de NETosis. En células en reposo, una porción de los gránulos azurófilos contiene en sus membranas un complejo proteico llamado “azurossoma” que entre otras proteínas incluye a la elastasa y la catépsina G. La estimulación de los neutrófilos con agonistas de NETosis induce la liberación de estas serinproteasas al citoplasma. Allí, la elastasa

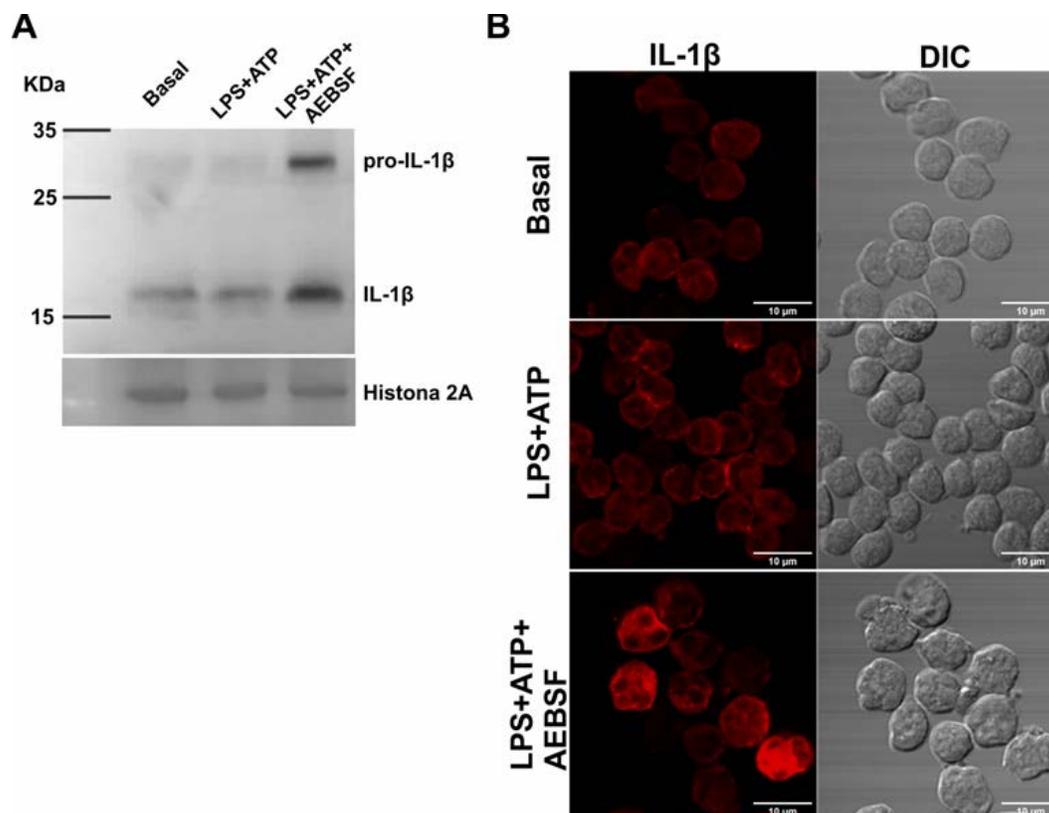
se une y es capaz de clivar a la actina, controlando la dinámica del citoesqueleto <sup>162</sup>, hecho que permite su translocación al núcleo, donde degrada parcialmente histonas específicas, promoviendo la descondensación de la cromatina <sup>162,163</sup>. Entonces, nosotros especulamos que, si el mismo proceso sucediera luego de la estimulación de los neutrófilos con LPS y ATP, la elastasa podría contribuir al procesamiento de la pro-IL-1 $\beta$  y alternativamente a la degradación de la IL-1 $\beta$  en el citoplasma.

Para determinar si la elastasa podía ser liberada al citoplasma luego de la estimulación con LPS y ATP, realizamos ensayos preliminares por MLC en tiempo real empleando la sonda fluorescente FLISP-FAM-Leu-CMK, específica para serinproteasas activas, en conjunto con Lyotracker rojo para marcar los gránulos ácidos, en los cuales las serinproteasas como la elastasa, al ser proteasas neutras probablemente estén inactivas (**Figura 30**). Luego de la estimulación de los neutrófilos con LPS y ATP, encontramos algunos focos de serinproteasas activas en compartimentos vesiculares no ácidos (**Figura 30**, flechas amarillas). Sin embargo, conforme avanzó el tiempo p.e. pudimos detectar serinproteasas activas con un patrón difuso en el citoplasma, lo que estaría en acuerdo con la posibilidad de que estas enzimas hubiesen abandonado los gránulos (**Figura 30**, flechas blancas). De ser así, las mismas tendrían capacidad de procesar a la pro-IL-1 $\beta$  y de degradar a la isoforma madura en el citoplasma. Nosotros interpretamos los hallazgos en presencia de AEBSF (**Figura 29**) como una consecuencia de efectos contrapuestos de las serinproteasas, por un lado, contribuyendo al procesamiento de la pro-IL-1 $\beta$  para generar IL-1 $\beta$  madura en citoplasma, y al mismo tiempo mediando la degradación de una parte de la IL-1 $\beta$  en el citoplasma y/o dentro de las vesículas.



**Figura 30.** Visualización de serinproteasas activas. Los neutrófilos fueron sembrados en cámaras de cultivo (*Cellview glass bottom dishes*) tratadas previamente con poly-L-lisina (0,01%), y luego fueron observadas al MLC para su observación en tiempo real en una cámara con atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Los mismos fueron tratados con LPS (1 μg/ml) y ATP (2,5 mM) y luego se le agregó al cultivo las sondas FAM-FLISP-FLCK (verde) y LysoTracker (rojo). (A) Se tomaron 10 imágenes con un intervalo de 2 minutos entre ellas. (B) Se muestran acercamientos de dos de las imágenes tomadas en (A). Las flechas amarillas indican vesículas con serinproteasas activas, y las flechas blancas señalan sectores donde se observan serinproteasas activas con un patrón difuso en el citoplasma. El ensayo es representativo de dos realizados.

En favor de este razonamiento, en estudios preliminares, el tratamiento con AEBSF de neutrófilos estimulados con LPS y ATP mostraron un aumento en los niveles intracelulares de pro-IL-1 $\beta$  y de IL-1 $\beta$  a 3,5 hs p.e. por Western Blot y una acumulación de IL-1 $\beta$  con una distribución mayoritariamente citoplasmática en imágenes de MLC (**Figura 31**). Cabe recordar que aún en presencia de AEBSF la caspasa-1 se encuentra activa, siendo capaz de procesar parte de la pro-IL-1 $\beta$ .



**Figura 31.** Efecto del AEBSF sobre la distribución intracelular de IL-1 $\beta$ . (A) Western Blot de neutrófilos estimulados o no por 3,5 hs con LPS+ATP en ausencia o presencia de AEBSF (1 mM) (n=1). La histona 2A se utilizó como control de carga. (B) Los neutrófilos fueron estimulados o no con LPS +ATP en ausencia o presencia de AEBSF (1 mM). A las 4 horas p.e. con LPS las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas con anticuerpos específicos anti-IL-1 $\beta$  (rojo) (n=2). Las imágenes se adquirieron por MLC.

### ***Papel de la Gasdermina D (GSDMD) en la secreción de IL-1 $\beta$***

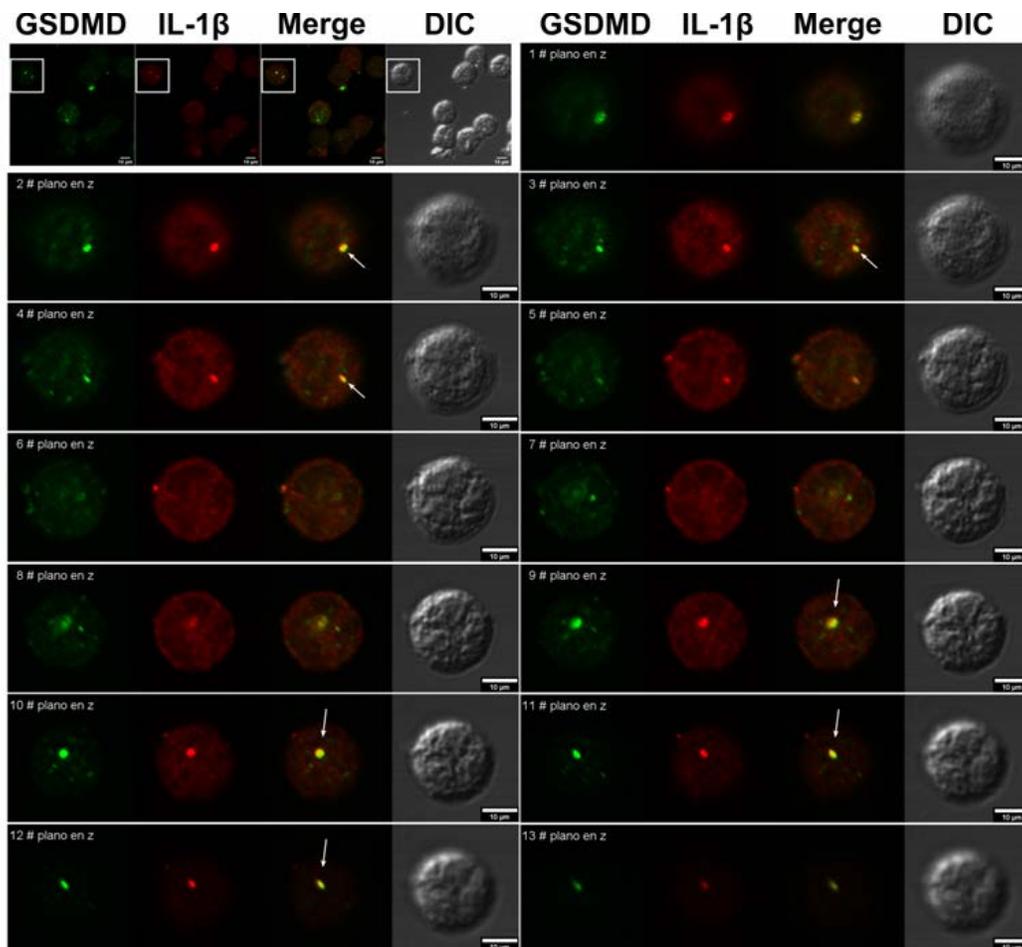
Nuestros estudios sustentan que la chaperona HSP-90 contribuye a la incorporación de la IL-1 $\beta$  madura a una vesícula. La misma podría ser un autofagosoma o una vesícula que luego dará origen al mismo, tal como propusieron Zhang y colaboradores<sup>157</sup>. En este sentido, merece señalarse, que tal como se muestra en la **Figura 11** a las 3,5 hs p.e., no toda la IL-1 $\beta$  vesicular colocalizó con LC3B.

Independientemente de la naturaleza de la vesícula a la cual la IL-1 $\beta$  es incorporada, todavía se desconoce cuál es la molécula que es capaz de mediar la translocación de la IL-1 $\beta$  a su interior.

En los últimos años se propuso que la proteína citoplasmática GSDMD está involucrada en la secreción de IL-1 $\beta$  en macrófagos <sup>164</sup>. Según estos estudios, un producto del clivaje de esta molécula se polimeriza en la membrana plasmática formando un poro que permite el pasaje de la citoquina<sup>165,166</sup> y es responsable de un proceso de muerte celular programada llamado piroptosis <sup>167</sup>. La GSDMD es sustrato de las caspasas 1, 4 y 5, y su clivaje posibilita que su fragmento NT-GSDMD se asocie a la membrana plasmática, se polimerice y la desestabilice. Dado que los fosfolípidos a los que se asocia NT-GSDMD en la cara interna de la membrana plasmática son similares en composición a aquellos presentes en la cara externa de los endosomas o fagosomas <sup>114</sup>, nosotros hipotetizamos que la NT-GSDMD podría ser la responsable de formar un poro en la membrana de la vesícula posibilitando la entrada de IL-1 $\beta$  a las mismas. De ser así, la GSDMD debería coincidir en la misma vesícula que contiene IL-1 $\beta$  en tiempos previos a su secreción.

Para poner a prueba nuestro planteo, en primer lugar, realizamos ensayos estimulando a los neutrófilos con LPS y ATP, y luego de 4 horas p.e. con LPS los fijamos, permeabilizamos e inmunomarcamos con anticuerpos específicos anti-GSDMD y anti-IL-1 $\beta$  y los observamos por MLC (**Figura 32**).

Como puede observarse en la **Figura 32** (panel superior izquierdo) la GSDMD se encontró colocalizando con la IL-1 $\beta$ . Además, al analizar la continuidad de múltiples imágenes tomadas en un mismo plano z (*z stack*), como se observa en los paneles que muestran una célula individual en la **Figura 32**, fue posible determinar en algunas células, que esas vesículas no se encontraban próximas a la membrana plasmática. Esta observación descarta que la GSDMD detectada correspondiera a aquella polimerizada sobre la misma, y aporta evidencia de que la GSDMD podría estar formando un poro en las vesículas permitiendo a la IL-1 $\beta$  ingresar a las mismas.

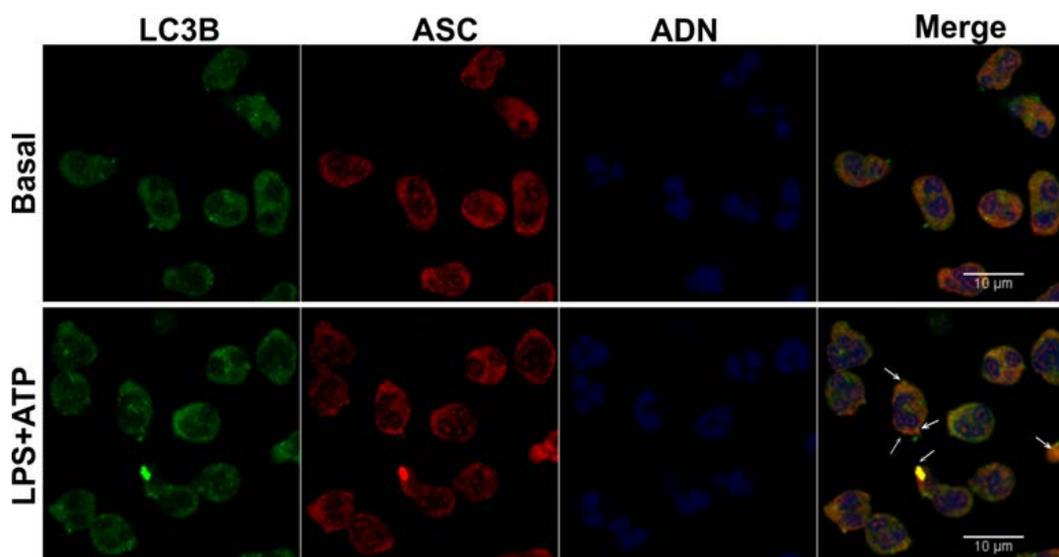


**Figura 32.** Distribución intracelular de Gasdermina-D e IL-1 $\beta$ . Los neutrófilos fueron estimulados con LPS+ATP. A las 4 horas p.e. con LPS las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas con anticuerpos específicos anti-GSDMD (verde) y anti-IL-1 $\beta$  (rojo). (Panel superior izquierdo) La imagen corresponde la proyección en z de un campo celular del cual se hicieron capturas a lo largo del plano z (*z stack*). (Panel derecho e imágenes restantes). En las sucesivas imágenes se muestran 13 planos, tomados cada 0,5  $\mu\text{m}$ , para la célula marcada con el cuadrado blanco en la imagen superior izquierda. Las flechas blancas señalan puntos de colocalización entre IL-1 $\beta$  y GSDMD. Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes.

## Destino de componentes del inflamasoma

Como se mencionó en la introducción, en estudios previos, nuestro grupo demostró que el procesamiento de la pro-IL-1 $\beta$  a su forma madura en los neutrófilos también involucra la actividad de la enzima caspasa-1<sup>91</sup>. Para que esta enzima adquiriera su forma biológicamente activa se precisa la activación de receptores tipo NOD y la formación del inflamasoma, dentro del cual la pro-caspasa-1 es clivada y activada. En particular, el receptor de tipo NOD que es activado en respuesta al ATP, es el receptor NLRP3, que se asocia a la molécula adaptadora ASC y recluta a la pro-caspasa-1 formando un inflamasoma funcional. Dentro de este inflamasoma, la pro-IL-1 $\beta$  es procesada y adquiere su conformación activa.

Los hallazgos de esta tesis sugieren que sólo la IL-1 $\beta$  madura es incorporada a un compartimiento autofágico. De este modo, la pro-IL-1 $\beta$  sería procesada con anterioridad a su acceso a la vesícula de modo similar a lo propuesto por Zhang y colaboradores<sup>157</sup>. Con el fin de determinar si tal como ocurre en otros tipos celulares<sup>72</sup>, en nuestro sistema la autofagia controla el destino de los inflamasomas, realizamos experimentos adicionales en los que analizamos la colocalización del componente del inflamasoma ASC con LC3B (**Figura 33**).

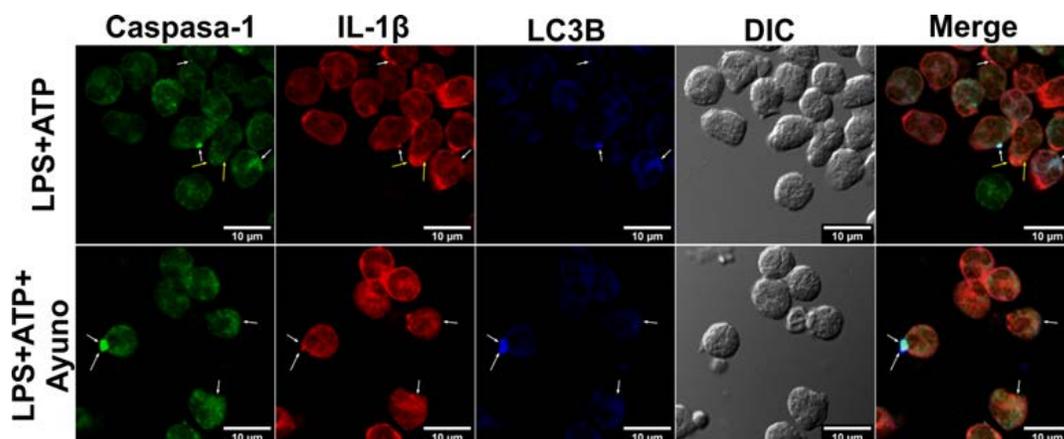


**Figura 33.** Presencia del componente del inflamasoma ASC en autofagosomas. Los neutrófilos fueron estimulados o no con LPS y dos horas después fueron tratados o no con ATP. A 4 hs p.e. con LPS las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas con anticuerpos específicos anti-LC3B (verde) y anti-ASC (rojo). El ADN fue marcado con TO-PRO-3 (azul). Las flechas blancas indican puntos de colocalización de LC3B y Asc. Las imágenes fueron adquiridas por MLC y son representativas de 4 experimentos independientes.

En la **Figura 33** puede observarse que en los neutrófilos que no fueron estimulados (Basal) no se encontró solapamiento de estos dos componentes, mientras que los estimulados con LPS

y ATP se identificaron áreas en las cuales ambas fluorescencias coincidieron (**Figura 33**, flechas blancas).

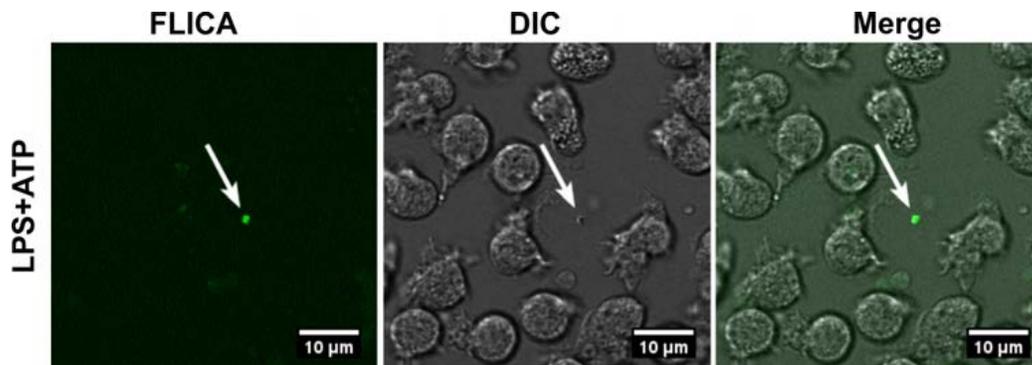
En ensayos adicionales analizamos si la caspasa-1 también se aloja en autofagosomas, tanto en neutrófilos estimulados con LPS y ATP, como en aquellos sometidos a ayuno (**Figura 34**). Las imágenes mostraron vesículas en las que la caspasa-1 colocalizó con LC3B (color cian). Sorprendentemente, también se identificaron puntos dónde sólo la fluorescencia de la caspasa-1 y la IL-1 $\beta$  se solapaban (**Figura 34**, flechas amarillas), que podrían corresponder a inflamasomas activos procesando a la IL-1 $\beta$  en el citoplasma. Sin embargo, en algunos casos, se encontraron puntos donde colocalizaban las tres marcas, cuyo tamaño fue mayor en condiciones de ayuno (**Figura 34**, flechas blancas). Esto sugiere que algunos autofagosomas contienen tanto IL-1 $\beta$  como caspasa-1. Resulta difícil pensar que un inflamasoma pudiese atravesar un poro en la membrana autofagosomal. La opción más presumible es que los inflamasomas sean capturados por un mecanismo de la macroautofagia al lumen de autofagosomas, algunos de los cuales podrían contener IL-1 $\beta$  en el espacio entre sus dobles membranas.



**Figura 34.** Localización intracelular de la caspasa-1 luego de la estimulación de los neutrófilos con LPS+ATP o LPS+ATP+Ayuno. Los neutrófilos fueron estimulados por 2 hs con LPS y luego tratados o no con ATP. A las 3,15 hs p.e., el medio celular fue remplazado por medio completo o con Solución de sales balanceadas de Earle (ayuno) y cultivados por media hora adicional. A las 3:45 p.e las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas con anticuerpos anti-caspasa-1 (verde), anti-IL-1 $\beta$  (rojo) y anti-LC3B (Azul). Las flechas amarillas indican puntos de colocalización de Caspasa-1 e IL-1 $\beta$ . Las flechas blancas indican puntos de colocalización entre caspasa-1, IL-1 $\beta$  y LC3B. Las imágenes se tomaron por MLC y son representativas de experimentos con 4 dadores independientes.

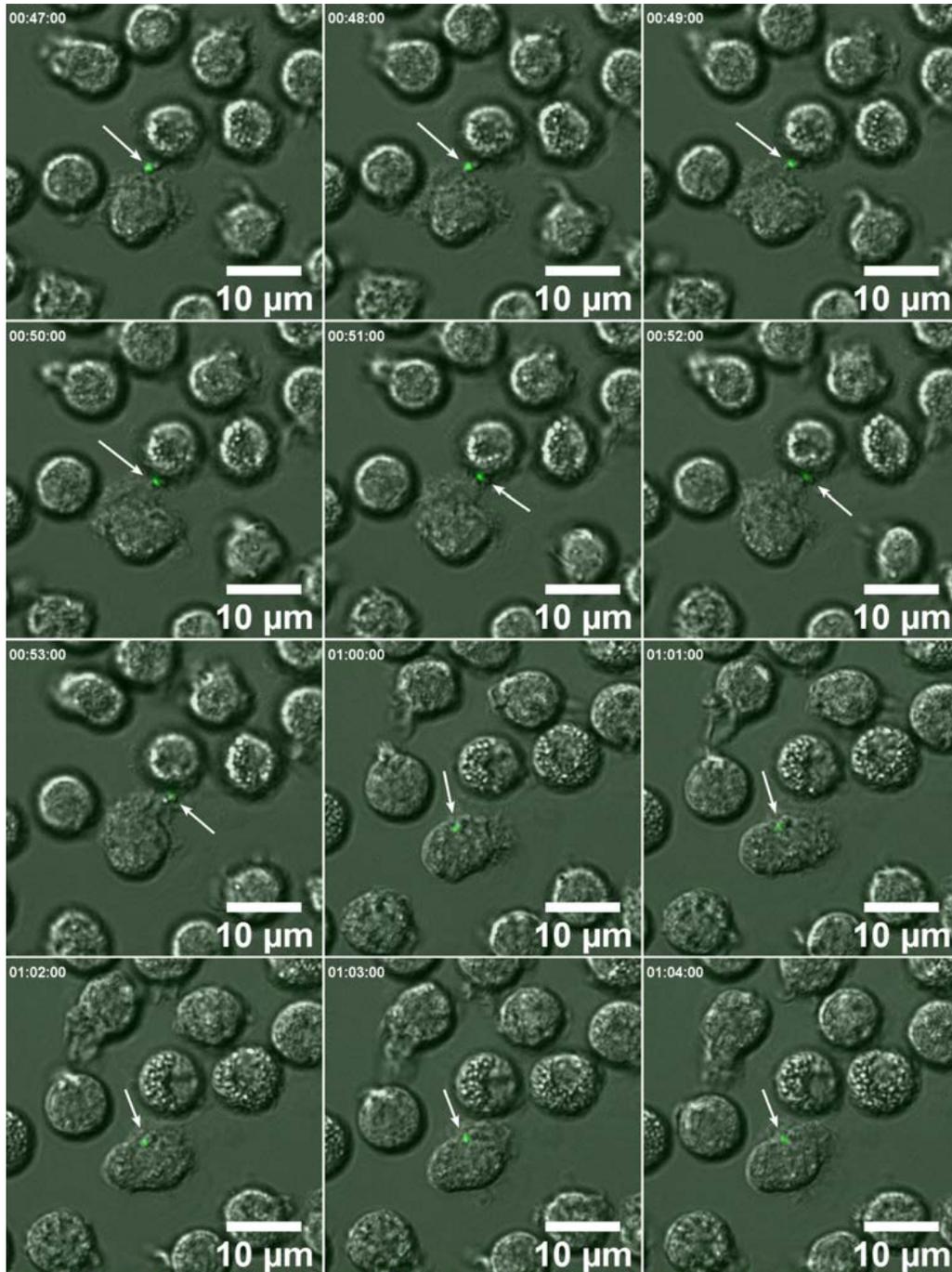
En conjunto, estos hallazgos sugieren que los inflamasomas, o al menos dos de sus componentes esenciales, son dirigidos a compartimentos autofágicos, algunos de los cuales pueden contener IL-1 $\beta$ . Sin embargo, con esta información no es posible determinar si su destino final será la secreción o la fusión a compartimentos degradativos. Por ello, para obtener

evidencia en favor de alguna de estas dos posibilidades, realizamos experimentos adicionales por MLC en tiempo real empleando la sonda fluorescente FLICA que se incorpora a células viables y permite detectar a la caspasa-1 activa. Nosotros razonamos que, si el destino de estos compartimientos es la secreción, la caspasa-1 debería ser encontrada en el medio extracelular luego de las 5 hs p.e. con LPS. Nuestros estudios no nos permitieron capturar el momento en el cuál la caspasa-1 es liberada, sin embargo, la misma pudo ser observada en vesículas por fuera de las células (**Figura 35**), o emanando de estas (**Figura 36**).



**Figura 35.** Visualización de Caspasa-1 activa en vesícula por fuera de las células. Los neutrófilos fueron sembrados en cámaras de cultivo (*Cellview glass bottom dishes*) tratadas previamente con poly-L-lisina (0,01%), y luego fueron observados en tiempo real al MLC en una cámara con atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Los mismos fueron tratados con LPS (250 ng/ml) y ATP (2,5 mM). Luego se le agregó al cultivo la sonda FAM-FLICA-CMK (verde). La imagen corresponde a un campo representativo, en el que se observa una vesícula conteniendo FLICA, flecha blanca.

Sorprendentemente, la caspasa-1 activa fue incorporada por una célula vecina (**Figura 36, flechas blancas**). Estos resultados sugieren que al menos algunos inflamasomas pueden ser liberados de los neutrófilos, aunque no podemos descartar que otros sufran degradación sin ser secretados.



**Figura 36.** Visualización de Caspasa-1 activa. Los neutrófilos fueron sembrados en cámaras de cultivo (*Cellview glass bottom dishes*) tratadas previamente con poly-L-lisina (0,01%), y luego fueron observados en tiempo real al MLC en una cámara con atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Los mismos fueron tratados con LPS (250 ng/ml) y ATP (2,5 mM). Luego se le agregó al cultivo la sonda FAM-FLICA-CMK (verde) y después de 15 minutos se cambió el medio por medio de ayuno (EBSS). Se tomaron 142 imágenes con un intervalo de 1 minuto. En la figura se observan algunas de las imágenes capturadas a distintos tiempos. Las flechas blancas indican la vesícula conteniendo FLICA que es tomada por una célula vecina.

# **Discusión**

Como se ha mencionado, los neutrófilos representan las células más numerosas de sangre periférica y su número se incrementa dramáticamente durante la inflamación o infección sistémica. A pesar de que los neutrófilos humanos son capaces de secretar concentraciones menores de citoquinas que las liberadas por monocitos/macrófagos, su activa generación y su reclutamiento masivo a los focos infecciosos, los lleva a superarlos en uno o dos órdenes de magnitud. Sin embargo, la producción de citoquinas por neutrófilos posee una relevancia aún poco considerada. En este sentido, diversos estudios han evidenciado el rol de los neutrófilos como una fuente relevante de IL-1 $\beta$  en procesos infecciosos *in vivo* <sup>92-100</sup>.

Nuestro grupo demostró anteriormente que los neutrófilos humanos aislados de sangre periférica con muy alta pureza, producen IL-1 $\beta$  en respuesta a LPS y ATP. Sin embargo, previo a nuestros estudios, no se habían investigado los mecanismos involucrados en la exportación de la IL-1 $\beta$  de los neutrófilos, que como hemos mencionado transcurre por un mecanismo no canónico, independiente de la vía RE-aparato de Golgi. Teniendo en cuenta la relevancia de identificar blancos con potencial utilidad terapéutica para regular la secreción de esta citoquina por neutrófilos en diversos contextos inflamatorios, esta tesis tuvo como objetivo investigar el mecanismo de liberación de la IL-1 $\beta$  en neutrófilos humanos primarios. Aplicando técnicas de MLC cuantitativa, pudimos confirmar que la maquinaria autofágica participa en el proceso de secreción de la IL-1 $\beta$  al medio extracelular en estas células.

Nuestros ensayos aportaron evidencia de que la IL-1 $\beta$  citosólica es translocada a una vesícula autofágica y desde esta, al medio extracelular, puesto que la citoquina fue encontrada a tiempos muy tempranos p.e. con LPS en el citoplasma, y luego colocalizando con LC3B previo a su liberación. Además, la colocalización de IL-1 $\beta$  con el marcador lisosomal LAMP-2 fue reducida y no se modificó con el tiempo, descartando que el destino del autofagosoma conteniendo IL-1 $\beta$  transite por una vía degradativa clásica. Nuestra conclusión sobre el papel de la autofagia en la translocación de la IL-1 $\beta$  a un compartimento vesicular se vio reforzada en experimentos en los que neutrófilos fueron estimulados con LPS y ATP, y sometidos al tratamiento con ayuno para promover la autofagia. En estos aumentó significativamente la colocalización de IL-1 $\beta$  y LC3B, y las vesículas se incrementaron en tamaño. Estos hallazgos, en conjunto con resultados previos de nuestro grupo que mostraron que la inhibición farmacológica de la autofagia en neutrófilos primarios, así como el *knockdown* de ATG5 en células PLB-985 diferenciadas a neutrófilos, redujeron significativamente la secreción de IL-1 $\beta$  al medio extracelular, y aquellos que indicaron que la promoción de la autofagia por ayuno la aumentó significativamente, permitieron confirmar que la exportación de la IL-1 $\beta$  está mediada por un mecanismo de autofagia secretoria <sup>155</sup>.

Contrastando con la ausencia de información en neutrófilos, muchos estudios trataron de dilucidar el mecanismo involucrado en la liberación de la IL-1 $\beta$  por macrófagos, monocitos y células dendríticas. Sin embargo, los resultados obtenidos arrojaron conclusiones en muchos casos contrapuestas. Nuestros estudios están en concordancia con aquellos reportados por Dupont y colaboradores, los cuales indican que la inducción de la autofagia lleva a la IL-1 $\beta$  desde el citosol al autofagosoma y desde allí al medio extracelular en MMO estimulados con LPS y diferentes agonistas del inflamasoma. Al igual que lo que observamos en nuestros estudios previos en neutrófilos humanos, los autores mostraron que tanto el ayuno como la inducción farmacológica de la autofagia por la inhibición de mTor con pp242 aumentó la secreción de IL-1 $\beta$ . Además, determinaron que el bloqueo de la autofagia con Baf A1 inhibió la secreción de la IL-1 $\beta$ <sup>115</sup>. En contraste con este estudio, que demostraba que la autofagia basal afectaba negativamente la secreción de la IL-1 $\beta$  en MMO, no se observó lo mismo en los neutrófilos humanos no estimulados (con respecto a la autofagia basal)<sup>155</sup>. De igual modo, Ohman y colaboradores también adjudicaron a la autofagia un papel en la secreción de IL-1 $\beta$  en macrófagos humanos que fueron activados por la vía de la Dectina-1, dado que observaron una reducción en la secreción de IL-1 $\beta$  cuando inhibieron la autofagia con 3-MA o con siRNA específicos para Beclin-1<sup>168</sup>.

A diferencia de estos hallazgos, otros estudios indicaron que la autofagia inhibe la secreción de IL-1 $\beta$ . Saitoh y colaboradores observaron que la deficiencia de ATG16L1, que impide drásticamente la formación de autofagosomas, aumenta la secreción de IL-1 $\beta$  por macrófagos murinos estimulados con LPS<sup>169</sup>. En acuerdo con estos resultados, en otro trabajo se reportó que la inhibición de la autofagia por 3-MA y WN indujo la secreción de IL-1 $\beta$  en MMO y células dendríticas estimuladas con LPS<sup>152</sup>. Estos estudios también determinaron que la estimulación de la autofagia con rapamicina inhibió la secreción de la IL-1 $\beta$  tanto por LPS como por LPS y posterior activación del inflamasoma con estímulos como el ATP, quitosano e hidróxido de aluminio. Los autores concluyeron que la autofagia actúa como limitante de la disponibilidad de la pro-IL-1 $\beta$  en los macrófagos murinos y células dendríticas estimuladas.

Las razones de estas diferencias en relación con nuestros resultados no son completamente entendidas, pero especulamos que podrían obedecer a diferencias propias a los tipos celulares analizados. De hecho, previamente demostramos que existen diferencias entre el procesamiento y secreción de la IL-1 $\beta$  entre los neutrófilos humanos y los macrófagos murinos, entre ellas, un requerimiento de la actividad de la NADPH oxidasa en la secreción mediada por neutrófilos<sup>91</sup>.

Nuestros hallazgos también contrastan con los reportados por Nakahira y colaboradores, que determinaron que la depleción de las proteínas LC3B y Beclin-1, que intervienen en la

autofagia, aumentó la secreción de la IL-1 $\beta$  y la IL-18 por MMO. Estos autores determinaron que la falta de LC3B genera un defecto en la homeostasis mitocondrial lo cual conduce a un aumento basal de la producción de ROS mitocondriales y las deja más susceptibles al daño por tratamiento con LPS y ATP. Esto resulta en liberación del ADN mitocondrial, activación aumentada de la caspasa-1 y niveles mayores de IL-1 $\beta$  en el medio extracelular<sup>153</sup>. Sin embargo, en los neutrófilos humanos de sangre periférica, las mitocondrias no solamente son escasas, sino que difieren de otras células mieloides al preservar mayormente habilidades mediadoras de muerte. Además, los neutrófilos se valen en mayor medida de la glucólisis, y no de la fosforilación oxidativa para obtener su energía, por lo que las mitocondrias participan pobremente en la síntesis del ATP. Más aún, los neutrófilos cuentan con 10 a 15 veces menos copias del genoma mitocondrial en comparación a las células mononucleares periféricas sanguíneas<sup>170</sup>. Entonces, las diferencias encontradas entre los estudios de Nakahira y colaboradores y nuestros hallazgos en cuanto al impacto que tiene la autofagia en la secreción de la IL-1 $\beta$ , podrían deberse a las peculiaridades de la fisiología de ambos sistemas celulares.

Los resultados obtenidos en esta tesis también indicaron que tanto la IL-1 $\beta$  madura como la pro-IL-1 $\beta$  son liberadas al medio extracelular luego de la estimulación con LPS y ATP. Sin embargo, sólo la secreción de la IL-1 $\beta$  madura parece ser modulada por la autofagia, ya que ni la inhibición de la misma por 3-MA o su promoción por el ayuno reguló la liberación de pro-IL-1 $\beta$ . Estos resultados indicaron que sólo la IL-1 $\beta$  es incorporada a vesículas autofágicas. Estos hallazgos acuerdan con los estudios de Zhang y colaboradores, que mostraron en un sistema celular de origen no mielóide (HEK-293), que sólo la IL-1 $\beta$  madura entra al lumen de una vesícula, posiblemente precursora del fagóforo, que luego se convierte en un autofagosoma. Los autores propusieron que estos últimos podrían fusionarse directamente con la membrana plasmática o con CMV, desde los cuales luego la IL-1 $\beta$  sería secretada<sup>157</sup>.

En nuestros estudios, la cuantificación de la IL-1 $\beta$  presente en MV, Ex y en sobrenadantes de cultivo desprovistos de las mismas, sugirió, además, que la IL-1 $\beta$  es liberada al medio extracelular mayoritariamente de manera soluble. Este hallazgo es compatible con la posibilidad de que la IL-1 $\beta$  esté siendo translocada desde el citoplasma al espacio intermembrana de un autofagosoma, o que tal como propusieron Zhang y colaboradores, sea translocada a una vesícula que luego dará origen al autofagosoma, quedando luego ubicada en el espacio entre ambas membranas autofagosomales. En sustento de esta última posibilidad, merece señalarse que además de observar vesículas en las que la IL-1 $\beta$  colocalizó con LC3B, en las mismas células, también detectamos vesículas conteniendo IL-1 $\beta$  desprovistas de LC3B. Por otra parte, una posible explicación para la presencia de una parte de la IL-1 $\beta$  en Ex y MV, podría ser que una vez presente en el espacio intermembrana del autofagosoma, se produjeran invaginaciones de la

membrana interna del autofagosoma hacia el lumen y posterior separación de una vesícula intraluminal (futuro Ex), que incluyera algo del contenido de espacio intermembrana, tal como ocurre cuando se forman CMV <sup>108</sup>. No obstante, en ese caso, la fusión del autofagosoma a la membrana plasmática conduciría a la liberación de una vesícula (cuyo tamaño podría ser compatible con el de las MV) que contendría Ex, excepto que previo a su fusión con la membrana plasmática, se degradara la membrana interna autofagosomal, de modo similar a lo que ocurre en los autolisosomas. Este hecho eventualmente podría ocurrir si el autofagosoma se fusionara con gránulos conteniendo enzimas degradativas previo a la fusión con la membrana plasmática, un evento que como hemos determinado, puede ocurrir en los neutrófilos.

Independientemente del mecanismo, la presencia de una porción de la IL-1 $\beta$  secretada en MV y Ex, plantea el interrogante de cómo la misma podría participar en el desarrollo de inflamación. En este sentido, merece señalarse que en estudios previos se demostró que MV de células dendríticas y de microglía expresan el receptor P<sub>2</sub>X<sub>7</sub>, y se lisan cuando son expuestas al ATP extracelular <sup>171,172</sup>. Estos antecedentes llevaron a hipotetizar que una vez que las vesículas se aproximan a la membrana plasmática de las células blanco, en las que la concentración de ATP es alta, como ocurre en ambientes inflamatorios <sup>173</sup>, el receptor P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> es activado, las vesículas se lisan y la IL-1 $\beta$  es liberada al medio <sup>174</sup>. Si bien en esta tesis no hemos analizado la presencia del receptor P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> u otros receptores purinérgicos en las MV y Ex que contienen a la IL-1 $\beta$ , considerando que los neutrófilos expresan estos receptores <sup>175</sup>, especulamos que éste podría ser un mecanismo por el cual los neutrófilos promuevan la inflamación a distancia.

El hecho de que la IL-1 $\beta$  sea liberada mayoritariamente en forma soluble, también sugiere que la misma es translocada a un compartimiento vesicular por un mecanismo que se asemeja al de la AMC <sup>138</sup>. Sin embargo, a diferencia de la AMC, en este caso, la IL-1 $\beta$  estaría siendo incorporada a un autofagosoma o a una vesícula que posteriormente daría origen a un autofagosoma, sin proceder a una vía degradativa. Sustentan esta posibilidad, los resultados de los experimentos que indicaron la participación de HSP-90 y de GSDMD en el proceso de secreción.

De hecho, en acuerdo con lo reportado por Zhang y colaboradores en células no mieloides, en las que el proceso de exportación de la IL-1 $\beta$  involucra a la chaperona HSP-90, la cual transportaría a la IL-1 $\beta$  a la membrana de una vesícula, en este trabajo determinamos que HSP-90 participa en el mecanismo de liberación de la IL-1 $\beta$ . Nuestra conclusión se sustenta en observaciones realizadas por MLC que indicaron un solapamiento de la IL-1 $\beta$  vesicular con HSP-90 en tiempos previos a ser secretada. Además, el agregado de radicicol, un inhibidor específico de la chaperona, redujo tanto dicha colocalización como la cantidad de IL-1 $\beta$  que accedió a las vesículas y la secreción de IL-1 $\beta$  al medio extracelular. En conjunto los resultados sugieren que

la chaperona HSP-90 contribuye a la translocación de IL-1 $\beta$  a los autofagosomas. Cabe destacar que empleamos el Radicicol a las 2:10 hs p.e., un tiempo al cual de acuerdo a nuestros resultados de MLC en tiempo real, la caspasa-1 ya se encuentra activa. Este representa un aspecto importante ya que existe un reporte en el que se establece que la HSP-90 es responsable de mantener al NLRP3 en una conformación inactiva, pero susceptible de ser activado. En ausencia de HSP-90 activa y de señales proinflamatorias, el NLRP3 es inestable y degradado por el proteasoma <sup>176</sup>. De modo que el agregado de radicicol una vez que la caspasa-1 fue activada, permite descartar que la disminución de la secreción de IL-1 $\beta$  observada sea consecuencia de la inhibición del inflammasoma, y sustenta la participación de HSP-90 en la secreción de IL-1 $\beta$ .

En favor de que el mecanismo de exportación de IL-1 $\beta$  posea características similares a un proceso de AMC, los resultados de esta tesis también aportaron evidencia de que GSDMD podría ser la molécula responsable de proveer el mecanismo por el que la IL-1 $\beta$  ingrese a las vesículas autofágicas. Estudios previos propusieron a la piroptosis como uno de los mecanismos posibles para explicar cómo la IL-1 $\beta$  es liberada al medio extracelular. Este proceso se lleva a cabo por la polimerización de la NT-GSDMD, luego de que la molécula nativa es clivada por proteasas como las caspasas 1, 4 o 5 humanas. Liu y colaboradores determinaron que NT-GSDMD se une a fosfolípidos característicos de la cara interna de la membrana plasmática de células de mamífero, como los fosfatidilinositoles-4 fosfato y -4,5-bifosfato, y en menor medida con ácido fosfatídico y fosfatidilserina. Los autores señalaron que la cara externa de la membrana de endosomas y fagosomas posee los mismos fosfolípidos que la cara interna de la membrana plasmática, sugiriendo que NT-GSDMD podría polimerizarse sobre ellos <sup>114</sup>. En nuestros ensayos por MLC, no sólo observamos vesículas en las que GSDMD colocalizó con la IL-1 $\beta$ , sino que detectamos colocalización en algunas vesículas que no están próximas a la membrana plasmática, sugiriendo que GSDMD podría estar formando un poro en la membrana de vesículas intracelulares. Teniendo en cuenta nuestros resultados y lo propuesto por Liu y colaboradores, nosotros especulamos que la GSDMD sería la molécula responsable de mediar la translocación de la IL-1 $\beta$  al interior de la vesícula.

Dado que nuestras imágenes de MLC no indicaron que la estimulación de los neutrófilos con LPS y ATP indujera piroptosis, y en nuestros estudios previos determinamos una prevención de la muerte celular por este tratamiento <sup>155</sup>, los hallazgos no sustentan que la activación de la caspasa-1 y la polimerización de GSDMD observada, conduzca también a la liberación de IL-1 $\beta$  por un mecanismo de piroptosis. No obstante, se requieren estudios adicionales para descartar esta posibilidad. Se especula que el avance o no hacia un programa de muerte celular por piroptosis podría estar determinado por la cantidad de poros que son generados en la membrana plasmática <sup>177</sup>.

El tráfico vesicular es de central importancia en las células, y particularmente para los neutrófilos, que al tener una gran variedad de gránulos y organelas que deben ser movilizados de manera diferencial, está altamente regulado. La maquinaria secretoria específica de una cierta vesícula del neutrófilo determinará finalmente el destino de la organela independientemente de cuál sea su carga. Entonces dos gránulos con cargas idénticas pueden ser funcionalmente diferentes, dependiendo, por ejemplo, de las proteínas Rab que presentan en su membrana. De hecho, se observó que la población de gránulos azurófilos es heterogénea, no sólo por sus características físicas, sino por su habilidad para ser excitada o participar en la maduración fagosomal, propiedades que están determinadas por la presencia o ausencia de Rab27a, respectivamente <sup>159</sup>. Los estudios realizados en esta tesis mostraron que autofagosomas conteniendo IL-1 $\beta$  también exhibían colocalización con Rab27a en los neutrófilos estimulados con LPS y ATP, lo que apoya la idea de que las vesículas que contienen IL-1 $\beta$  son organelas movilizables capaces de fusionarse con la membrana plasmática para la consecuente liberación de su contenido.

Estudios recientes en células THP-1 diferenciadas, identificaron componentes moleculares distintivos envueltos en la autofagia secretoria que la diferencian de la autofagia degradativa. Estos reportes indicaron que en respuesta al LPS, en conjunto con daño lisosomal, o con ayuno, la IL-1 $\beta$  intracelular es reconocida por la proteína de motivo tripartita 16 (TRIM16) que a su vez interactúa con la proteína R-SNARE Sec22b para llevar a la citoquina a las membranas autofágicas. Los autores proveyeron evidencia de un cierto rol de otras proteínas SNARE (syntaxinas 3 y 4, SNAP23 y SNAP29) en la fusión de las membranas de las vesículas autofágicas que contienen IL-1 $\beta$ , con la membrana plasmática <sup>178,179</sup>. Aún queda dilucidar si estos mecanismos moleculares están involucrados en la secreción de IL-1 $\beta$  mediada por autofagia en neutrófilos humanos. Sin embargo, es interesante mencionar que estudios realizados en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos mostraron que la reducción de la expresión de la syntaxina 3 mediada por un siRNA reduce la secreción de IL-1 $\beta$  inducida por LPS <sup>180</sup>.

Por otro lado, en esta tesis, también pudimos establecer un rol fundamental de las serinproteasas en la regulación de la liberación de la IL-1 $\beta$  al medio extracelular. El papel de estas enzimas parece ser complejo. Estudios previos reportaron que la elastasa es capaz de procesar a la pro-IL-1 $\beta$  generando una isoforma activa <sup>85</sup>. Por otra parte, los estudios de nuestro grupo realizados *in silico* indicaron que tanto la secuencia de la pro-IL-1 $\beta$  como de la citoquina madura exhiben sitios de corte para serinproteasas <sup>155</sup>. Estos antecedentes sugieren que estas enzimas podrían contribuir tanto al procesamiento de la pro-IL-1 $\beta$ , como a la degradación de la citoquina madura.

Adicionalmente, el grupo de Zychlinsky reportó previamente que la estimulación de los neutrófilos con agonistas de NETosis induce la liberación de serinproteasas granulares al citoplasma<sup>162</sup>. Estudios más recientes demostraron que la elastasa neutrofílica es capaz de clivar a la GSDMD, y evidenciaron que cuando esta enzima sale de los gránulos y produce su clivaje, la NT-GSDMD es capaz de formar poros en la membrana plasmática<sup>181</sup>.

Estos antecedentes ponen de manifiesto que las serinproteasas podrían estar actuando a varios niveles y ejerciendo efectos contrapuestos sobre la secreción de IL-1 $\beta$  por neutrófilos. Además, sugieren que algunas de estas acciones podrían ser redundantes a las ejecutadas por la caspasa-1 (procesamiento de pro-IL-1 $\beta$  y de GSDMD) y eventualmente por la caspasa-4 (clivaje de GSDMD).

En este trabajo mediante la aplicación de distintas metodologías como ELISA, Western Blot y MLC a distintos tiempos p.e., pudimos confirmar que la actividad de estas enzimas contribuye a la secreción de la IL-1 $\beta$ . Esta conclusión se sustenta en los resultados que indicaron que la inhibición farmacológica de las serinproteasas redujo marcadamente la secreción de IL-1 $\beta$  al medio extracelular a las 5 hs p.e., en acuerdo con lo que reportamos previamente con el Elafin<sup>91</sup>. Nuestros resultados también mostraron una leve acumulación de la pro-IL-1 $\beta$  intracelular a las 5 hs p.e. como consecuencia de la inhibición de las serinproteasas y una reducción significativa de su secreción. Estos hallazgos sugieren que las serinproteasas contribuyen al procesamiento de la proforma. Esta posibilidad fue sustentada, además, por resultados indicando que el inhibidor de serinproteasas indujo un incremento de la pro-IL-1 $\beta$  intracelular en un ensayo preliminar de Western Blot y una acumulación marcada de la citoquina con un patrón difuso, compatible con una distribución citoplasmática, en ensayos de MLC a las 4 hs p.e. con LPS. Teniendo en cuenta que nuestros resultados indicaron que sólo la IL-1 $\beta$  madura accede a las vesículas, las serinproteasas únicamente podrían contribuir al procesamiento de la proforma en el citoplasma. Esta posibilidad es sustentada por los resultados de nuestros estudios de MLC en tiempo real mediante el empleo de la sonda FAM-FLISP, en los que observamos la presencia de serinproteasas activas en un patrón difuso compatible con una distribución citoplasmática luego de la estimulación con LPS y ATP.

Por otra parte, nuestros estudios también identificaron colocalización vesicular de IL-1 $\beta$  con la elastasa a las 3,5 hs p.e., sugiriendo que la IL-1 $\beta$  podría ser susceptible a degradación por las serinproteasas en dicho compartimiento. Esto es apoyado por resultados del ensayo de Western Blot, en el que también se observó un incremento de la IL-1 $\beta$  madura como consecuencia del tratamiento con el inhibidor de serinproteasas.

Nuestros ensayos con la sonda FAM-FLISP indicando que las serinproteasas pueden acceder al citoplasma, sugieren que las mismas también podrían contribuir al procesamiento y/o

degradación de GSDMD en el citoplasma. Sin embargo, son necesarios ensayos adicionales para corroborar esta posibilidad.

En conjunto, nuestros hallazgos sugieren que los niveles de IL-1 $\beta$  que son secretados tras la estimulación de los neutrófilos con LPS y ATP estarían determinados por un balance entre la capacidad de la caspasa-1 y de las serinproteasas de procesar a la pro-IL-1 $\beta$  en el citoplasma, y de la posibilidad de la citoquina de resistir a la degradación por las serinproteasas en citoplasma y en aquellas vesículas autofágicas que se fusionan con gránulos azurófilos.

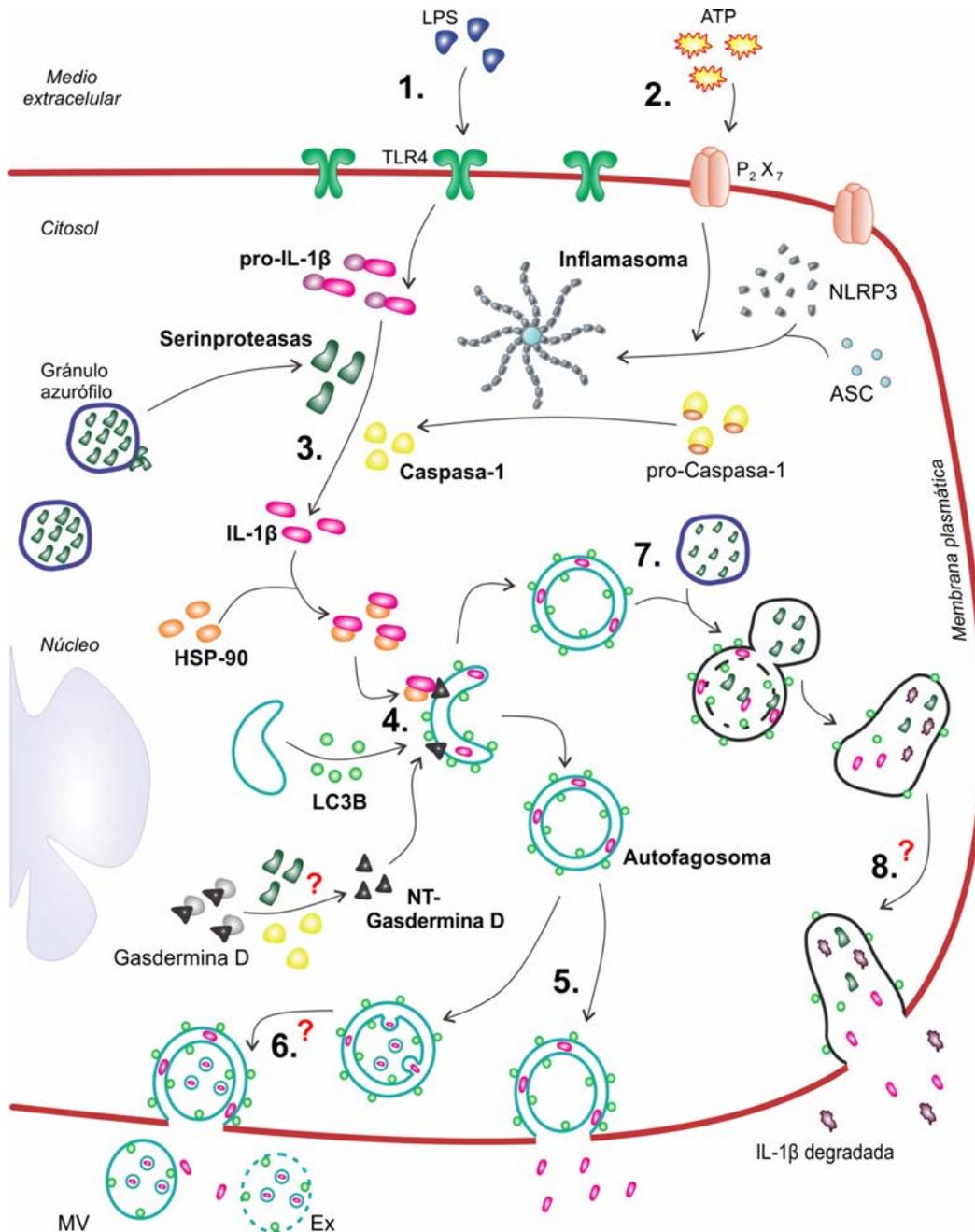
En los estudios de esta tesis también observamos que las proteínas ASC y caspasa-1 colocalizaron con el marcador de autofagia LC3B, sugiriendo que la autofagia podría no sólo regular el destino de la IL-1 $\beta$ , sino también de los componentes del inflammasoma que permiten su procesamiento. En un trabajo previo, realizado en células THP-1 humanas diferenciadas, Shi y colaboradores indicaron que la autofagia limita la producción de IL-1 $\beta$  al ubiquitinar los inflamasomas para su destrucción <sup>182</sup>. Los autores también reportaron que el ayuno inhibió la secreción de IL-1 $\beta$ , y la inhibición de la autofagia la promovió, en monocitos primarios humanos primados con LPS, y luego transfectados con poly(dA:dT), o tratados con nigericina para estimular la activación del inflammasoma. Si bien estos resultados se contraponen a los realizados en nuestro estudio en neutrófilos, especulamos que los mismos podrían deberse a diferencias entre la estabilidad del inflammasoma de neutrófilos y monocitos. En particular, hemos reportado previamente que la expresión del NLRP3 del neutrófilo no es modulada por el primado por LPS, contrariamente a lo que ocurre en los monocitos humanos <sup>91</sup> y lo que fue reportado para macrófagos murinos <sup>183</sup>.

Por otra parte, en esta tesis nosotros observamos a través del empleo de la sonda fluorescente FLICA, que al menos algunos inflamasomas son liberados de las células e incluso pueden ser capturados por células vecinas. Estos hallazgos, en conjunto con la observación indicando que tanto ASC como caspasa-1 se alojan en autofagosomas, sugieren que en neutrófilos la autofagia también podría contribuir a propagar la inflamación a través de la liberación de inflamasomas. Sin embargo, teniendo en cuenta el tamaño molecular de los mismos, es altamente improbable que estos accedan a autofagosomas por el mismo mecanismo que lo hace la IL-1 $\beta$ . Por el contrario, considerando que según datos de literatura, la proteína ASC posee sitios de ubiquitinación, es posible que la unión de la proteína adaptadora p62 dirija los inflamasomas al lumen de los autofagosomas, siguiendo un proceso semejante al de la macroautofagia selectiva y similar al que opera en macrófagos y monocitos <sup>182</sup>. Nuestros resultados indicando que algunos inflamasomas son liberados de las células, sugieren que el destino de dichos autofagosomas conteniendo ASC podría ser la secreción, aunque no es posible descartar que una parte de ellos sean sujetos a degradación. No obstante, merece señalarse que

estudios previos mostraron que estructuras macromoleculares denominadas *ASC specks* (del inglés), pueden ser liberadas de las células. Los *ASC specks* son productos de la activación del inflamasoma y del ensamblado cooperativo de moléculas ASC bajo la forma de filamentos lineales que luego pueden condensarse. Los mismos representan sitios de reclutamiento y activación de la pro-caspasa-1 y al ser liberados de las células pueden propagar la inflamación. Se han encontrado diseminados en tejidos de pacientes y ratones con enfermedades respiratorias crónicas, y en el suero de pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas. También se determinó que pueden ser capturados por otras células, y luego de su internalización pueden escapar desde los endosomas y contribuir a la polimerización de más moléculas de ASC en el citoplasma de la misma, para nuclear a la caspasa en dichas estructuras<sup>184</sup>. Además, ensayos con un ratón reportero de ASC mostraron que los neutrófilos son una fuente relevante de *ASC specks* extracelulares durante la activación del inflamasoma *in vivo*<sup>185</sup>. Nuestros resultados, en conjunto con los antecedentes detallados, sugieren que, en los neutrófilos humanos estimulados con LPS y ATP, la autofagia también podría contribuir a propagar la inflamación a través de la liberación de inflamasomas.

En la **figura 37** se describen los principales hallazgos realizados a lo largo de este trabajo de tesis, que nos permiten definir un modelo del mecanismo involucrado en la secreción de IL-1 $\beta$  por neutrófilos humanos. Como se detalla en el mismo, tras la interacción del LPS con su receptor, el TLR4 (primera señal), se induce la síntesis de la pro-IL-1 $\beta$  (**Figura 37.1**). La estimulación del receptor P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> por el ATP (segunda señal) conduce al ensamblado del inflamasoma con NLP3 y ASC. En el mismo, luego de ser reclutada, la pro-caspasa-1 sufre un proceso autocatalítico en el que adquiere su conformación activa, conocida como caspasa-1 (**Figura 37.2**). Esta enzima es responsable del procesamiento de la pro-IL-1 $\beta$  a su forma madura y biológicamente activa, la IL-1 $\beta$ . Dicho procesamiento también puede ser ejecutado por serinproteasas liberadas desde los gránulos azurófilos como consecuencia de la estimulación con LPS y ATP (**Figura 37.3**), las cuales eventualmente podrían también degradarla. La chaperona HSP-90 contribuye a la translocación de la IL-1 $\beta$  madura al interior de una vesícula que constituirá un autofagosoma, caracterizado por la presencia de LC3B en sus membranas. El pasaje al interior de dicha vesícula tendría lugar a través de un poro formado por la NT-GSDMD polimerizada que permitiría la translocación de la IL-1 $\beta$ , la cual una vez que se cierra el fagóforo, quedaría ubicada en el espacio intermembranas (**Figura 37.4**). Luego dicho autofagosoma puede ser dirigido hacia la membrana plasmática y tras la fusión con la misma, liberaría la IL-1 $\beta$  en forma soluble al medio extracelular (**Figura 37.5**). Previo a la fusión con la membrana plasmática, la membrana interna del autofagosoma podría invaginarse generando vesículas conteniendo IL-1 $\beta$  en el interior del lumen autofagosomal. La fusión de estos autofagosomas con la membrana

plasmática, liberaría VE de un tamaño compatible con el que caracteriza a las MV, las cuales eventualmente podrían romperse liberando al medio extracelular Ex conteniendo IL-1 $\beta$  (**Figura 37.6**). Alternativamente, los autofagosomas pueden fusionarse en el citosol con gránulos azurófilos (**Figura 37.7**). En esta nueva vesícula, las serinproteasas podrían degradar a la IL-1 $\beta$  madura. Si esta vesícula llegara a fusionarse con la membrana plasmática, su contenido, incluyendo IL-1 $\beta$  madura y fragmentos de la misma, sería liberado al medio extracelular (**Figura 37.8**).



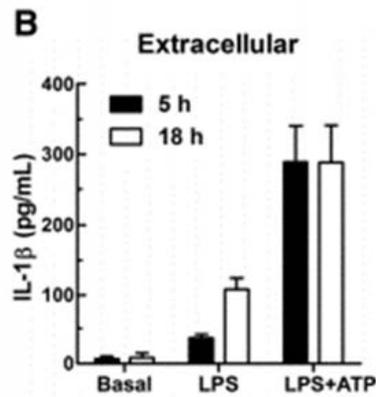
**Figura 37.** Esquema propuesto para el mecanismo de secreción de IL-1 $\beta$  por neutrófilos humanos. El símbolo ? denota procesos que todavía requieren confirmación experimental.

## **Conclusión**

Este estudio aportó al conocimiento de los mecanismos que controlan la secreción de la IL-1 $\beta$  por los neutrófilos humanos. Nuestros hallazgos permitieron identificar procesos que podrían contribuir al diseño de nuevas estrategias terapéuticas para controlar la inflamación mediada por IL-1 $\beta$ , en aquellas enfermedades en las que esta citoquina secretada por neutrófilos juega un rol clave en su patogénesis.

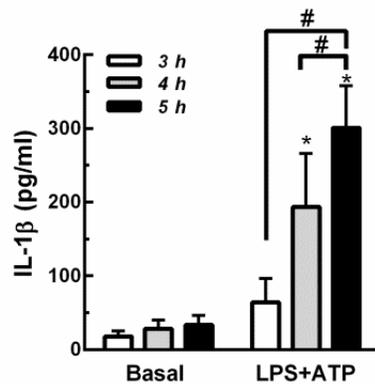
**Anexo**

## Anexo Figura 1



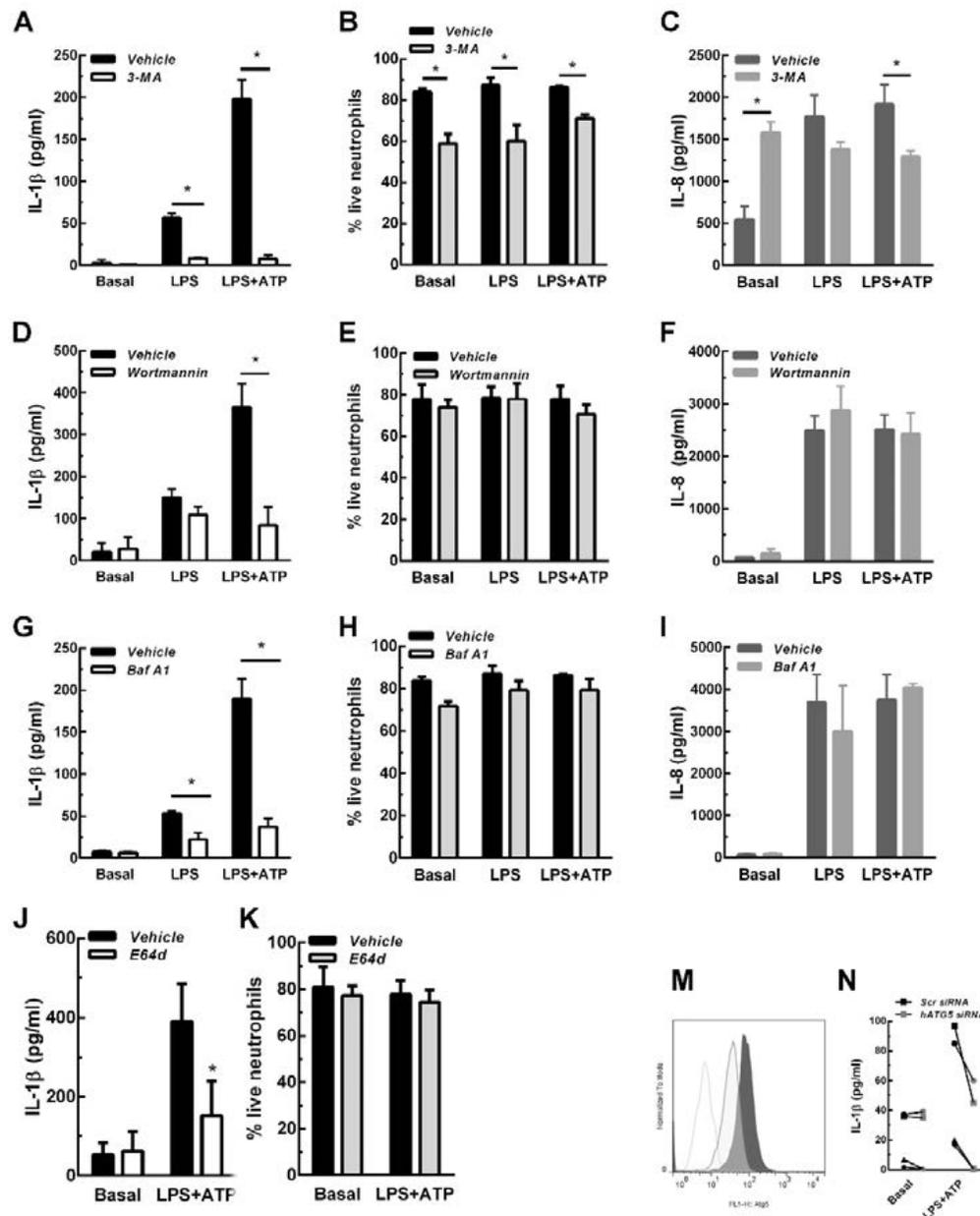
**Figure 1.** Human neutrophils release IL-1 $\beta$  upon LPS and ATP stimulation. Neutrophils were cultured for 2 h in the presence or absence of LPS (200 ng/mL) and then stimulated or not with ATP (2,5 mM) and cultured for 3 h or 16 h. The IL-1 $\beta$  released into culture supernatants was determined by ELISA. Data are expressed as mean + SEM of samples pooled from 3 experiments, each performed in duplicate. *Tomada y modificada de*<sup>91</sup>.

## Anexo Figura 2



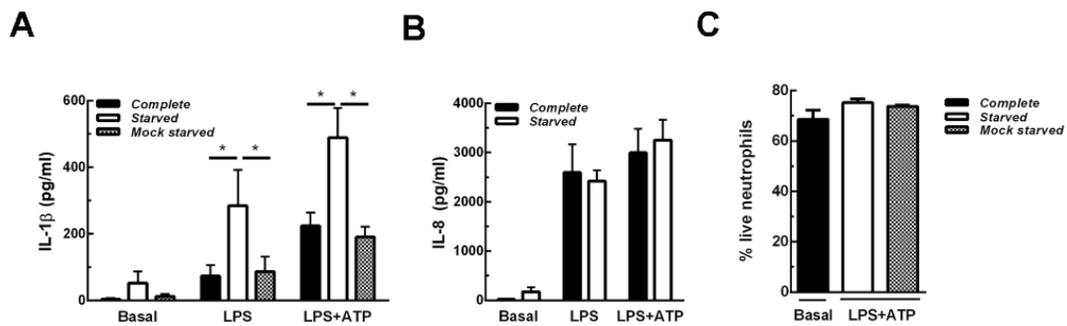
**Supplementary Figure 2.** Kinetics of neutrophil IL-1 $\beta$  secretion induced by LPS+ATP. Neutrophils were stimulated with LPS (250 ng/ml) and two hours later were treated with ATP (2,5 mM). At 3, 4 and 5 h post-LPS stimulation supernatants were collected and IL-1 $\beta$  concentrations were determined by ELISA. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test \* $p < 0,05$  vs basal; # $p < 0,05$ . *Tomada de*<sup>155</sup>.

## Anexo Figura 3



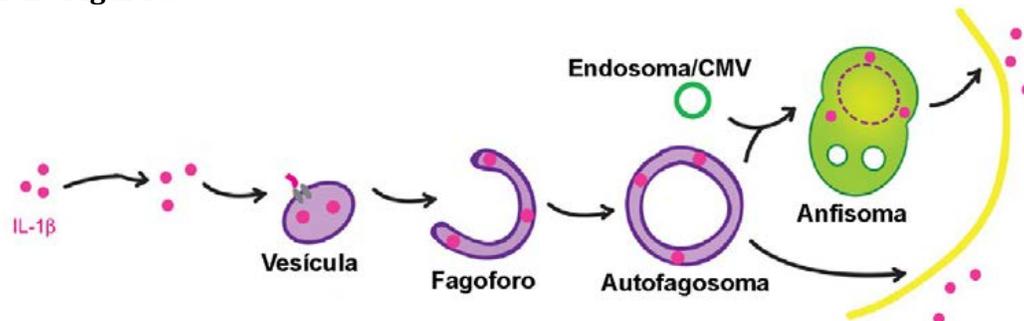
**Figure 1** | Concentrations of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (**A, D, G, J**) and IL-8 (**C, F, I**) in culture supernatants of neutrophils stimulated with LPS or LPS + ATP in the absence (vehicle) or presence of 3-methyladenine (3-MA) [5 mM; (**A**) and (**C**)] or Wortmannin [50 nM; (**D,F**)] added 30 min before LPS stimulation; Baf A1 [100 nM; (**G,I**)] or E64d [10  $\mu$ M; (**J**)] added at 3.5 h]. (**B, E, H, K**) Viability of neutrophils subjected to treatment with the indicated inhibitors evaluated by annexin V/propidium iodide staining and flow cytometry. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 3–6 experiments performed in triplicate (for cytokines) and duplicate (for viability). Two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test. (**M**) Histograms represent ATG5 expression in scramble- (Scr; dark gray tinted) or ATG5-siRNA transfected (light gray tinted) neutrophil-differentiated PLB985 cells and isotype control (gray line). (**N**) Graph depicts IL-1 $\beta$  concentrations in culture supernatants of these cells stimulated or not with LPS + ATP. Black symbols, Scr siRNA; gray symbols, hATG5 siRNA. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test. \* $p < 0,05$ . Tomada y modificada de <sup>155</sup>.

## Anexo Figura 4



**Figure 4** | Effect of autophagy stimulation by starvation on neutrophil interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) secretion. Neutrophils remained unstimulated (basal) or were stimulated with LPS and 2 h later were treated or not with ATP. At 3.5 h post-LPS stimulation, cells were left untreated (complete, black) or supernatants were removed and replaced by complete medium (mock starved, gray) or Earle's Balanced Salt Solution (starved, white) and cultured by an additional hour. Then, IL-1 $\beta$  (**A**) and IL-8 (**B**) concentrations in culture supernatants were determined. Graph depicts the mean  $\pm$  SEM of four experiments performed in triplicate. \*  $p < 0.01$ . (**C**) Viability of neutrophils treated as indicated. Graph depicts the mean  $\pm$  SEM of four experiments performed in triplicate. *Tomada y modificada de* <sup>155</sup>.

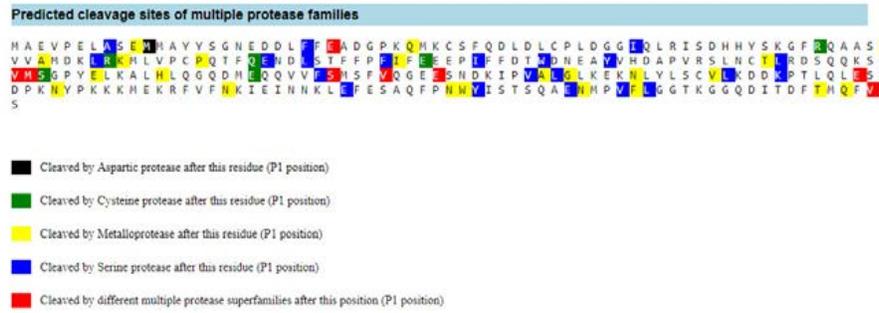
## Anexo Figura 5



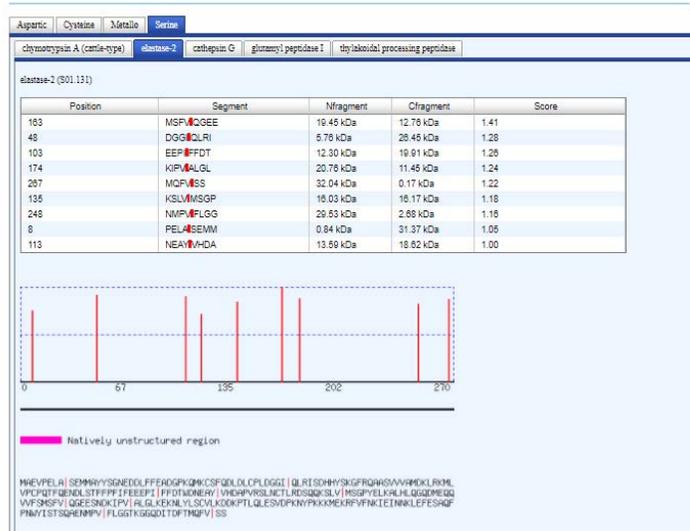
Modelo propuesto por Zhang y colaboradores para explicar la incorporación de la IL-1 $\beta$  en el proceso de secreción mediado por autofagia. *Imagen tomada y modificada de* <sup>157</sup>.

Anexo Figura 6

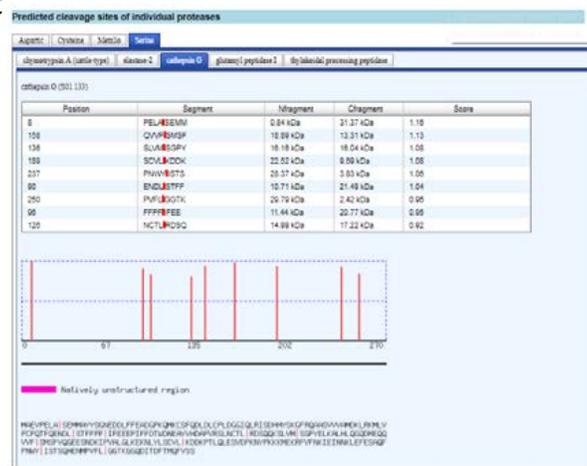
A



B



C



**Supplementary Figure 8.** Predicted cleavage sites in pro-IL-1 $\beta$  sequence for multiples proteases (A) and those for elastase (B) and cathepsin G (C) calculated with PROSPER software (<https://prosper.erc.monash.edu.au>). Tomada de <sup>155</sup>.

# **Bibliografía**

1. Robins, A., Patel, P. & Chatterjee, S. Innate and adaptive immunity. *Immun. Inflamm. Heal. Dis.* 3–13 (2018). doi:10.1007/978-0-387-39241-7\_2
2. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* **124**, 783–801 (2006).
3. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499–511 (2004).
4. Medzhitov, R. & Janeway, C. A. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 4–9 (1997).
5. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* **16**, 343–353 (2015).
6. Rock, K. L., Latz, E., Ontiveros, F. & Kono, H. The sterile inflammatory response. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 321–342 (2015).
7. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 991–1045 (1994).
8. Kono, H., Onda, A. & Yanagida, T. Molecular determinants of sterile inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* **26**, 147–56 (2014).
9. Takeuchi, O., Akira, S., Osamu, T. & Shizuo, A. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
10. Geijtenbeek, T. B. H. & Gringhuis, S. I. Signalling through C-type lectin receptors: Shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 465–479 (2009).
11. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **5**, 987–995 (2004).
12. Inohara, N., Chamailard, M., McDonald, C. & Nuñez, G. NOD-LRR PROTEINS: Role in Host-Microbial Interactions and Inflammatory Disease. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 355–383 (2005).
13. Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. The Inflammasomes. *PLoS Pathog.* **5**, (2009).
14. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428–435 (2008).
15. Borregaard, N. Immunity Review Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* **33**, 657–670 (2010).
16. Lahoz-Beneytez, J. *et al.* Human neutrophil kinetics: modeling of stable isotope labeling data supports short blood neutrophil half-lives. *Blood* blood-2016-03-700336 (2016). doi:10.1182/BLOOD-2016-03-700336
17. Summers, C. *et al.* Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* **31**, 318–324 (2010).
18. Christoffersson, G. & Phillipson, M. The neutrophil: one cell on many missions or many cells with different agendas? *Cell Tissue Res.* (2018). doi:10.1007/s00441-017-2780-z
19. Mauer, A. M., Athens, J. W., Ashenbrucker, H., Cartwright, G. E. & Wintrobe, M. M. LEUKOKINETIC STUDIES. II. A METHOD FOR LABELING GRANULOCYTES IN VITRO WITH RADIOACTIVE DIISOPROPYLFLUOROPHOSPHATE (DFP). *J. Clin. Invest.* **39**, 1481–6 (1960).
20. Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D. & Zychlinsky, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 459–89 (2012).
21. Galani, I. E. & Andreanos, E. Neutrophils in viral infections: Current concepts and caveats. *J. Leukoc. Biol.* **98**, 557–564 (2015).
22. Camp, J. V. & Jonsson, C. B. A Role for Neutrophils in Viral Respiratory Disease. *Front. Immunol.* **8**, 550 (2017).
23. Lekstrom-Himes, J. A. & Gallin, J. I. Immunodeficiency Diseases Caused by Defects in Phagocytes. *N. Engl. J. Med.* **343**, 1703–1714 (2000).
24. Rørvig, S., Østergaard, O., Heegaard, N. H. H. & Borregaard, N. Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 711–21 (2013).
25. Lawrence, S. M., Corriden, R. & Nizet, V. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **82**, 1–22 (2018).
26. Sengeløv, H., Kjeldsen, L. & Borregaard, N. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J. Immunol.* **150**, 1535–43 (1993).
27. Faurischou, M., Sørensen, O. E., Johnsen, A. H., Askaa, J. & Borregaard, N. Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties. *Biochim. Biophys. Acta* 29–35 (2002).
28. Joiner, K. A., Ganz, T., Albert, J. & Rotrosen, D. The Opsonizing Ligand on Salmonella typhimurium Influences Incorporation of Specific, but Not Azurophil, Granule Constituents into Neutrophil Phagosomes. *J. Cell Biol.* **109**, 2771–2782 (1989).
29. Perera, N. C. *et al.* NSP4 is stored in azurophil granules and released by activated neutrophils as active endoprotease with restricted specificity. *J. Immunol.* **191**, 2700–7 (2013).

30. Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P. & Halbwachs-Mecarelli, L. Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Lab. Investig.* **80**, 617–653 (2000).
31. Cowland, J. B. & Borregaard, N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol. Rev.* **273**, 11–28 (2016).
32. Valenti, P. & Antonini, G. Lactoferrin. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2576–2587 (2005).
33. Kjeldsen, L., Sengelsv, H., Lollike, K., Nielsen, M. H. & Borregaard, N. Isolation and Characterization of Gelatinase Granules From Human Neutrophils. *Blood* **83**, 1640–1649 (1994).
34. Katayama, M. *et al.* Ficolin-1 is a promising therapeutic target for autoimmune diseases. *Int. Immunol.* (2018). doi:10.1093/intimm/dxy056
35. Rørvig, S. *et al.* Ficolin-1 is present in a highly mobilizable subset of human neutrophil granules and associates with the cell surface after stimulation with fMLP. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 1439–1449 (2009).
36. Borregaard, N., Sørensen, O. E. & Theilgaard-Mönch, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* **28**, 340–345 (2007).
37. Nguyen, G. T., Green, E. R. & Meccas, J. Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 373 (2017).
38. Futosi, K., Fodor, S. & Mócsai, A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. (2013). doi:10.1016/j.intimp.2013.06.034
39. Winterbourn, C. C., Hampton, M. B., Livesey, J. H. & Kettle, A. J. Modeling the Reactions of Superoxide and Myeloperoxidase in the Neutrophil Phagosome. (2006). doi:10.1074/jbc.M605898200
40. Segal, B. H., Leto, T. L., Gallin, J. I., Malech, H. L. & Holland, S. M. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore).* **79**, 170–200 (2000).
41. Lim, J. J., Grinstein, S. & Roth, Z. Diversity and Versatility of Phagocytosis: Roles in Innate Immunity, Tissue Remodeling, and Homeostasis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 1–12 (2017).
42. Segal, A. W., Geisow, M., Garcia, R., Harper, A. & Miller, Robert. The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature* **290**, 406–409 (1981).
43. Jankowski, A., Scott, C. C. & Grinstein, S. Determinants of the phagosomal pH in neutrophils. *J. Biol. Chem.* **277**, 6059–66 (2002).
44. El Chemaly, A., Nunes, P., Jimaja, W., Castelbou, C. & Demaurex, N. Hv1 proton channels differentially regulate the pH of neutrophil and macrophage phagosomes by sustaining the production of phagosomal ROS that inhibit the delivery of vacuolar ATPases. *J. Leukoc. Biol.* **95**, 827–839 (2014).
45. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science (80-. )*. **303**, 1532–1535 (2004).
46. Lood, C. *et al.* Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease HHS Public Access Author manuscript. *Nat Med* **22**, 146–153 (2016).
47. Felix, L. C., Almas, S. & Lacy, P. Regulatory Mechanisms in Neutrophil Degranulation. in *Immunopharmacology and Inflammation* 191–210 (Springer International Publishing, 2018). doi:10.1007/978-3-319-77658-3\_8
48. Feldmann, M. Many cytokines are very useful therapeutic targets in disease. *J. Clin. Invest.* **118**, 3533–3536 (2008).
49. Tamassia, N. *et al.* Cytokine production by human neutrophils: Revisiting the ‘dark side of the moon’. *Eur. J. Clin. Invest.* 1–10 (2018). doi:10.1111/eci.12952
50. Dinarello, C. A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol. Rev.* **281**, 8–27 (2018).
51. Hahn, M., Frey, S. & Hueber, A. J. The novel Interleukin-1 cytokine family members in inflammatory diseases. *Curr. Opin. Rheumatol.* **29**, 208–213 (2017).
52. Dinarello, C. a. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 519–50 (2009).
53. Sims, J. E. & Smith, D. E. The IL-1 family: Regulators of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 89–102 (2010).
54. Mochizuki, D. Y., Eisenman, J. R., Conlon, P. J., Larsen, A. D. & Tushinski, R. J. Interleukin 1 regulates hematopoietic activity, a role previously ascribed to hemopoietin 1. *Cell Biol.* **84**, 5267–5271 (1987).
55. Neta, R., Douches, S. & Oppenheim, J. J. Interleukin 1 is a radioprotector. *J. Immunol.* **136**, 2483–5 (1986).
56. Bevilacqua, M. P., Pober, J. S., Wheeler, M. E., Cotran, R. S. & Gimbrone, M. A. 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 (1985).
57. Kuijpers, T. W., Hakkert, B. C., Hoogerwerf, M., Leeuwenberg, J. F. & Roos, D. 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**, 1369–76 (1991).
  58. Dustin, M. L., Rothlein, R., Bhan, A. K., Dinarello, C. A. & Springer, T. A. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* **137**, 245–54 (1986).
  59. Dinarello, C. A. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* **20**, S1-13 (2002).
  60. Lipsky, P. E., Thompson, P. A., Rosenwasser, L. J. & Dinarello, C. A. The role of interleukin 1 in human B cell activation: inhibition of B cell proliferation and the generation of immunoglobulin-secreting cells by an antibody against human leukocytic pyrogen. *J. Immunol.* **130**, 2708–14 (1983).
  61. Garlanda, C., Dinarello, C. A. & Mantovani, A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. (2013). doi:10.1016/j.immuni.2013.11.010
  62. Dinarello, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* **117**, 3720–3732 (2011).
  63. Bent, R., Moll, L., Grabbe, S. & Bros, M. Interleukin-1 beta—A friend or foe in malignancies? *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
  64. Dinarello, C. A. *et al.* Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J. Immunol.* **139**, 1902–10 (1987).
  65. He, Y., Hara, H. & Núñez, G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 1012–1021 (2016).
  66. Cerretti, D. P. *et al.* Molecular cloning of interleukin-1 beta converting enzyme. *Science (80-. )*. **256**, 97–100 (1992).
  67. Black, R. A., Kronheim, S. R. & Sleath, P. R. Activation of interleukin-1 beta by a co-induced protease. *FEBS Lett.* **247**, 386–90 (1989).
  68. Kostura, M. J. *et al.* Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 5227–31 (1989).
  69. Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- $\beta$ . *Mol. Cell* **10**, 417–426 (2002).
  70. Broz, P. & Dixit, V. M. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 407–420 (2016).
  71. Awad, F. *et al.* Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. *Pharmacol. Ther.* **187**, 133–149 (2018).
  72. Takahama, M., Akira, S. & Saitoh, T. Autophagy limits activation of the inflammasomes. *Immunol. Rev.* **281**, 62–73 (2018).
  73. Latz, E., Xiao, T. S. & Stutz, A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* **13**, (2013).
  74. Muñoz-Planillo, R. *et al.* K<sup>+</sup> Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity* **38**, 1142–1153 (2013).
  75. Fantuzzi, G. *et al.* Response to local inflammation of IL-1 beta-converting enzyme- deficient mice. *J. Immunol.* **158**, 1818–24 (1997).
  76. Labow, M. *et al.* Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. *J. Immunol.* **159**, 2452–61 (1997).
  77. Stehlik, C. Multiple interleukin-1beta-converting enzymes contribute to inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* **60**, 3524–3530 (2009).
  78. Joosten, L. A. B. *et al.* 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 (2009).
  79. Guma, M. *et al.* Caspase 1-independent activation of interleukin-1beta in neutrophil-predominant inflammation. *Arthritis Rheum.* **60**, 3642–3650 (2009).
  80. Netea, M. G. *et al.* IL-1b Processing in Host Defense: Beyond the Inflammasomes. *PLOS Pathog.* **6**, 1000661 (2010).
  81. Hazuda, D. J., Strickler, J., Kueppers, F., Simon, P. L. & Young, P. R. Processing of precursor interleukin 1 beta and inflammatory disease. *J. Biol. Chem.* **265**, 6318–22 (1990).
  82. Black, R. A. *et al.* Generation of biologically active interleukin-1 $\beta$  by proteolytic cleavage of the

- inactive precursor. *J. Biol. Chem.* **263**, 9437–9442 (1988).
83. Coeshott, C. *et al.* 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**, 6261–6 (1999).
  84. Mizutani, H., Schechter, N., Lazarus, G., Black, R. A. & Kupper, T. S. 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**, 821–5 (1991).
  85. Afonina, I. S., Müller, C., Martin, S. J. & Beyaert, R. Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity* **42**, 991–1004 (2015).
  86. Hogquist, K. A., Nett, M. A., Unanue, E. R. & Chaplin, D. D. Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 8485–8489 (1991).
  87. Westphal, E. *et al.* 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 (2006).
  88. Santos-Beneit, A. M. & Mollinedo, F. 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**, 712–24 (2000).
  89. Watson, R. W. *et al.* The IL-1 beta-converting enzyme (caspase-1) inhibits apoptosis of inflammatory neutrophils through activation of IL-1 beta. *J. Immunol.* **161**, 957–62 (1998).
  90. Ekman, A.-K. & Cardell, L. O. The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. *Immunology* **130**, 55–63 (2010).
  91. Gabelloni, M. L. M. L. M. L. *et al.* NADPH oxidase derived reactive oxygen species are involved in human neutrophil IL-1 $\beta$  secretion but not in inflammasome activation. *Eur. J. Immunol.* **43**, 3324–35 (2013).
  92. Cho, J. S. *et al.* Neutrophil-derived IL-1 $\beta$  is sufficient for abscess formation in immunity against *Staphylococcus aureus* in mice. *PLoS Pathog.* **8**, e1003047 (2012).
  93. Williams, J. H. *et al.* Activated Pulmonary Vascular Neutrophils as Early Mediators of Endotoxin-induced Lung Inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **8**, 134–144 (1993).
  94. Parsey, M. V., Tuder, R. M. & Abraham, E. Neutrophils Are Major Contributors to Intraparenchymal Lung IL-1 $\beta$  Expression After Hemorrhage and Endotoxemia. *J. Immunol.* **160**, 1007–1013 (1998).
  95. Karmakar, M., Sun, Y., Hise, A. G., Rietsch, A. & Pearlman, E. IL-1 $\beta$  processing during *Pseudomonas aeruginosa* infection is mediated by neutrophil serine proteases and is independent of NLRC4 and Caspase-1. *J. Immunol.* **189**, 4231–4235 (2012).
  96. Patankar, Y. R., Mabaera, R. & Berwin, B. L. Differential ASC requirements reveal a key role for neutrophils and a noncanonical IL-1 $\beta$  response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **309**, (2015).
  97. Karmakar, M. *et al.* Neutrophil IL-1 $\beta$  Processing Induced by Pneumolysin Is Mediated by the NLRP3/ASC Inflammasome and Caspase-1 Activation and Is Dependent on K<sup>+</sup> Efflux. *J. Immunol.* **194**, 1763–1775 (2015).
  98. Mohammadi, N. *et al.* Neutrophils directly recognize group b streptococci and contribute to interleukin-1 $\beta$  production during infection. *PLoS One* **11**, 1–19 (2016).
  99. Chen, K. W. *et al.* The Neutrophil NLRC4 Inflammasome Selectively Promotes IL-1 $\beta$  Maturation without Pyroptosis during Acute Salmonella Challenge. *Cell Rep.* **8**, 570–582 (2014).
  100. Russell, R. F. *et al.* Partial Attenuation of Respiratory Syncytial Virus with a Deletion of a Small Hydrophobic Gene Is Associated with Elevated Interleukin-1beta Responses. *J Virol* **89**, 8974–8981 (2015).
  101. Misumi, Y. *et al.* Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **261**, 11398–403 (1986).
  102. Tartakoff, A. M. Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore monensin. *Cell* **32**, 1026–8 (1983).
  103. Rubartelli, A., Cozzolinol, F., Talio, M. & Sitia, R. A novel secretory pathway for interleukin-beta, a protein lacking a signal sequence. *The EMBO Journal* **9**, (1990).
  104. Monteleone, M., Stow, J. L. & Schroder, K. Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. *Cytokine* **74**, 213–218 (2015).
  105. Andrei, C. *et al.* The Secretory Route of the Leaderless Protein Interleukin 1 $\beta$  Involves Exocytosis of Endolysosome-related Vesicles. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1463–1475 (1999).
  106. Andrei, C. *et al.* Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion:

- Implications for inflammatory processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9745–50 (2004).
107. Singer, I. I. *et al.* The interleukin-1 beta-converting enzyme (ICE) is localized on the external cell surface membranes and in the cytoplasmic ground substance of human monocytes by immunoelectron microscopy. *J. Exp. Med.* **182**, 1447–59 (1995).
  108. Van Niel, G., D'Angelo, G. & Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 213–228 (2018).
  109. Tricarico, C., Clancy, J. & D'Souza-Schorey, C. Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases* **8**, 220–232 (2017).
  110. Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 255–289 (2014).
  111. Qu, Y., Franchi, L., Nunez, G. & Dubyak, G. R. Nonclassical IL-1 $\beta$  Secretion Stimulated by P2X7 Receptors Is Dependent on Inflammasome Activation and Correlated with Exosome Release in Murine Macrophages. *J Immunol Ref.* **179**, 1913–1925 (2007).
  112. Lopez-Castejon, G. & Brough, D. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* **22**, 189–195 (2011).
  113. Eder, C. Mechanisms of interleukin-1 $\beta$  release. *Immunobiology* **214**, 543–553 (2009).
  114. Liu, X. *et al.* Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* **535**, 153–158 (2016).
  115. Dupont, N. *et al.* Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 $\beta$ . *EMBO J.* **30**, 4701–11 (2011).
  116. Saha, S., Panigrahi, D. P., Patil, S. & Bhutia, S. K. Biomedicine & Pharmacotherapy Autophagy in health and disease : A comprehensive review. **104**, 485–495 (2018).
  117. Jiang, S., Dupont, N., Castillo, E. F. & Deretic, V. Secretory versus degradative autophagy: unconventional secretion of inflammatory mediators. *J. Innate Immun.* **5**, 471–9 (2013).
  118. Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy : Renovation of Cells and Tissues. *Cell* **147**, 728–741 (2011).
  119. Parzych, K. R. & Klionsky, D. J. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 460–473 (2014).
  120. He, C. & Klionsky, D. J. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 67–95 (2009).
  121. Yu, L., Chen, Y. & Tooze, S. A. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy* **14**, 207–215 (2018).
  122. Ichimura, Y. *et al.* A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**, 488–492 (2000).
  123. Panda, P. K. *et al.* Mechanism of autophagic regulation in carcinogenesis and cancer therapeutics. *Semin. Cell Dev. Biol.* **39**, 43–55 (2015).
  124. Yang, Z. & Klionsky, D. J. An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. in *Current topics in microbiology and immunology* **335**, 1–32 (2009).
  125. Yorimitsu, T. & Klionsky, D. J. Autophagy: Molecular machinery for self-eating. *Cell Death and Differentiation* **12**, 1542–1552 (2005).
  126. Tooze, J. *et al.* In exocrine pancreas, the basolateral endocytic pathway converges with the autophagic pathway immediately after the early endosome. *J. Cell Biol.* **111**, 329–45 (1990).
  127. Berg, T. O., Fengsrud, M., Strømhaug, P. E., Berg, T. & Seglen, P. O. Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J. Biol. Chem.* **273**, 21883–92 (1998).
  128. Wirth, M. & Tooze, S. A. Autophagy Pathway Mapping to Elucidate the Function of Novel Autophagy Regulators Identified by High-Throughput Screening. in *Methods in Molecular Biology* **1880**, 375–387 (Humana Press, New York, NY, 2019).
  129. Isakson, P., Holland, P. & Simonsen, A. The role of ALFY in selective autophagy. *Cell Death Differ.* **20**, 12–20 (2013).
  130. Chen, Y. & Klionsky, D. J. The regulation of autophagy - unanswered questions. *J. Cell Sci.* **124**, 161–70 (2011).
  131. Weidberg, H., Shvets, E. & Elazar, Z. Biogenesis and Cargo Selectivity of Autophagosomes. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 125–156 (2011).
  132. Till, A., Lakhani, R., Burnett, S. F. & Subramani, S. Pexophagy: The Selective Degradation of Peroxisomes. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, 1–18 (2012).
  133. Lee, J., Giordano, S. & Zhang, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem. J.* **441**, 523–540 (2012).
  134. Pankiv, S. *et al.* p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated

- Protein Aggregates by Autophagy. (2007). doi:10.1074/jbc.M702824200
135. Lamark, T., Svenning, S. & Johansen, T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays Biochem.* **61**, 609–624 (2017).
  136. Marzella, L., Ahlberg, J. & Glaumann, H. Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **36**, 219–234 (1981).
  137. Sahu, R. *et al.* Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes. *Dev. Cell* **20**, 131–139 (2011).
  138. Tekirdag, K. & Cuervo, A. M. Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: Joint by a chaperone. *J. Biol. Chem.* **293**, 5414–5424 (2018).
  139. Fred Dice, J. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 305–309 (1990).
  140. Chiang, H. L. & Dice, J. F. Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *J. Biol. Chem.* **263**, 6797–805 (1988).
  141. Arias, E. & Cuervo, A. M. Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 184–189 (2011).
  142. Chiang, H. L., Terlecky, S. R., Plant, C. P. & Dice, J. F. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science (80-. )*. **246**, 382–385 (1989).
  143. Cuervo, A. M. & Dice, J. F. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science (80-. )*. **273**, 501–503 (1996).
  144. Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L. & Cuervo, A. M. The Chaperone-Mediated Autophagy Receptor Organizes in Dynamic Protein Complexes at the Lysosomal Membrane. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 5747–5763 (2008).
  145. Cuervo, A. M. & Dice, J. F. Regulation of Lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic* **1**, 570–583 (2000).
  146. Cuervo, A. M. & Dice, J. F. Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. *J. Cell Sci.* **113 Pt 24**, 4441–50 (2000).
  147. Ponpuak, M. *et al.* Secretory autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **35**, 106–116 (2015).
  148. Manjithaya, R., Anjard, C., Loomis, W. F. & Subramani, S. Unconventional secretion of *Pichia pastoris* Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation. *J. Cell Biol.* **188**, 537–46 (2010).
  149. Duran, J. M., Anjard, C., Stefan, C., Loomis, W. F. & Malhotra, V. Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *J. Cell Biol.* **188**, 527–536 (2010).
  150. Vinke, F. P., Grieve, A. G. & Rabouille, C. The multiple facets of the Golgi reassembly stacking proteins. *Biochem. J.* **433**, 423–33 (2011).
  151. Kinseth, M. A. *et al.* The Golgi-associated protein GRASP is required for unconventional protein secretion during development. *Cell* **130**, 524–34 (2007).
  152. Harris, J. *et al.* Autophagy controls IL-1 $\beta$  secretion by targeting pro-IL-1 $\beta$  for degradation. *J. Biol. Chem.* **286**, 9587–97 (2011).
  153. Nakahira, K. *et al.* Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* **12**, 222–30 (2011).
  154. Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P. & Tschopp, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **469**, 221–226 (2011).
  155. **Iula, L. & Keitelman, IA. *et al.* Autophagy mediates interleukin-1 $\beta$  secretion in human neutrophils. *Front. Immunol.* **9**, 1–14 (2018).**
  156. Manders, E. M. M., Verbeek, F. J. & Aten, J. A. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J. Microsc.* **169**, 375–382 (1993).
  157. Zhang, M., Kenny, S. J., Ge, L., Xu, K. & Schekman, R. Translocation of interleukin-1 $\beta$  into a vesicle intermediate in autophagy-mediated secretion. *Elife* **4**, 1–23 (2015).
  158. Schulte, T. W. *et al.* *Interaction of Radicicol with Members of the Heat Shock Protein 90 Family of Molecular Chaperones. Molecular Endocrinology* **13**, 1435–1448 (Oxford University Press, 1999).
  159. Ramadass, M. & Catz, S. D. Molecular mechanisms regulating secretory organelles and endosomes in neutrophils and their implications for inflammation. *Immunol. Rev.* **273**, 249–265 (2016).
  160. Catz, S. D. The role of Rab27a in the regulation of neutrophil function. *Cell. Microbiol.* **16**, 1301–1310 (2014).
  161. Klionsky, D. J. Than a Decade. **8**, 931–937 (2007).
  162. Metzler, K. D., Goosmann, C., Lubojemska, A. & Zychlinsky, A. A Myeloperoxidase-Containing

- Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics during NETosis. *Cell Rep.* **8**, 883–896 (2014).
163. Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A. & Zychlinsky, A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **191**, 677–91 (2010).
  164. He, W. *et al.* Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 $\beta$  secretion. *Cell Res.* **25**, 1285–1298 (2015).
  165. Kayagaki, N. *et al.* Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* **526**, 666–671 (2015).
  166. Shi, J. *et al.* Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* **526**, 660–665 (2015).
  167. Cookson, B. T. & Brennan, M. A. Pro-inflammatory programmed cell death. *TRENDS Microbiol. J. Cereb. Blood Flow Metab. J. Exp. Med* **9**, 113–114 (2001).
  168. Öhman, T. *et al.* Dectin-1 pathway activates robust autophagy-dependent unconventional protein secretion in human macrophages. *J. Immunol.* **192**, 5952–62 (2014).
  169. Saitoh, T. *et al.* Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production. *Nature* **456**, 264–8 (2008).
  170. Maianski, N. *et al.* Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. *Cell Death Differ.* **11**, 143–153 (2004).
  171. Bianco, F. *et al.* Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 $\beta$  release from microglia. *J. Immunol.* **174**, 7268–77 (2005).
  172. Pizzirani, C. *et al.* Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1 $\beta$ -loaded microvesicles from human dendritic cells. *Blood* **109**, 3856–64 (2007).
  173. Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L. & Falzoni, S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* **47**, 15–31 (2017).
  174. Di Virgilio Lemoli, F. *et al.* The P2X7 Receptor: A Key Player in IL-1 Processing and Release. *J. Immunol.* **176**, (2006).
  175. Karmakar, M., Katsnelson, M. A., Dubyak, G. R. & Pearlman, E. Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  secretion in response to ATP. *Nat. Commun.* **7**, 1–13 (2016).
  176. Mayor, A., Martinon, F., De Smedt, T., Pétrilli, V. & Tschopp, J. A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nat. Immunol.* **8**, 497–503 (2007).
  177. Feng, S., Fox, D. & Man, S. M. Mechanisms of Gasdermin Family Members in Inflammasome Signaling and Cell Death. *J. Mol. Biol.* **430**, 3068–3080 (2018).
  178. Kimura, T. *et al.* Dedicated SNAREs and specialized TRIM cargo receptors mediate secretory autophagy. *EMBO J.* **36**, 42–60 (2017).
  179. Kimura, T. *et al.* Cellular and molecular mechanism for secretory autophagy. *Autophagy* **8627**, 1–2 (2017).
  180. Naegelen, I. *et al.* An essential role of syntaxin 3 protein for granule exocytosis and secretion of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 $\beta$ , and CCL4 from differentiated HL-60 cells. *J. Leukoc. Biol.* **97**, 557–571 (2015).
  181. Sollberger, G. *et al.* Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Sci. Immunol.* **3**, eaar6689 (2018).
  182. Shi, C. S. *et al.* Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat. Immunol.* **13**, 255–263 (2012).
  183. Bauernfeind, F. *et al.* Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J. Immunol.* **187**, 613–7 (2011).
  184. Franklin, B. S., Latz, E. & Schmidt, F. I. The intra- and extracellular functions of ASC specks. *Immunol. Rev.* **281**, 74–87 (2018).
  185. Tzeng, T.-C. C. *et al.* A Fluorescent Reporter Mouse for Inflammasome Assembly Demonstrates an Important Role for Cell-Bound and Free ASC Specks during In Vivo Infection. *Cell Rep.* **16**, 571–582 (2016).