

Tesis Doctoral

Mecanismos involucrados en la exportación de la interleuquina-1 beta (IL-1 β) en los neutrófilos humanos

Iula, Leonardo J.

2019

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en bibliotecadigital.exactas.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:

Iula, Leonardo J.. (2019). Mecanismos involucrados en la exportación de la interleuquina-1 beta (IL-1 β) en los neutrófilos humanos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6679_Iula

Cita tipo Chicago:

Iula, Leonardo J.. "Mecanismos involucrados en la exportación de la interleuquina-1 beta (IL-1 β) en los neutrófilos humanos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2019. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6679_Iula

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA

Mecanismos involucrados en la exportación de la interleuquina-1 beta ($IL-1\beta$) en los neutrófilos humanos

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

Lic. Leonardo J. Iula

Directora: Dra. Analía Trevani
Consejero de estudios: Dr. Luis Alberto Sclaro

Laboratorio de Laboratorio de Inmunidad Innata
Instituto de Medicina Experimental(IMEX)- CONICET
Academia Nacional de Medicina
Buenos Aires, 2019

Mecanismos involucrados en la exportación de la interleuquina-1 beta (IL-1 β) en los neutrófilos humanos

La Interleuquina 1 β (IL-1 β) es una citoquina proinflamatoria central en procesos fisiopatológicos que ejerce efectos pleiotrópicos sobre el sistema inmune innato y el adaptativo. A pesar de ser una proteína de exportación, la IL-1 β carece de un péptido señal y es sintetizada en el citoplasma como una molécula precursora inactiva (proIL-1 β), que tras ser procesada proteolíticamente, es secretada por mecanismos definidos de forma incompleta, que son independientes de la vía canónica de secreción celular que involucra al retículo endoplasmático y al aparato de Golgi. En este trabajo de tesis, investigamos los mecanismos involucrados en la secreción de IL-1 β en neutrófilos aislados de sangre periférica humana. Nuestros estudios indicaron que la inhibición de la inducción de autofagia mediante el uso de inhibidores como 3-metiladenina y Wortmanina, o el bloqueo del flujo autofágico con Bafilomicina A1 (Baf A1) o E-64d, redujeron marcadamente la secreción de IL-1 β inducida por LPS o LPS+ATP luego de 5 hs de cultivo. En neutrófilos diferenciados a partir de la línea celular PLB985, la reducción de la expresión (knockdown) de ATG5 mediante ARN de interferencia inhibió la secreción de IL-1 β . En respuesta a la estimulación de neutrófilos con LPS+ATP, la IL-1 β pudo ser detectada colocalizando con el marcador de vesículas autofágicas LC3B al ser analizadas por microscopia laser confocal a las 4 horas postestimulación (p.e.). En contraposición al impacto ejercido por la inhibición de la autofagia, su inducción por privación de nutrientes incrementó la colocalización entre IL-1 β y LC3B a las 4hs. p.e., y promovió significativamente la secreción de IL-1 β inducida por LPS+ATP a las 5 hs p.e.

Dado que la secreción de IL-1 β en neutrófilos requiere de la actividad de la NADPH oxidasa, nos planteamos como hipótesis que la actividad de la enzima es necesaria para evitar la acidificación de las vesículas que contienen IL-1 β y de esta forma prevenir su degradación por proteasas ácidas lisosomales. En favor de esta posibilidad, el tratamiento de neutrófilos con inhibidores de la NADPH oxidasa como DPI y apocinina inhibió la secreción de IL-1 β inducida por LPS+ATP y no modificó los niveles intracitoplasmáticos de la misma, sugiriendo que la IL-1 β es degradada si la enzima es inhibida. Por otro lado, en neutrófilos estimulados por 4 hs. con LPS+ATP, la IL-1 β pudo ser detectada colocalizando parcialmente

con gp91 (componente de la NADPH oxidasa). Sin embargo, el tratamiento con DPI de neutrófilos estimulados con LPS+ATP no afectó la colocalización de la IL-1 β vesicular con Lysotracker red, aunque disminuyó la colocalización de IL-1 β con LC3B. Estos hallazgos indican que la actividad de la NADPH oxidasa es requerida para la secreción de IL-1 β pero este efecto parece ser independiente de la acidificación de las vesículas que contienen a la IL-1 β . Nuestros resultados no descartan que la NADPH oxidasa sea necesaria en otros pasos del proceso de secreción, como ser en la inducción del proceso autofágico o en la exocitosis de las vesículas autofágicas conteniendo IL-1 β . Por último, también determinamos que una porción de la IL-1 β sintetizada puede ser degradada por serin proteasas neutras, cuya actividad estaría determinada por el pH vesicular el cuál podría ser modulado por la actividad V-ATPasa.

En conjunto, los hallazgos de este trabajo sugieren que la secreción de IL-1 β en neutrófilos podría involucrar un mecanismo de autofagia secretoria y que la cantidad de IL-1 β secretada dependería de su resistencia a ser degradada por proteasas antes de ser conducida al medio extracelular.

Palabras clave: *neutrófilo, IL-1 β , autofagia, LC3B, NADPH oxidasa.*

Regulation of the Human Neutrophil IL-1 β secretion

Interleukin-1 β IL-1 β is a pro-inflammatory cytokine synthesized in the cytoplasm as an inactive precursor (proIL-1 β), which after proteolytical processing is secreted by poorly-defined pathways different from the canonical ER-Golgi route of secretion. In this work we investigated the mechanisms involved in the secretion of IL-1 β in human peripheral blood neutrophils. We determined that the autophagy inhibitors like 3-methyladenine and Wortmannin, and the blockers of the autophagy flux such as Bafilomycin A1 or E64d, markedly reduced IL-1 β secretion induced by 5 h stimulation with LPS or LPS+ATP. In neutrophil-differentiated PLB985 cells, siRNA knockdown of ATG5 abolished IL-1 β secretion. Upon 4 h of LPS+ATP stimulation, IL-1 β showed a vesicular distribution co-localizing with LC3B, a marker of autophagy vesicles by confocal microscopy. Furthermore, stimulation of autophagy by cell starvation markedly increased IL-1 β and LC3B colocalization at 4 h p.s. and significantly promoted IL-1 β secretion induced by LPS+ATP at 5 h p.s.

Given that IL-1 β secretion in neutrophils requires an active NADPH oxidase (NADPHox), we tested the hypothesis if the activity of this enzyme could be required to avoid the acidification of vesicles containing IL-1 β and consequently IL-1 β degradation in an acidic compartment. Supporting this possibility, the treatment of neutrophils stimulated by LPS+ATP with NADPHox inhibitors like DPI or Apocynin inhibited IL-1 β secretion and did not induce IL-1 β intracellular accumulation, suggesting that NADPHox inhibition promoted IL-1 β degradation. Moreover, we observed by confocal microscopy that IL-1 β partially colocalized with gp91 (the NOX component of NADPHox) upon stimulation of neutrophils with LPS+ATP. However, the treatment with DPI did not affect the vesicular colocalization of IL-1 β with Lysotracker red, even though colocalization of IL-1 β and LC3B decreased. These findings suggest that NADPHox is required for the secretion of IL-1 β , but this requirement appears to be independent of the regulation of the acidification of the IL-1 β -containing vesicles. Our results do not rule out that NADPHox can be necessary for other steps in the secretion process, such as in the autophagy induction or the exocytosis of the content of autophagy vesicles. Finally, we also determined that a portion of the synthesized IL-1 β can be degraded by neutral serineproteases, whose activity would be determined by the vesicular pH which might be modulated by the V-ATPase activity. Taken together the findings of this work suggest that IL-

IL-1 β secretion in neutrophils could involve a mechanism of secretory autophagy, and that the amount of IL-1 β secreted would depend on their resistance to be degraded by proteases before being driven to the extracellular medium.

Key words: *neutrophil, IL-1 β , autophagy, LC3B, NADPH oxidase.*

Agradecimientos

Hay muchas formas de escribir esta sección, todas validas en algún punto pero ninguna que pueda sentir verdadera. Por eso voy a agradecer personalmente y no escribir nada mas. Si estas leyendo esto, probablemente ya te dije todo lo que quería decir.

Índice general

1. Introducción	14
1.1. Generalidades del neutrófilo	14
1.1.1. Origen y Maduración	14
1.1.2. Cantidad, tamaño y morfología	14
1.1.3. Sobrevida	14
1.1.4. Gránulos y Vesículas Secretorias	15
1.1.5. Mecanismos microbicidas	16
1.2. Rol de los neutrófilos en la respuesta inmune	17
1.3. Producción de citoquinas por los neutrófilos	18
1.4. Control de la producción de neutrófilos en el contexto de la respuesta antiinfecciosa	18
1.5. Rol de la NADPH oxidasa en las respuestas microbicidas	20
1.6. Regulación del pH intrafagosomal	23
1.7. Interleuquina 1	23
1.7.1. Inflamasoma	25
1.7.2. Mecanismos de procesamiento independientes de caspasa-1	26
1.7.3. Actividad biológica de IL-1 β	26
1.8. Mecanismos propuestos para la secreción de IL-1 β	27
1.8.1. Ectosomas, exosomas y cuerpos multivesiculares	27
1.8.2. Mecanismos de secreción convencional y no convencional de proteínas	28
1.8.3. Mecanismos que podrían mediar la liberación de IL-1 β	29
1.9. Autofagia	30
1.9.1. Generalidades	30
1.9.2. Proceso de degradación autofágica y vesículas involucradas	32
1.9.3. Sistema de conjugación tipo ubiquitina	33
1.9.4. Autofagia y secreción	34
2. Objetivos	36
3. Materiales y Métodos	37
3.1. Purificación de neutrófilos humanos	37
3.2. Líneas celulares	39
3.3. Determinación de la producción de IRO	39

3.4.	Evaluación de la viabilidad Celular	39
3.5.	Reactivos utilizados	40
3.6.	Estimulación de la producción de IL-1 β por neutrófilos	40
3.7.	Esquema de los tratamientos a los que fueron sometidos los neutrófilos	40
3.8.	Cuantificación de citoquinas por ELISA	41
3.9.	Marcaciones intracitoplasmáticas	42
3.9.1.	Fijación y permeabilización	42
3.9.2.	Bloqueo de epítopes inespecíficos	42
3.9.3.	Anticuerpos	42
3.9.3.1.	Inmunomarcación simple	43
3.9.3.2.	Inmunomarcación doble	43
3.9.3.3.	Inmunomarcación triple	44
3.9.4.	Tinción nuclear y montaje	44
3.10.	Microscopia Laser Confocal (MLC)	44
3.11.	Citometría de flujo	44
3.12.	Método de evaluación de autofagia por citometría de flujo	44
3.13.	ARN de interferencia de <i>ATG5</i>	45
3.14.	Metodología de experimentos con lysotracker	45
3.15.	Análisis de la colocalización de imágenes	45
3.16.	Análisis estadístico	46
4.	Resultados	47
4.1.	Determinación del tiempo experimental óptimo para la detección intra y extracelular de IL-1 β	47
4.2.	Determinación de la capacidad del LPS y LPS + ATP de inducir el flujo autofágico en los neutrófilos	50
4.3.	Inhibición de la autofagia y su impacto en la liberación de IL-1 β . . .	55
4.3.1.	Inhibición del flujo autofágico por 3-MA y WN	55
4.3.2.	Inhibición del flujo autofágico mediante el empleo de bafilomicina A1 (Baf A1) y E64d	60
4.3.3.	Efecto de la disminución de la expresión de ATG5 sobre la secreción de IL-1 β por neutrófilos PLB-985	64
4.4.	Inducción de la Autofagia en neutrófilos y su impacto en la liberación de IL-1 β	65
4.5.	Identificación de IL-1 β en vesículas autofágicas	68
4.6.	Relación temporal entre la inducción de la autofagia y la secreción de IL-1 β	71
4.7.	Evaluación de los niveles de IL-1 β intracelulares, con el tratamiento con Baf-A1 y 3-MA	72
4.8.	Identificación de la NADPH oxidasa en vesículas que contienen IL-1 β	74
4.9.	Efecto de la inhibición de la NADPH oxidasa sobre la expresión intracelular de IL-1 β y su secreción	75
4.10.	Evaluación de la acidificación vesicular tras la inhibición de la NADPH oxidasa	78

4.11. Análisis de colocalización en vesículas ácidas IL-1 β /LC3B+ positivas	81
4.12. Análisis in <i>sillico</i> de posibles sitios de corte en la secuencia de aminoácidos de IL-1 β	86
4.13. Efecto de la inhibición de proteasas ácidas sobre la secreción y el contenido de IL-1 β intracelular del neutrófilo	87
4.14. Efecto de la inhibición de proteasas neutras sobre la secreción y el contenido intracelular de IL-1 β	89
5. Discusión	92
Referencias	101

Índice de figuras

1.1.	Propiedades neutrófilos	17
1.2.	Producción de citoquinas en neutrófilos.	18
1.3.	Regulación de la producción de los neutrófilos	20
1.4.	Esquema de producción de IROS en Fagosoma	22
1.5.	Síntesis, maduración y localización celular de la IL-1	24
1.6.	Diferentes tipos de autofagia	31
1.7.	Vacuolas involucradas en la autofagia	33
1.8.	Proteínas involucradas en la señalización autofágica	34
3.1.	Determinación de monocitos contaminantes	38
3.2.	Perfil FSC SSC de Neutrófilos basales	38
3.3.	Esquema del modelo experimental	41
3.4.	Lista de anticuerpos	43
4.1.	Secreción de IL-1 β tiempos tempranos posestimulación	48
4.2.	Cinética de la producción y secreción de IL-1 β	50
4.3.	La estimulación de neutrófilos incrementa el flujo autofágico	52
4.4.	La estimulación de neutrófilos con LPS+ATP induce el flujo autofágico.	53
4.5.	Evaluación de la autofagia inducida por LPS+ATP por citometría de flujo	55
4.6.	Efecto de concentraciones crecientes de 3-MA sobre la secreción de IL-1 β	56
4.7.	Efecto de la inhibición de la autofagia con 3-MA o WN	57
4.8.	Viabilidad de los neutrófilos frente a 3-MA y WN	58
4.9.	Efecto de la inhibición de la autofagia con 3-MA o WN sobre la secreción de IL-8	59
4.10.	Efecto del tratamiento con Baf A1 previo y posterior a la estimulación de los neutrófilos con LPS	61
4.11.	Efecto de la inhibición del flujo autofágico con Baf A1 IL-1 β	61
4.12.	Viabilidad frente a Baf A1	62
4.13.	Efecto de la inhibición del flujo autofágico con Baf A1 sobre la secreción de IL-8	63
4.14.	Efecto de la inhibición del flujo autofágico con E64d IL-1 β	63
4.15.	Secreción de IL-1 β por neutrófilos PLB-985	64
4.16.	Inhibición de <i>ATG5</i> por siRNA	65

4.17. Efecto de la inducción de autofagia sobre la secreción de IL-1 β por neutrófilos	66
4.18. ELISA de IL-8 Hambreado	67
4.19. Viabilidad frente al Hambreado celular	68
4.20. Colocalización LC3B/IL-1 β	69
4.21. % células LC3B/IL-1 β colocalizantes	70
4.22. Vesículas LC3B/IL-1 β frente Hambreado	71
4.23. Relación entre la secreción de IL-1 β y autofagia	72
4.24. Efecto del tratamiento con 3-MA y Baf A1 sobre la secreción y expresión intracelular de IL-1 β	73
4.25. Colocalización de IL-1 β , con gp91 y LC3B	75
4.26. Efecto del tratamiento con DPI sobre la secreción y expresión intracelular de IL-1 β	76
4.27. Efecto del tratamiento con apocinina sobre la secreción y expresión intracelular de IL-1 β	77
4.28. Tinción con lysotracker Red [®]	78
4.29. Análisis intensidad de fluorescencia vesículas ácidas	80
4.30. Colocalización LC3B/vesículas ácidas/IL-1 β	81
4.31. Diagrama de dispersión de la intensidad de fluorescencia	82
4.32. CP LC3B/IL-1 β /LysotrackerRed	83
4.33. Análisis de ruido de fondo por Costes y Manual	85
4.34. Gráficos de los valores de Manders	86
4.35. Predicción in <i>sillico</i> de sitios de corte para proteasas en la proIL-1 β	87
4.36. Efecto del tratamiento con E64d sobre la secreción de IL-1 β los niveles de expresión intracelular.	88
4.37. Evaluación de la viabilidad de los neutrófilos tratados con E64d.	89
4.38. Inhibición de proteasas por AEBSF	90
5.1. Modelo propuesto	99

Abreviaturas

3-MA 3-Metiladenina

7-AAD 7-aminoactinomicina D

IL-1 β Interleuquina-1 beta

AMC Autofagia mediada por chaperonas

ATGs del ingles *Autophagy-related proteins*

ATP Adenosina trifosfato

Baf A1 Bafilomicina A1

BSA Seroalbúmina bovina

CMV Cuerpos multivesiculares

CP Coeficiente de Pearson

CPAs Células Presentadoras de Antígeno

DAMP Patrones moleculares asociados al daño

DCs Células Dendríticas

DHR123 Dihidrorhodamina

DMF Dimetilformamida

EBSS Earle's Balanced Salt Solution

EGC-X Enfermedad granulomatosa crónica ligada al X

ELISA del ingles *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* - Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FITC Isotiocinato de Fluoresceína

FSC del ingles *forward-scattered light*

G-CSF Factor estimulante de colonias de granulocitos

HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Inmunoglobulina
IL-17A	Interleuquina-17A
IL-1Ra	Antagonista del receptor de IL-1
IP	Ioduro de Propidio
IRO	Intermediarios Reactivos del Oxígeno
LAMP	del inglés <i>Lysosomal Associated Membrane Protein</i>
LPS	Lipopolisacárido
LT	del inglés <i>Lysotracker Red</i>
MLC	Microscopia Laser Confocal
MMP9	Metaloproteínasa de matriz 9
MPO	Mieloperoxidasa
mTORC	del inglés <i>Mammalian Target of Rapamycin Complex</i>
MVs	Microvesículas
NF- κ B	Factor nuclear κ B
ON	del inglés <i>Over Night</i> - Durante la noche
p.e.	postestimulación
PAMP	del inglés <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> - Patrones moleculares asociados al daño
PAS	del inglés <i>Phagophore assembly site</i>
PBS	Buffer Fosfato Salino
PE	ficoeritrina
PFA	Paraformaldehído
PI3KC1	Fosfatidil inositol 3- quinasa clase 1
PI3KC3	Fosfatidil inositol 3- quinasa clase 3
PMAP	del inglés <i>Pattern Recognition Receptor</i> - Patrones moleculares asociados a patógenos
RE	Retículo endoplasmático

RER	Retículo endoplasmático rugoso
RRP	Receptores de reconocimiento de patrones
SFB	Suero Fetal Bovino
SPN	Serin proteasas del neutrófilo
SSC	del ingles <i>Side-scattered light</i>
SVs	del ingles <i>Sotorage vesicles</i>
TA	Temperatura Ambiente
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF	del ingles <i>Tumor necrosis factor</i>
v-ATPasa	ATPasa vacuolar
WN	Wortmanina

Capítulo 1

Introducción

1.1. Generalidades del neutrófilo

1.1.1. Origen y Maduración

Los neutrófilos son células de origen mieloide que se generan y maduran en la médula ósea. La producción de este tipo celular es continua, con valores que pueden llegar a los 2×10^{11} células por día [1], número que aumenta durante un proceso inflamatorio. Su producción está fuertemente regulada y controlada positiva y negativamente por diferentes tipos celulares que interactúan entre sí, siendo el componente principal que controla este proceso el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) [2] que estimula a los precursores neutrofílicos. Los macrófagos residentes en los tejidos y las células dendríticas producen IL-23, que controla la liberación de la interleuquina 17A (IL-17A) por células T $\gamma\delta$ y células natural killer T (NKT) [3], citoquina que estimula directamente la producción de G-CSF y aumenta entonces la cantidad de neutrófilos. En condiciones inflamatorias, luego de un período de tiempo, los neutrófilos mueren por apoptosis, son removidos por macrófagos y células dendríticas, los cuales frente a este estímulo sintetizan una menor cantidad de IL-23, que en consecuencia reduce el G-CSF liberado, y por ende, la producción de neutrófilos [4]. Durante la maduración, los neutrófilos atraviesan diferentes estadios, desde Mieloblasto, Promielocito, Mielocito, Metamielocito, célula en banda y finalmente célula segmentada (Polimorfonuclear) [1]

1.1.2. Cantidad, tamaño y morfología

En el humano el 50-70% de los leucocitos circulantes son neutrófilos [5]. Un neutrófilo en circulación tiene un diámetro promedio de $7-10\mu\text{m}$, un núcleo segmentado, y un citoplasma enriquecido en gránulos y vesículas secretorias [1].

1.1.3. Sobrevida

Los neutrófilos fueron siempre considerados células de corta vida media en circulación, siendo de aproximadamente de 1,5 horas en ratones y 8 horas en huma-

nos [6, 7]. Estudios realizados por Pillary y colaboradores desafiaron este concepto, proponiendo que en condiciones homeostáticas la vida media en circulación de un neutrófilo puede extenderse hasta 12,5 horas en los ratones y a 5,4 días en los humanos [6]. No obstante, estudios posteriores cuestionaron estos hallazgos sosteniendo que el método empleado muy probablemente refleje la vida media de neutrófilos madurando en médula ósea [8, 9]. En condiciones inflamatorias, sin embargo, se sabe que los neutrófilos se activan y su vida media puede ser modulada por diversos mediadores. La misma puede ser reducida o incrementada. De hecho, la sobrevivida puede prolongarse marcadamente, lo que asegura la presencia de neutrófilos primados en el sitio de inflamación [10, 11]. Este incremento de la sobrevivida puede estar mediado por diferentes citoquinas y factores de crecimiento, así como también por productos bacterianos [11, 12]. Un periodo de sobrevivida mayor podría permitir al neutrófilo llevar a cabo actividades más complejas en los tejidos, como contribuir en la resolución de la inflamación o modular la respuesta adaptativa, aunque también su persistencia en los tejidos podría conducir a daño celular colateral no deseado [13].

1.1.4. Gránulos y Vesículas Secretorias

Un rasgo distintivo de la morfología del neutrófilo es su gran cantidad de gránulos y vesículas secretorias, para los cuales existe más de una posible clasificación.

La principal discriminación sistemática entre los gránulos se da por las diferencias en el contenido proteico de los mismos [14]. Es importante notar que esta diferencia no se debe a una distribución activa, es decir, a una distribución diferencial de cada proteína en cada uno de estos gránulos preformados, sino a una localización dependiente del tiempo. Se postula que el llenado de los gránulos y vesículas en formación ocurre conforme la célula madura [15]. Dado que distintas proteínas granulares se sintetizan en diferentes estadios de la diferenciación terminal del neutrófilo, el contenido de los gránulos que se producen durante las primeras etapas de la maduración, por ejemplo en el estadio de promielocito, diferirá del de los formados en los estadios más tardíos.

Algunas proteínas granulares se encuentran en más de un tipo de gránulo, mientras otras están restringidas a un único tipo. No obstante, se vio que en general existe una distribución continua de proteínas entre los diferentes gránulos, y que la exclusividad de un tipo proteico es más la excepción que la regla. Sí es cierto, que si bien la mayoría de los gránulos poseen la misma diversidad proteica, difieren significativamente en la proporción de las mismas, siendo algunas de ellas muy abundantes en unos y muy reducidas en otros [16].

Por otro lado se vio, además, que los diferentes gránulos difieren fuertemente en su capacidad de ser movilizados frente a estímulos [17, 18]. Así, los gránulos formados durante las etapas más tardías de la diferenciación son más inducibles a la movilización que aquellos formados en las primeras etapas del desarrollo del neutrófilo. Por ejemplo los gránulos denominados primarios o azurófilos, formados en las primeras etapas del desarrollo, se fusionan principalmente con fagosomas, y

sólo una pequeña porción de su contenido es exocitado al exterior [19, 20].

Teniendo esto en cuenta, la mayoría de las clasificaciones reconoce la existencia de tres tipos principales de gránulos diferentes, que se desarrollan durante la maduración del neutrófilo, y que poseen abundante cantidad de proteínas proinflamatorias [1, 7, 21]. Estos son los gránulos azurófilos (primarios), que contienen mieloperoxidasa (MPO), elastasa, catepsina G y preteína 3, entre otras proteínas; los gránulos específicos (secundarios), que contienen lactoferrina, y por último los gránulos de gelatinasa (terciarios), que contiene metaloproteínasa de matriz 9 (MMP9; también conocida como gelatinasa B). No obstante, también se ha definido la existencia de un cuarto tipo de gránulos conocidos con gránulos de ficolina, en los cuales se ha identificado la presencia de cisteína proteasas lisosomales como las Cathepsinas Z, H, B, S, y la aspartil proteasa lisosomal catepsina D [16]. La existencia de múltiples tipos de gránulos puede ser explicada por el hecho de que muchas proteínas no pueden coexistir en su forma nativa. Un ejemplo de esto es la elastasa que digiere a la lipocalina asociada a gelatinasa (NGAL) de neutrófilos [1]. Los neutrófilos también contienen múltiples vesículas de fácil movilidad, llamadas Vesículas secretorias. Éstas se forman por endocitosis al final de la granulopoyesis [22]. Como su nombre lo indica, las vesículas secretorias constituyen las organelas más fácilmente exocitables del neutrófilo, las cuales transportan una gran variedad de proteínas de membrana esenciales para la interacción con el endotelio [23]. Por ejemplo, frente a la activación de neutrófilos en circulación, las vesículas secretorias se fusionan con la membrana plasmática, transportando a la superficie celular moléculas que son requeridas para la adhesión del neutrófilo al endotelio, como por ejemplo, las $\beta 2$ integrinas [24]. También se identificaron en neutrófilos, al menos otras dos organelas movilizables, los cuerpos multivesiculares/endosomas tardíos y los endosomas de reciclado [25].

1.1.5. Mecanismos microbicidas

Los neutrófilos constituyen la primera línea de defensa frente a infecciones, siendo capaces de eliminar diferentes patógenos por vías tanto intra como extracelulares. Son células con una gran capacidad fagocítica de microorganismos. Una vez dentro de la célula, y contenido dentro de un fagosoma, el patógeno es eliminado debido a la activación de mecanismos dependientes de la actividad de la enzima NADPH oxidasa (en un proceso que involucra la producción de intermediarios del oxígeno) o mediante una plétora de proteínas antibacterianas, entre ellas las serinproteasas (SPN), catepsinas, defensinas, lactoferrina y lisozima [1, 21] que son liberadas desde los gránulos directamente al fagosoma. Los neutrófilos son también capaces de enviar estas proteínas al espacio extracelular, por lo que pueden atacar patógenos no internalizados, a través de la formación de las llamadas trampas extracelulares del neutrófilo (NETs). Las NETs están compuestas principalmente por el ADN nuclear que es liberado por el neutrófilo acoplado a histonas y diferentes proteínas granulares, citoplasmáticas y nucleares, que le confieren propiedades microbicidas. Algunos ejemplos de estas proteínas son la lactoferrina, la catepsina G, la mieloperoxidasa y la elastasa, provenientes de gránulos del neutrófilo [26]. Se propone que además

de un efecto microbicida directo, las NETs inmovilizarían patógenos previniendo entonces su dispersión y facilitando su posterior fagocitosis [27, 28].

Propiedades Básicas de los neutrófilos	
Fenotipo	MPO ⁺ , Núcleo Polilobulado
Origen	Médula Ósea
Sitio de maduración	Médula Ósea
Células maduras en circulación	Si
Reclutamiento de células maduras de circulación a tejidos	Si
Sobrevida	De 8hs-18hs a días (existe controversia)
Capacidad Fagocítica	Si
Detectan patógenos y señales de daño	Si

Figura 1.1: Propiedades básicas de los neutrófilos.

1.2. Rol de los neutrófilos en la respuesta inmune

Una de las características distintivas y mejor caracterizadas en este tipo celular, es su capacidad fagocítica. Es por esto que a los neutrófilos se los asocia normalmente con la inmunidad innata. En este contexto, los neutrófilos son reclutadas al sitio de infección en respuesta a diferentes mediadores quimioattractantes, donde actúan como agentes antimicrobianos [13, 29] y facilitan el reclutamiento posterior de monocitos y células dendríticas (DCs), modulando la diferenciación de los macrófagos a un perfil pro o antiinflamatorio [30-32].

La presencia de neutrófilos en el sitio de infección es esencial para controlar el crecimiento de bacterias y hongos, e impedir una propagación sistémica de la infección [33]. En experimentos donde se depletaron de neutrófilos a ratones y se los infectó con *Staphylococcus aureus*, se vio una marcada inhibición en la eliminación de la bacteria [33, 34]. El rol crucial de estas células también se evidencia en pacientes que sufren neutropenias, o desordenes en la funcionalidad de sus neutrófilos, los cuales se caracterizan por padecer una severa susceptibilidad a infecciones de naturaleza bacteriana y fúngica [35-37].

Los neutrófilos reclutados a sitios de infección reconocen a los microorganismos gracias a que poseen receptores de reconocimiento de patrones (RRP), los cuales se activan en respuesta a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) [38, 39] y señales endógenas de daño (DAMP). Los PAMP son estructuras moleculares compartidas por diferentes patógenos, que son esenciales para la sobrevida o patogenicidad de los mismos [40, 41]. La activación de RRP inicia una cascada de señales que lleva a la producción de mediadores inflamatorios que intentan eliminar el microorganismo. Esto conlleva a la amplificación del proceso inflamatorio, incluida la migración de nuevas olas de neutrófilos al sitio de infección [42], donde inducen la muerte de patógenos vía fagocitosis, degranulación, y la liberación de NET [43, 44].

1.3. Producción de citoquinas por los neutrófilos

Los neutrófilos, espontáneamente o tras ser apropiadamente estimulados, son también capaces de expresar y/o producir un gran número de citoquinas, quimiocinas y factores angiogénicos. Ver Figura 1.2. La expresión y/o producción de estos factores ha sido validada no solo por técnicas de expresión génica, sino también por inmunohistoquímica, ELISA y ensayos biológicos específicos fundamentalmente en células de ratón y en algunos casos en neutrófilos humanos.

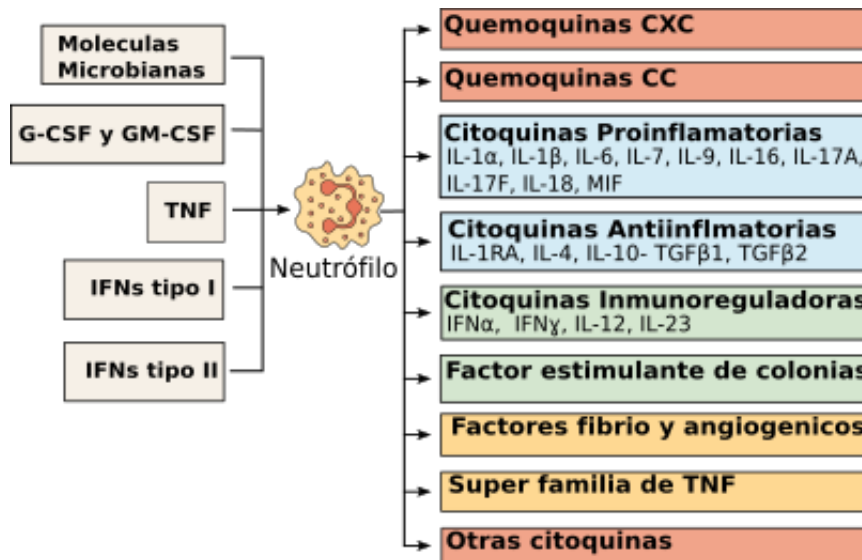


Figura 1.2: Producción de citoquinas en neutrófilos.

Al evaluar la producción de citoquinas por los neutrófilos y compararla con la producción mediada por macrófagos o monocitos, se observa que la mediada por neutrófilos es de menor envergadura. Sin embargo los neutrófilos generalmente superan entre uno y dos órdenes de magnitud en número a estas células en el sitio de inflamación, por lo que pueden ser una fuente muy importante de citoquinas en el sitio donde se monta la respuesta [45].

1.4. Control de la producción de neutrófilos en el contexto de la respuesta antiinfecciosa

En el transcurso de una respuesta inmune frente a una infección, los neutrófilos interactúan con monocitos, células dendríticas, células T y células B en forma bidireccional, de modo tal de montar una respuesta inmune adecuada. Ver Figura 1.3. A través de contacto célula-célula y/o por secreción de productos solubles, los neutrófilos reclutan y activan monocitos, CD y linfocitos. A su vez los productos de monocitos, macrófagos y células T activan al neutrófilo. Esta retroalimentación es limitada por la corta vida media de los neutrófilos en relación al proceso inflamatorio total. Son los macrófagos de los tejidos, los que al fagocitar a los neutrófilos

apoptóticos, disminuyen su secreción de interleuquina 23 (IL-23), la cual, como mencionamos previamente, a través de promover la secreción de IL-17 modula los niveles de G-CSF, factor clave para promover la proliferación de precursores de neutrófilos y liberar neutrófilos a circulación. De esta manera, la reducción de la producción de G-CSF, disminuye la producción de neutrófilos por la médula ósea, reduciendo la disponibilidad de neutrófilos a ser reclutados al sitio dónde se inició la infección [43].

El neutrófilo es también capaz de inducir daño a células y tejidos propios [46, 47]. Este daño es tan común, que el sistema inmune posee varios mecanismos para juzgar cuándo movilizar una respuesta. De hecho, el daño en tejidos es una de las fuentes principales de información que dispara la inflamación, la cual a su vez, induce otros mecanismos inmunes. No obstante, aunque el daño de tejidos ocasionado por los neutrófilos es inevitable durante una infección, debe ser minimizado. Por este motivo, los neutrófilos deben ser rápidamente removidos para evitar que ocasionen efectos perjudiciales a los tejidos inflamados. Mecanismos de regulación de la producción y liberación de neutrófilos como el mencionado en el párrafo precedente, contribuyen a disminuir el daño de tejidos y evitar el desarrollo de respuestas inflamatorias crónicas perjudiciales para el hospedador

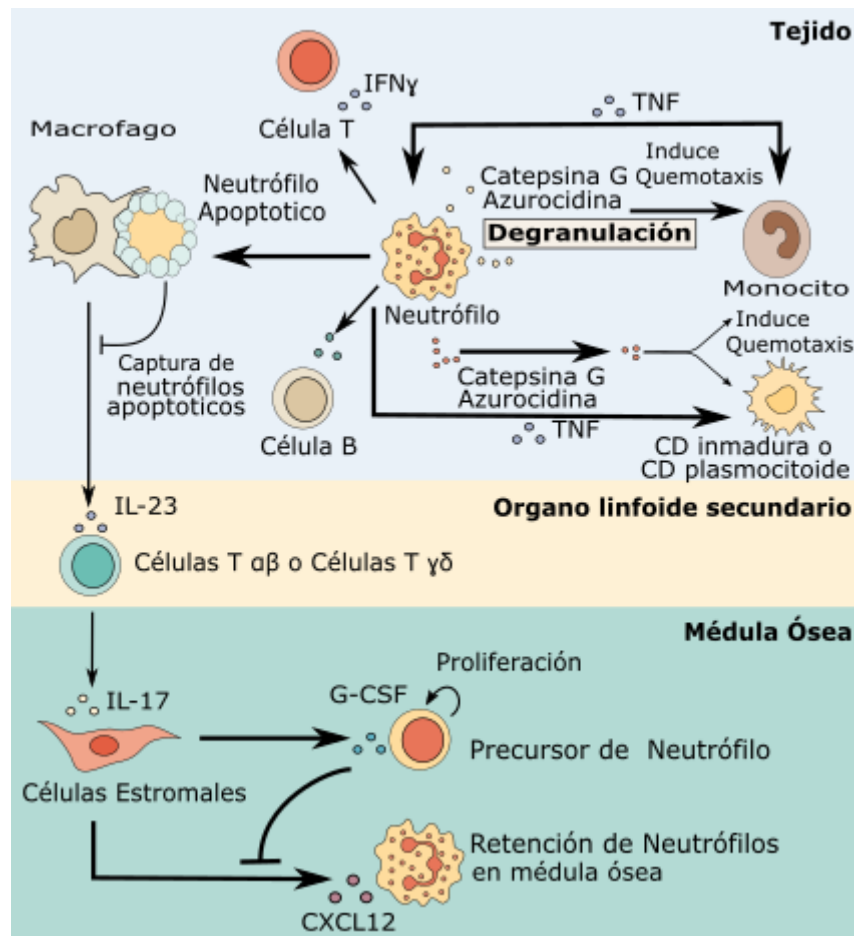


Figura 1.3: Regulación de la producción de los neutrófilos, e interacción con otras células del sistema inmune. *Modificado de Neutrophils and immunity: challenges and opportunities* [43]

1.5. Rol de la NADPH oxidasa en las respuestas microbicidas

Como ya hemos mencionado, los neutrófilos fagocitan microorganismos y activan mecanismos microbicidas para mediar su eliminación. Uno de estos mecanismos involucra la generación de IRO dentro del fagosoma. La enzima responsable de la generación de IRO es la NADPH oxidasa. Esta enzima está formada por cinco componentes: tres de ellos están presentes como un complejo citosólico (p40phox, p47phox y p67phox), mientras que dos (p22phox y gp91phox) están localizados en la membrana plasmática, y en las membranas de las vesículas secretorias y gránulos específicos del neutrófilo, como una flavohemoproteína heterodimérica conocida como citocromo b558. La separación física de sus componentes garantiza la inactividad de la enzima en condiciones en las que el neutrófilo se encuentra en reposo. Cuando

la célula es estimulada por agonistas proinflamatorios, los componentes citosólicos se translocan a la membrana plasmática y a la membrana del endosoma naciente (a las cuales han contribuido con sus membranas las vesículas secretorias y los gránulos específicos), y se asocian al citocromo b558 generando una oxidasa activa [48].

La NADPH oxidasa inicia el estallido respiratorio translocando electrones desde el NADPH citosólico al oxígeno en el lumen del fagosoma permitiendo la generación de anión superóxido. Esta especie es dismutada a peróxido de hidrógeno por acción de la superóxido dismutasa (Figura 1.4). El peróxido de hidrógeno es a su vez sustrato de la mieloperoxidasa (MPO), la cual cataliza la generación de hipohalitos como el hipoclorito (HClO), un oxidante fuerte derivado del peróxido de hidrógeno e iones cloruro, el cual a su vez puede interactuar con pequeñas moléculas como el NH_3 para formar monocloroaminas (NH_2Cl), o con otros IRO generando peroxinitritos (ONOO^-), radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), y ozono (O_3^-) [49].

La importancia antiinfecciosa de los mecanismos microbicidas dependientes del oxígeno se pone en manifiesto en los pacientes que sufren enfermedad granulomatosa crónica (EGC), una inmunodeficiencia caracterizada por infecciones recurrentes por un espectro acotado de bacterias y hongos (generalmente *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens*, *Salmonella*, *Bacilo Calmette-Guerin* (BCG), *Micobacterium tuberculosis*, *Nocardia* y *Aspergillus*) [50]. Estos pacientes también presentan complicaciones de tipo inflamatorias, que son más prominentes en el tracto gastrointestinal y genitourinario [50]. La EGC es causada por mutaciones en alguna de las subunidades de la NADPH oxidasa que ocasionan una pérdida parcial o total de actividad enzimática. Los fagocitos logran fagocitar a los microorganismos invasores, pero no pueden destruir a aquellos que sólo son susceptibles a la acción de los IRO. La forma más frecuente de la enfermedad (2/3 de los casos) es la ocasionada por mutaciones en gp91phox. Estudios realizados en un paciente EGC han identificado al fosfatidil inositol 3 fosfato, un producto de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K), como el blanco del dominio PX de la p40phox en la membrana de los fagosomas [51-55]. Este dominio es necesario para el ensamblaje estable de la NADPH oxidasa en el fagosoma. A diferencia otras mutaciones asociadas a EGC, este paciente producía valores normales de IRO en respuesta a agonistas solubles pero era incapaz de producir IRO dentro del fagosoma.

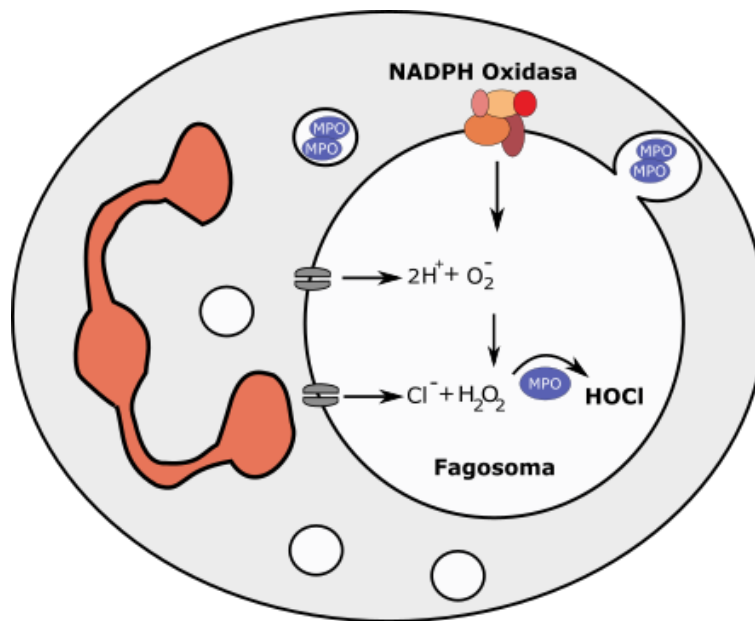


Figura 1.4: Producción de IRO por acción de la NADPH oxidasa. Después de la fagocitosis, los gránulos se fusionan y liberan su contenido al interior fagosoma. La fusión de gránulos primarios o azurófilos permite liberar MPO dentro del fagosoma. La activación de la NADPH oxidasa en la membrana fagosomal conduce a generar anión superóxido, el cual es convertido en peróxido de hidrógeno. La MPO utiliza al peróxido de hidrógeno para catalizar la producción de potentes moléculas antimicrobianas, como el hipoclorito.

La importancia de los IRO en la inducción de la muerte de los microorganismos fagocitados se sustenta en antecedentes relevantes. La falta de producción de O_2^- y H_2O_2 en condiciones anaeróbicas y en pacientes CGD afecta la capacidad de matar microorganismos [56, 57]. Los neutrófilos iodinan y clorinan proteínas cuando las bacterias son fagocitadas, y la halogenación es dependiente de una NADPH oxidasa activa y de la MPO [58]. Sin embargo, no puede despreciarse la contribución de las proteínas granulares del neutrófilo a la muerte de los microorganismos dentro del fagosoma. Esto es puesto en evidencia por el hecho que los pacientes ECG sólo se infectan con ciertas bacterias pero pueden resolver procesos infecciosos mediados por otras. Distintos trabajos generaron modelos de ratón que carecen de las proteasas principales del neutrófilo, como la elastasa [59, 60], la catepsina G, [59], o ambas enzimas [61-63]. En estos estudios de ratones deficientes en proteasas, la capacidad microbicida fue completamente abolida, a pesar de tener un estallido respiratorio normal. Esto pone de manifiesto que la combinación de la actividad de la NADPH oxidasa y la acción de proteasas neutras es esencial para una óptima acción microbicida.

Cabe mencionar que además de su rol en los mecanismos microbicidas del neutrófilo, los IRO han sido implicados en una amplia variedad de procesos fisiológicos de señalización [64, 65]. En particular, se determinó que los IRO activan al factor nu-

clear kB(NF-kB) [66]. En el neutrófilo se ha demostrado que los IRO modulan la actividad de quinasas y fosfatasas [67-69]; así como también de receptores de membrana involucrados en la fagocitosis, en la secreción de gránulos [70] y la apoptosis [71, 72]. También existen reportes indicando que los IRO inducen autofagia en los neutrófilo [73].

1.6. Regulación del pH intrafagosomal

La NADPH oxidasa activada transporta electrones desde el NADPH citosólico al oxígeno molecular para generar anión superóxido en el interior del fagosoma. Por ello, si no existieran mecanismos compensatorios de la carga, se produciría una fuerte despolarización de la membrana del fagosoma y una acidificación intracelular, que llevarían a la rápida inhibición de la propia oxidasa [74, 75]. Esto es evitado principalmente por la actividad de Hv1, un canal de protones dependiente de voltaje [75], situado en la membrana plasmática y en la membrana de gránulos peroxidasa negativos [76], que además se asocia con los fagosomas nacientes [76, 77]. Estudios previos demostraron que neutrófilos de ratones que carecen de Hv1, producen entre un 35 y un 70 % menos anión superóxido y peróxido de hidrógeno [78, 79], lo que demuestra el rol necesario de los canales Hv1 en mantener la actividad oxidativa. La actividad del canal Hv1 contribuye, además, a mantener un pH neutro dentro de los fagosomas del neutrófilo [80]. La regulación del pH es un factor relevante en la actividad microbicida de los neutrófilos, ya que permite actuar a la principales proteasas degradativas del neutrófilo, elastasa, catépsina G y proteinasa 3, que son serinproteasas neutras cuya actividad es óptima a pH 7,5-8.

1.7. Interleuquina 1

Como ya hemos mencionado, además de su capacidad microbicida, los neutrófilos tienen la habilidad de producir citoquinas. Entre ellas se encuentra la IL-1 β . Además de los neutrófilos, una amplia variedad de células es capaz de producir IL-1 β , incluyendo monocitos, macrófagos, linfocitos, células NK, células de la glía, queratinocitos, células epiteliales y endoteliales, musculo liso y fibroblastos [81]. La IL-1 β pertenece a una familia constituida por 11 citoquinas que juegan un rol central en la regulación de la inmunidad y las respuestas inflamatorias. Dentro de este grupo, la IL-1 α y la IL-1 β son los miembros mejor estudiados ya que median fuertes efectos proinflamatorios.

Los genes que codifican para IL-1 α y IL-1 β se encuentran ubicados contiguos en el cromosoma 2 [82]. La IL-1 α y IL-1 β son sintetizadas como un precursor de 31kDa (proIL-1 α y proIL-1 β). La proIL-1 β es biológicamente inactiva, y debe ser clivada a una forma de 17 kDa para ejercer su función biológica [83, 84]. El mecanismo mejor estudiado que conduce al procesamiento de la proIL-1 β involucra a la enzima caspasa-1. Ésta es una proteasa citoplasmática que corta un fragmento N-terminal de 166 aa, convirtiendo al precursor en su forma activa de 17 kDa [85].

Otros trabajos, incluidos nuestros estudios previos, también reportaron mecanismos de procesamiento independientes de caspasa-1, aunque la naturaleza de los mismos y su contribución al desarrollo de las respuestas inflamatorias es aún controvertida [86-88]. Ver Figura 1.5

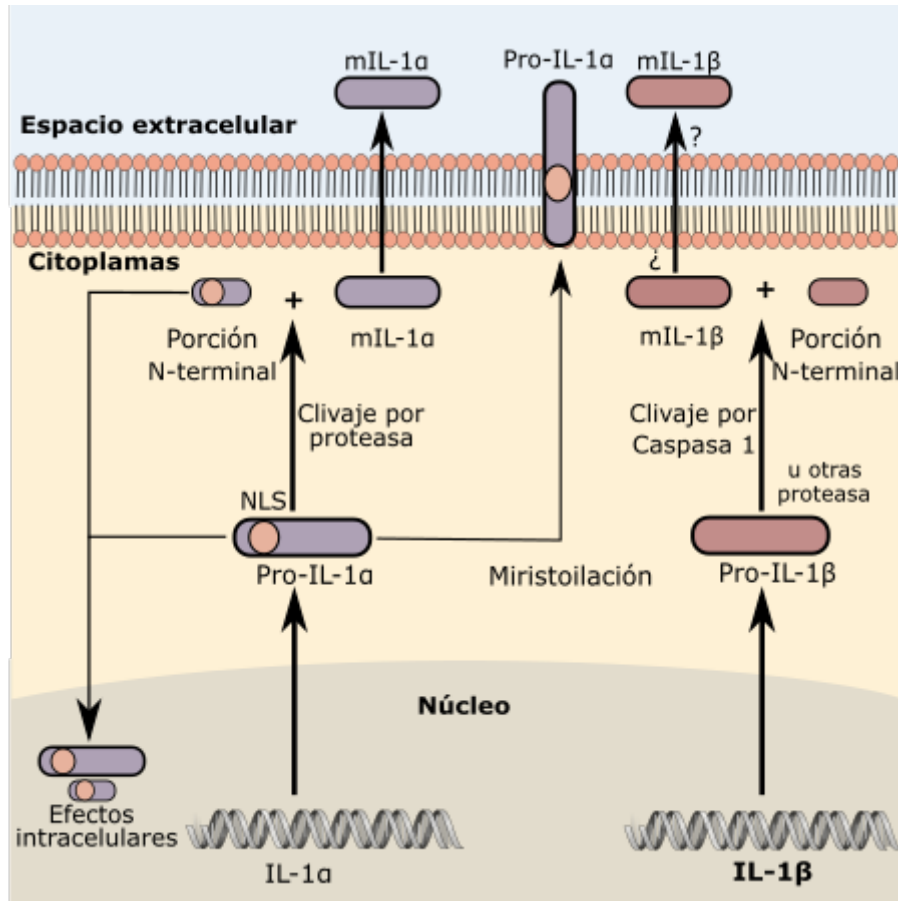


Figura 1.5: Síntesis, maduración y localización celular de la IL-1.

Ambas proteínas son sintetizadas como un precursor sin señal para síntesis en RER, por lo que su secreción es independiente de la vía clásica. La proIL- α es biológicamente activa y ejerce actividad tanto intra como extracelularmente. Mediante la miristoilación de la misma, además de su distribución nuclear, puede aparecer asociada a membrana. La proIL-1 β es clivada por la caspasa 1 a su forma madura, y puede ser secretada por mecanismos no convencionales. *Modificado de Gabay, C. et al. Nat. Rev. Rheumatol. 6, 232-241 (2010)*

Las caspasa-1 es una cisteinproteasa sintetizada como un zimógeno de 45 kDa. Para su activación requiere de un procesamiento proteolítico, el cual ocurre generalmente en forma autocatalítica. Cuando las células son estimuladas con una variedad de agonistas proinflamatorios, como estímulos infecciosos, estímulos estériles o señales endógenas de daño, se produce la activación de receptores tipo NOD

presentes en el citoplasma. Dicha activación conduce a su oligomerización y al reclutamiento de procaspasa-1, llevando a la formación de amplios complejos multiproteicos citoplasmáticos que reciben el nombre de inflammasomas. Una vez en estos complejos, la procaspasa-1 se activa por autoproteólisis, generando una enzima activa que media el procesamiento de la proIL-1 β en su forma biológicamente activa [89].

La activación de la caspasa-1 a través del inflammasoma puede ser estimulada por moléculas derivadas de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, microcristales como sílica, asbesto, urato monosódico y pirofosfato de calcio dehidratado (CPPD), ATP o alterando el balance iónico o estado redox del citoplasma [90, 91]. En este trabajo de Tesis, la activación del inflammasoma fue inducida por ATP. No obstante, nuestros estudios previos indicaron que también como consecuencia de la estimulación con LPS se activa el inflammasoma del neutrófilo.

1.7.1. Inflammasoma

El inflammasoma es un complejo formado por proteínas citosólicas que median respuestas inmunes frente a infecciones microbianas o daño celular [92]. Cuando éste se ensambla, se dispara el clivado proteolítico de la procaspasa-1 a la forma activa llamada caspasa-1, la cual convierte a los precursores proIL-1 β y proIL-18 a las formas maduras y biológicamente activas IL-1 β y IL-18, respectivamente [93, 94].

La formación del inflammasoma requiere de un receptor de reconocimiento de patrones (RRP) que funcione como sensor. Los receptores de tipo NOD (NLR), y los receptores tipo AIM (ALR) constituyen familias de RRP citoplasmáticos clave para la activación del inflammasoma. Hasta la fecha se ha visto que distintos RRP forman inflammasomas: entre ellos el NLRP1, NLRP3, NLRC4, y AIM2. Aunque existen otros miembros de la familia de NLR propuestos en la formación del inflammasomas, su relevancia no está del todo comprendida [95].

Dentro de los inflammasomas, el NLRP3 ha sido el más investigado ya que exhibe un rol clave en distintas enfermedades humanas. Este inflammasoma puede ser activado por ATP, productos microbianos como ciertas toxinas bacterianas formadoras de poros, ARN viral, moléculas endógenas y material particulado [96, 97]. En macrófagos la activación del inflammasoma requiere de una primera señal aportada por componentes bacterianos o señales endógenas de daño (DAMPs), que induce la expresión del receptor NLRP3 (como así también la de la proIL-1 β), y una segunda señal que gatilla la formación del inflammasoma disparada por ATP, toxinas y material particulado [89, 98, 99]. Los neutrófilos, en cambio, expresan constitutivamente NLRP3, y la estimulación LPS no modula la expresión del mismo [88].

1.7.2. Mecanismos de procesamiento independientes de caspasa-1

Además de la caspasa-1, algunas metaloproteasas y serinproteasas son capaces de clivar a la proIL-1 β y generar formas con actividad biológica [84, 100, 101]. Se ha descrito que las metaloproteasas de la matriz como la estromolisina-1, las gelatinasas A y B, y la quimasa, una proteasa presente en mastocitos, pueden procesar al precursor de IL-1 β en formas biológicamente activas [102, 103].

Estudios bioquímicos demostraron que la serinproteasa catepsina G y la metaloproteasa collagenasa logran cortar al precursor de IL-1 β en formas de un tamaño y actividad similar a la IL-1 β madura de 17 kDa obtenida a partir de monocitos activados [100], mientras que la elastasa genera un fragmento de mayor tamaño con actividad biológica reducida [84]. Se ha determinado también que la PR3, presente predominantemente en neutrófilos, es una de las proteasas más potentes capaz de procesar in vitro a la proIL-1 β y generar un fragmento de IL-1 β activo [101, 104]. Por ello, se ha propuesto que en los focos inflamatorios la proIL-1 liberada por distintos tipos celulares podría ser procesada extracelularmente. En sustento de esta posibilidad, se conoce que los monocitos y los neutrófilos en cultivo liberan proIL-1 β [88, 105].

Nuestros estudios previos demostraron que los neutrófilos humanos procesan a la proIL-1 β a través de mecanismos que involucran a la caspasa-1 y la elastasa y/o proteinasa 3 [88].

1.7.3. Actividad Biológica de IL-1 β

La IL-1 β induce una fuerte respuesta proinflamatoria que estimula respuestas tanto locales como sistémicas, por lo que es esencial para el control y resolución de las infecciones [106]. Entre las múltiples funciones descritas para la IL-1 β se encuentran su capacidad de promover el reclutamiento de células inflamatorias al sitio de inflamación mediante la inducción de la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio, y la liberación de citoquinas. Los efectos sistémicos de la IL-1 β incluyen la inducción de hipotensión y fiebre; la promoción de neutrofilia y trombocitosis y la producción de proteínas de la fase aguda [107].

La IL-1 β también está involucrada en regular la respuesta inmune adaptativa al inducir la diferenciación de células T CD4+ en un perfil TH17 en ratones y humanos [108, 109]. En algunas circunstancias estos efectos son perjudiciales, como en el caso de los desórdenes inflamatorios crónicos y en el shock séptico. También está descrito que la IL-1 β estimula la producción de varias metaloproteinasas, que producen la ruptura de tejido conectivo, e inhiben la producción de proteoglicanos y colágenos, por lo que ejercería un efecto global negativo en articulaciones cartilaginosas. Esta citoquina también actúa estimulando la maduración osteoclástica, por lo que participaría en la erosión clásica según modelos de artritis [110].

El rol clave de esta citoquina se evidencia en diferentes enfermedades hereditarias que desarrollan cuadros de autoinflamación exacerbados, causadas por una sobreproducción de la misma, por lo que modular la IL-1 β ha reportado efectos benéficos

en diferentes modelos de enfermedades autoinflamatorias [111].

En relación a la IL-1 β producida por neutrófilos, estudios recientes realizados en un modelo murino de infección cutánea por *Staphylococcus aureus*, demostraron que estas células constituyen la fuente más abundante de IL-1 β durante la infección. Mediante transferencia adoptiva de neutrófilos expresando IL-1 β a ratones knockout para misma, este trabajo demostró que en ausencia de IL-1 β producida por cualquier otro tipo celular, la IL-1 β neutrofílica fue suficiente para restaurar el impedido reclutamiento de neutrófilos, la formación de abscesos en ratones infectados deficientes en IL-1 β y la resolución de la infección [112]. Estudios adicionales realizados en un modelo murino sostienen que la IL-1 β producida por neutrófilos cumple un rol relevante en la defensa de huésped en las etapas tempranas de la infección por Virus Sincicial Respiratorio [113], en la respuesta del huésped a la infección respiratoria y peritoneal con *P. aeruginosa*, y a la infección con *Streptococco del grupo B*. [114, 115]

1.8. Mecanismos propuestos para la secreción de IL-1 β

1.8.1. Ectosomas, exosomas y cuerpos multivesiculares

La secreción de vesículas extracelulares (VE), es decir vesículas que contienen parte del citosol rodeadas por una bicapa lipídica, es un proceso conservado a través de la evolución. Muchas células eucariotas, incluidas las células tumorales, liberan vesículas de forma espontánea o en respuesta a diferentes estímulos [116-118].

Los orígenes, naturaleza y características de estas vesículas son diversos, y es por eso que aparecen en literatura con diferentes nombres. Si bien la nomenclatura es un tema de debate no cerrado [119], suelen distinguirse dos tipos de VE, aquellas que derivan de membranas endosomales, a las cuales se suele denominar exosomas, y aquellas que son ensambladas y liberadas desde la membrana plasmática, que incluyen a las denominadas ectosomas, micropartículas o microvesículas. La VE poseen un tamaño que va desde los 50-1000 nm.

En general se asoció a estas VE con efectos de tipo procagulante y proinflamatorios en diferentes tipos celulares [120, 121]. En particular [122], y de interés para la presente tesis, cabe mencionar que se describió que ectosomas provenientes de monocitos son agentes proinflamatorios importantes que median la rápida secreción de IL-1 β . A su vez, para el caso particular de las VE de los neutrófilos humanos, algunos reportes describieron roles tanto proinflamatorios, como antiinflamatorios [123, 124]. En neutrófilos humanos los ectosomas son generados frente a numerosos estímulos como el LPS, el N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP), proteínas del complemento [124], y citoquinas [125]. El repertorio de proteínas dentro y fuera de los ectosomas depende del tipo de estímulo que dispara su secreción [126]. En relación a los exosomas, cuyo tamaño varía entre 50 y 200 nm se asume que provienen de vesículas del lumen de los llamados cuerpos multivesiculares (CMV),

sin embargo la fusión de estos cuerpos con la MP es un proceso dinámico, por lo que resulta muy compleja la caracterización adecuada del origen de las membranas que los conforman. Las VEs están relacionados a procesos inflamatorios, y resultan particularmente relevantes en determinadas patologías de síndromes respiratorios y daño pulmonar [127]. Además de ejercer un rol en la respuesta inflamatoria, ectosomas del neutrófilo producidos en respuesta a ciertos estímulos son capaces de ejercer una acción microbicida directa [128].

Como su nombre lo indica, los CMV son estructuras membranosas que contienen numerosas vesículas más pequeñas, llamadas vesículas intraluminales. Los CMV fueron descritos originalmente como un tipo de lisosoma secundario, ya que varios procesos de degradación ocurren en estos cuerpos. Sin embargo, su génesis no se conoce con exactitud dado que las vesículas internas pueden provenir del exterior celular (vesículas generadas por invaginación de la membrana de vesículas endocíticas), o del aparato de Golgi.

En neutrófilos resulta particularmente compleja la caracterización de vesículas, ya que como mencionamos, poseen por lo menos cuatro compartimientos secretorios diferenciados (gránulos azurofilos, específicos, de gelatinasa y vesículas de secreción), cuerpos multivesiculares y el llamado compartimiento multilaminar.

En la actualidad se sabe que estas estructuras median una gran variedad de funciones diferentes en la vía endocítica, y por lo tanto, presentan diferente composición y morfología. Sin embargo, los CMV contienen marcadores endocíticos claros, como las proteínas Rab, que los distinguen de otras organelas con membranas internas, como los cuerpos autofágicos o los compartimientos multilaminares [129], aunque en PMN esta reportado que LAMP es expresada en cuerpos multilaminares.

El direccionamiento de proteínas de membrana del Golgi a los CMV y lisosomas es un mecanismo ampliamente utilizado en todas las células eucariotas. Este mecanismo permite destruir proteínas dañadas, además de proteínas que sufran una regulación negativa ayudando incluso a degradar proteínas que estuviesen en membrana y son internalizadas. Proteínas que normalmente se reciclan, como el receptor de transferrina, son incorporados a CMV para una eventual secreción a la superficie celular. Por ende, no todas las proteínas que son enviadas a las vesículas intraluminales son dirigidas necesariamente a degradación, sino que algunas pueden ser secretadas [130].

1.8.2. Mecanismos de secreción convencional y no convencional de proteínas

La gran mayoría de proteínas que van a ser secretadas por las células eucariotas siguen la vía clásica retículo endoplasmático-Golgi. Esta vía depende de que las proteínas a ser secretadas posean una secuencia señal que permita su translocación al interior del RE durante la traducción.

Sin embargo, existe una serie de proteínas que carecen de esa porción peptídica señal y aun así, pueden ser secretadas de la célula por vías alternativas que no han sido completamente esclarecidas. Si bien estas proteínas constituyen un número

reducido respecto de las proteínas de secreción, su rol ha sido generalmente asociado a eventos de sobrevivencia celular, inmunovigilancia y organización de tejidos, por lo que su importancia no puede ser subestimada [131].

En la actualidad, al referirnos a la secreción alternativa de proteínas, reconocemos la existencia de al menos cuatro tipos de mecanismos diferentes, que podemos conceptualmente dividir en dependientes o independientes de vesículas. Dentro de los independientes encontramos aquellos que permiten la secreción de proteínas con capacidad autónoma de translocar a través de la membrana plasmática, y la translocación dependiente de proteínas transportadoras de membrana de tipo ABC. Dentro de los dependientes de vesículas además de las vías exocíticas anteriormente descritas, tenemos las propuestas vías dependiente de autofagia y las llamadas de proteínas de evasión del Golgi (en inglés Golgi Bypass) [131].

1.8.3. Mecanismos que podrían mediar la liberación de IL-1 β

La IL-1 β es una proteína que carece de péptido señal que permita su translocación al RE, por lo que su síntesis tiene lugar en el citoplasma. La misma es secretada por vías no convencionales. Por esta razón, drogas como la brefeldina A, que bloquea el egreso del RE de proteínas secretorias, o la monensina, que bloquea el transporte a través del Golgi, no inhiben la secreción de IL-1 β [132]. Resulta sorprendente que a pesar de ser una citoquina tan ampliamente estudiada, los mecanismos implicados en la secreción de IL-1 β sean tan pobremente comprendidos. A partir de experimentos realizados con monocitos, macrófagos o células dendríticas preincubados con LPS y estimulados con ATP se propusieron distintos modelos para explicar la forma en que la IL-1 β es secretada de las células. Uno de ellos involucra la exocitosis de lisosomas secretorios. Según este modelo, el procesamiento de proIL-1 β tendría lugar dentro de las mismas vesículas que van a ser secretadas, en las cuales también se localizaría la caspasa-1 [132-134]. Este mecanismo utilizaría la red de microtúbulos e involucraría la movilización de Ca²⁺ y la activación de la fosfolipasa A2 para la secreción. Como la movilización de Ca²⁺ se encuentra asociada a los eflujos de K⁺ estimulados por el ATP [133], este nucleótido podría cumplir un rol no sólo en el procesamiento de IL-1 β sino también su liberación.

Otro de los mecanismos propuestos involucra la liberación de microvesículas de membrana plasmática conteniendo IL-1 β , proIL-1 β y caspasa-1, además de otros componentes citoplasmáticos [122, 135, 136]. Todavía no está claro el mecanismo que mediaría la salida de la IL-1 β de las microvesículas al medio extracelular, pero algunas observaciones sugieren que el ATP se encontraría involucrado en este paso [135, 136].

Estudios adicionales sugirieron que la exocitosis de exosomas podría ser otro mecanismo de liberación de IL-1 β . Éste involucraría la fusión de cuerpos multivesiculares y la subsiguiente liberación de exosomas conteniendo IL-1 β en su interior y LAMP-1 (marcador lisosomal) y moléculas de MHCII en la superficie [137].

Otro mecanismo propuesto para la liberación de IL-1 β es la exportación utili-

zando transportadores de membrana de tipo ABC [138]. Los estudios que sustentan este modelo fueron realizados empleando inhibidores farmacológicos y knockdown de estos transportadores. Sin embargo, no es posible descartar que los transportadores modulen la liberación de IL-1 β en lugar de mediarla directamente.

Un mecanismo propuesto sostiene que el filtrado del contenido de células en las que se hubiese perdido la integridad de membranas podría contribuir a la liberación de IL-1 β [139, 140].

Además se ha propuesto que la IL-1 β puede ser liberada a través de un poro en la membrana plasmática formado por la oligomerización del fragmento aminoterminoterminal de la Gasdermina D generado por acción de las caspasas 11, 4/5 y eventualmente la caspasa-1 [141].

Por ultimo, un mecanismo de autofagia secretoria, también ha sido propuesto para explicar la secreción de IL-1 β en distintas células mieloides [142].

La gran variedad de mecanismos propuestos para la liberación de IL-1 β podría deberse a diferencias funcionales en las células estudiadas. Es posible que la IL-1 β sea secretada por dos o más vías en paralelo. Así, dependiendo del tipo o la fuerza del estímulo se podrían reclutar mecanismos adicionales para lograr una liberación eficiente de IL-1 β [143].

1.9. Autofagia

1.9.1. Generalidades

Tradicionalmente, la autofagia ha sido considerada como un sistema de degradación intracelular conservado evolutivamente entre eucariotas [144]. El evento que define por excelencia al proceso que usualmente llamamos autofagia, es la generación de una estructura con doble membrana llamada autofagosoma. Este proceso puede ser inducido por privación de nutrientes, en cuyo caso se reclutan membranas, las cuales se expanden generando una vesícula doble membrana llamada autofagosoma. Durante este proceso, una porción del citoplasma, incluyendo proteínas y organelas, es capturada en el lumen de estos autofagosomas, y tras la fusión entre autofagosomas y lisosomas, el interior del mismo es degradado por hidrolasas lisosomales. Aun cuando la autofagia fuera originalmente descrita como un mecanismo de supervivencia inducido por falta de nutrientes, en la actualidad se le adjudican roles en una variedad de procesos celulares, incluyendo supervivencia, metabolismo, desarrollo, envejecimiento e inmunidad. Actualmente es posible distinguir también otros tipos de procesos autofágicos, que en conjunto pueden ser clasificados dentro de tres grandes grupos: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (AMC). Ver Figura 1.6.

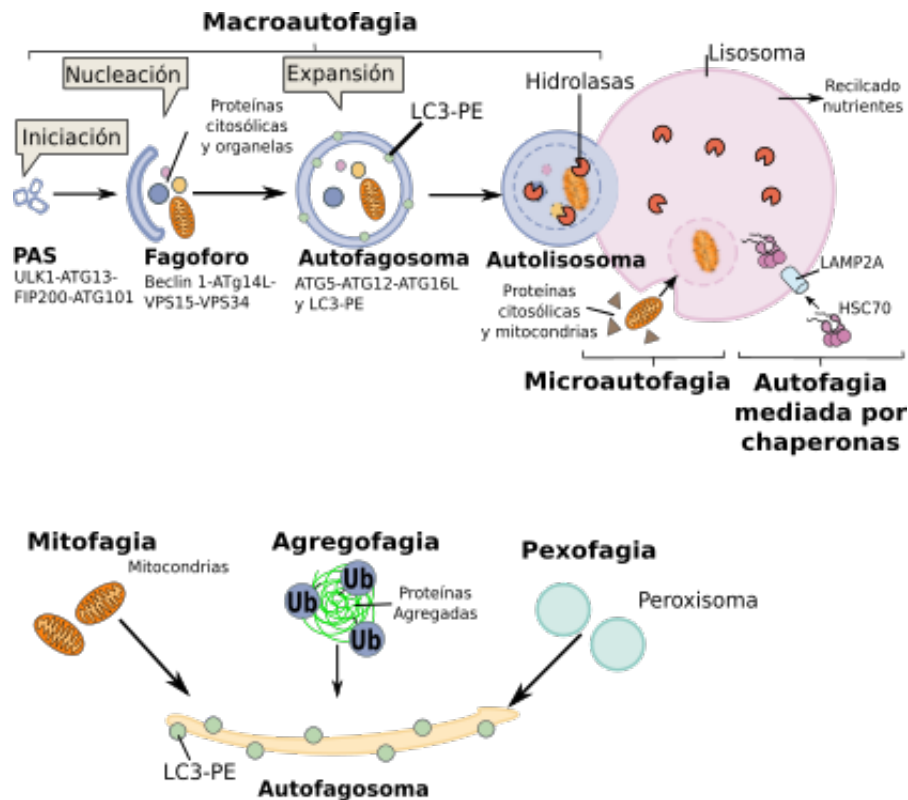


Figura 1.6: Existen varios tipos de autofagia entre los que se encuentran la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas (AMC). Se muestra además, los casos particulares de autofagia de mitocondrias (Mitofagia), y la degradación de proteínas agregadas ubiquitinadas (Agregofagia).

La mayoría de los trabajos realizados sobre autofagia, estudian alguna variante de la macroautofagia. Ésta consiste en la formación de vesículas con doble membrana llamadas autofagosomas, que capturan contenido citoplasmático para su posterior degradación. Los autofagosomas pueden fusionarse con lisosomas, generando un autolisosoma o pueden también fusionarse con endosomas, generando amfisomas, los cuales luego se fusionan a lisosomas, dando lugar a la generación de autolisosomas [145].

La microautofagia no opera mediante la formación de membranas de novo, sino que involucra una invaginación de la membrana endosomal o lisosomal, mediando la captura y degradación de los sustratos incorporados a esa vesícula por proteasas lisosomales [146].

Por último, la autofagia mediada por chaperonas (AMC) se diferencia de la macroautofagia y la microautofagia, porque el material a ser degradado es translocado directamente al interior de los lisosomas. El mecanismo involucra el reconocimiento de proteínas blanco que posean el motivo de tipo KFERQ, las cuales son reconocidas por la proteína de shock térmico citosólica de 70 kDa (HSC70). La HSC70 dirige al sustrato unido a la superficie de los lisosomas y promueve así su translocación

a través de la membrana de los lisosomas vía la proteína de membrana asociada a lisosomas tipo 2A (LAMP2A) [147]. Todos los sustratos de la AMC contienen una secuencia de tipo KFERQ. Esta secuencia consiste en un conjunto de Q seguido por cuatro aminoácidos contiguos que consisten en un ácido (+), un básico (-), una cadena voluminosa hidrófuga y un aminoácido hidrofóbico básico o voluminoso.

1.9.2. Proceso de degradación autofágica y vesículas involucradas

El proceso macroautofágico, al cual en adelante llamaremos simplemente autofágico, puede ser dividido en 4 pasos: inducción, nucleación, expansión/secuestro y degradación. La inducción es el paso inicial y ocurre mediante la activación de ULK1, una proteína que se encuentra regulada negativamente por el complejo mTORC1. La nucleación conduce al reclutamiento de proteínas y lípidos en el sitio de ensamblaje del fagóforo (PAS), el molde de membrana inicial que va a contribuir a la construcción del autofagosoma. Si bien el mecanismo que lleva a la nucleación no se encuentra esclarecido, se ha demostrado que la activación de la fosfatidilinositol 3 quinasa clase 3 (PI3KC3) es esencial. Durante la expansión/ secuestro, las membranas se expanden, ya sea por flujo directo desde el RE o por adición de vesículas, hasta formar el autofagosoma que incorpora la carga citosólica. En este estadio, los componentes citoplasmáticos incluyendo organelas, son encerrados por un saco membranoso denominado membrana de aislamiento o fagóforo, que se cierra sobre sí mismo para formar una estructura de doble membrana que es el autofagosoma. La maduración de las vacuolas autofágicas requiere: I) la incorporación de proteínas de membrana lisosomal, II) la acidificación y III) la adquisición de hidrolasas lisosomales, procesos que pueden ocurrir en un paso único por medio de la fusión con lisosomas preexistentes, dando lugar a la formación de un autolisosoma, o bien, se puede formar una vesícula intermediaria, el amfisoma, por unión con endosomas tardíos, que luego se fusionará a un lisosoma generando un autolisosoma. Las hidrolasas lisosomales presentes en los autolisosomas en el medio ácido del mismo, degradan el contenido proveniente del citoplasma, conjuntamente con la membrana interna del autofagosoma [148-151]. En la Figura 1.7 se muestra un esquema ilustrando los distintos pasos involucrados en el proceso macroautofágico

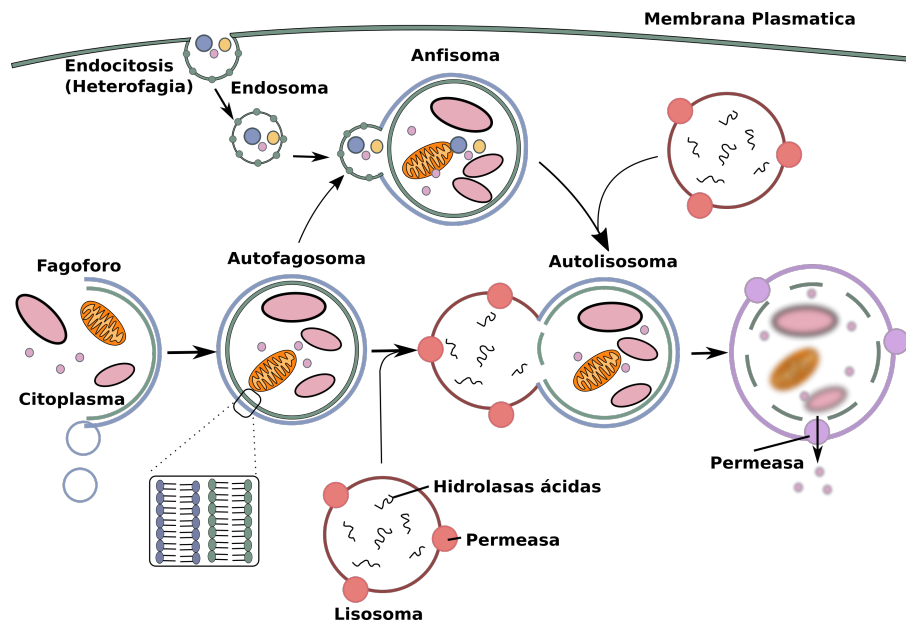


Figura 1.7: El secuestro del material comienza con la formación de un fagóforo que encierra material citoplasmático y se expande hasta formar un autofagosoma de doble membrana. El autofagosoma puede fusionarse con un endosoma, dando como producto un anfisoma, o directamente fusionarse con lisosomas, que lo proveen de hidrolasas ácidas para formar el autolisosoma. Este último es el compartimiento degradativo de la vía autofágica. Las moléculas resultantes son liberadas por medio de permeasas al citosol para ser reusadas.

1.9.3. Sistema de conjugación tipo ubiquitina

El proceso de expansión/secuestro y cierre de los autofagosomas depende de los sistemas de conjugación tipo ubiquitina de ATG12 y de LC3 (Figura 1.8). ATG12 es clivada en su extremo C- terminal por ATG7 (una enzima tipo E1) y luego transferida a ATG10 (una enzima tipo E2) que la conjuga con ATG5. Esta última, interactúa mediante una unión no covalente con ATG16, para formar un complejo multimérico a través de la oligomerización de ATG16. El complejo ATG12-ATG5-ATG16 es reclutado a la membrana del fagóforo donde facilita la conjugación de LC3 a fosfatidiletanolamina (PE), un evento necesario para la expansión de la membrana de aislamiento. Para ello, LC3 es clivada en el extremo C-terminal por Atg4 dando lugar a LC3-I. Ésta es reconocida por la enzima tipo E1 Atg7. Una vez activada, LC3 es transferida a Atg3, que la conjuga con PE [152] dando lugar a la isoforma LC3II. Se ha propuesto que LC3-II recluta contenido citoplasmático al fagóforo, asegurando su incorporación en los autofagosomas. Además, esta proteína contribuiría con la fusión de vesículas, por lo cual favorecería el proceso de expansión del fagóforo [153]. El complejo ATG12-ATG5-ATG16 se disocia de los autofagosomas completamente formados, mientras que LC3II permanece asociado hasta la fusión con los lisosomas. El LC3II dentro del autolisosoma es degradado, mientras que el ubicado de la cara

citoplasmática puede ser deslipidado y reciclado [154]. El complejo Atg12-Atg5-Atg16 es esencial para la formación de autofagosomas. Se propone que este complejo recluta a Atg3 (conjugado a LC3) a la membrana del fagóforo, facilitando la unión a PE. Adicionalmente, se ha demostrado mediante experimentos in vitro, que este complejo podría también favorecer la fusión de vesículas con el fagóforo [155].

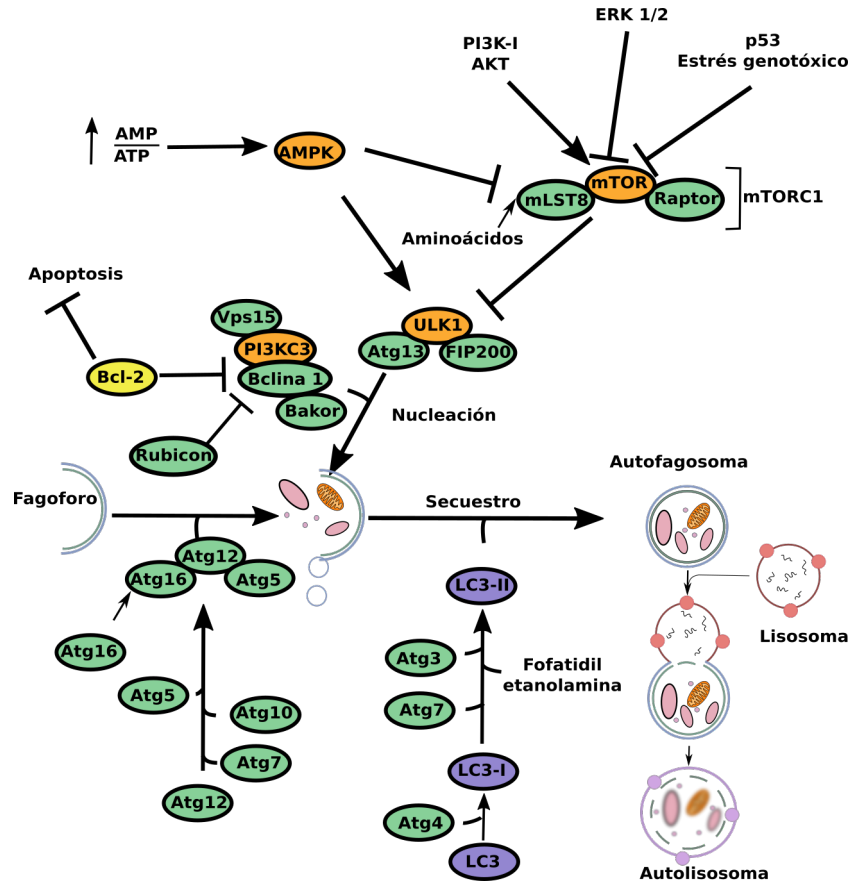


Figura 1.8: En el esquema se muestran las principales proteínas involucradas en el proceso autofágico, indicando los niveles sobre los cuales actúan. El complejo formado por mTOR (mTORC) es un regulador crítico de la inducción de la autofagia. La activación del mismo, modulada entre otros por Akt, suprime la autofagia, mientras que su inhibición por ERK, p53 y AMPK, la promueve.

1.9.4. Autofagia y secreción

Aun cuando tradicionalmente la autofagia ha sido considerada como un proceso que conduce a la degradación de los blancos incorporados en los autofagosomas tras su fusión a lisosomas, existen evidencias de que también participa de la secreción de proteínas citoplasmáticas. Se especula que algunos autofagosomas pueden seguir una vía divergente por la cual su contenido es secretado en lugar de degradado.

Uno de los primeros ejemplos descritos de secreción no convencional de proteínas

citoplasmáticas carentes de péptido señal es el de la IL-1 β . Estudios conducidos por Dupont y colaboradores determinaron que la autofagia contribuye a la secreción de IL-1 β , capturando esta citoquina desde el citoplasma y mediando su transporte al medio extracelular [142, 156]. Recientemente estos estudios han sido ampliados por diferentes grupos [157, 158]. La secreción de IL-1 β requiere de la participación del factor autofágico ATG5, y la GTPasa Rab8a, que regula el direccionamiento de vesículas a la membrana plasmática [142]. En contraste con estos hallazgos, otros estudios también determinaron que la IL-1 β puede ser degradada a través de la vía autofágica [159]. Estas observaciones sugieren que la secreción y degradación no necesariamente ocurren como eventos separados, sino que una regulación entre ambos, podría modular los diferentes niveles de IL-1 β efectivamente secretados.

El rol de la autofagia en la secreción, no siempre puede ser trazado de forma clara, ya que puede afectar de forma directa o indirecta otras vías de secreción y tráfico de proteínas a membrana.

Finalmente, no se sabe cómo aquellas proteínas que potencialmente podrían ser secretada vía autofagosomas esquivan la fusión con lisosomas, o si son efectivamente fusionados, cómo evitan la destrucción vía la degradación por enzimas lisosomales.

Capítulo 2

Objetivos

Los antecedentes mencionados en la introducción fueron realizados en tipos celulares diferentes al neutrófilo, y evidencian las controversias, que aún persisten en relación a los mecanismos que controlan la secreción de IL-1 β . En este sentido, se han descrito diferencias marcadas en cuanto a la regulación de la activación del inflammasoma, la producción de IL-1 β activa y su secreción entre monocitos, macrófagos y neutrófilos [88].

Por tal motivo, y considerando la controversia planteada sobre el rol de la autofagia en la secreción de IL-1 β y el escaso conocimiento existente en los mecanismos de autofagia en neutrófilos, en este trabajo de tesis, nos hemos propuesto dos objetivos generales:

1. Determinar si la autofagia se encuentra involucrada en la secreción de IL-1 β por neutrófilos humanos.
2. Determinar el papel de la enzima NADPH oxidasa en el mecanismo que conduce a la secreción de IL-1 β en estas células.

Capítulo 3

Materiales y Métodos

Los estudios llevados a cabo en este trabajo fueron evaluados y aprobados por los Comités de Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina y el Comité de Docencia del Instituto de Medicina Experimental de la Academia Nacional de Medicina.

3.1. Purificación de neutrófilos humanos

Los neutrófilos fueron obtenidos de muestras de sangre periférica de dadores sanos bajo consentimiento informado, por punción venosa. Los mismos fueron aislados a partir de sangre heparinizada mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Triyosom de 1,077 g/ml de densidad y sedimentación con Dextrán 6 %, de acuerdo a lo previamente descrito [88]. Los eritrocitos contaminantes fueron removidos por lisis hipotónica con agua. Luego de un lavado con solución fisiológica, las células (>97 % de granulocitos determinado por citometría de flujo) fueron resuspendidas en medio completo: RPMI 1640 suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (SFB), penicilina 100 unidades/ml y estreptomicina 100 μ g/ml. Aprovechando que la expresión de CD14 en monocitos es aproximadamente dos órdenes de magnitud superior a la de los neutrófilos, todas las purificaciones fueron inmunomarcadas con un anticuerpo anti-CD14 conjugado a ficoeritrina (PE), y analizadas mediante citometría de flujo para garantizar que su contaminación con monocitos fuese menor al 0,5 %. Ver Figura 3.1.

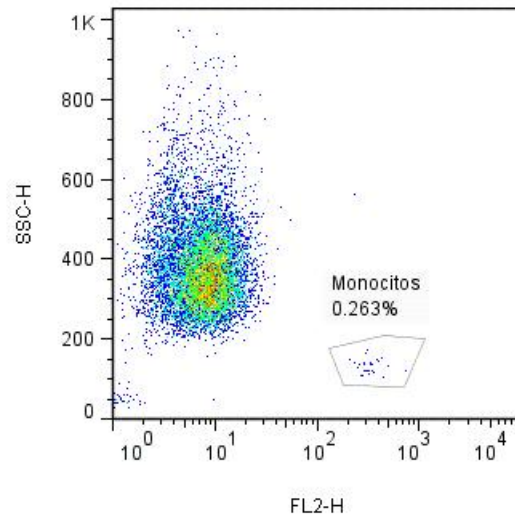


Figura 3.1: Dot plot representativo de granularidad en función de la expresión de CD14 obtenido por citometría de flujo. Las células CD14+ (circulo) representan la mayor parte de los monocitos contaminantes de la muestra

Simultáneamente, se verifico que los parámetros dispersión forward-scattered light (FSC) y side-scattered light (SSC) fueran compatibles con los de células no activadas. Ver Figura 3.2.

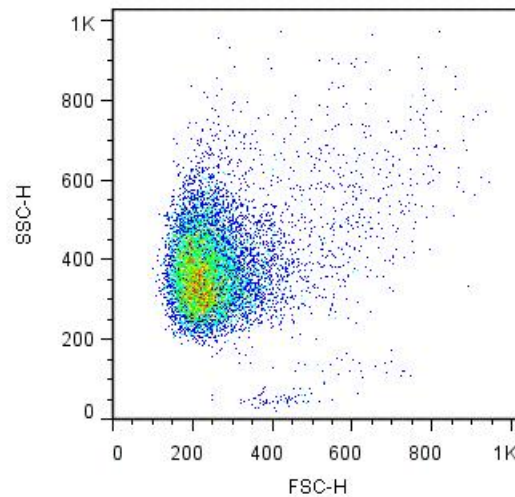


Figura 3.2: Dot plot representativo del perfil de distribución de SSC vs FSC de los neutrófilos luego del aislamiento de sangre periférica

3.2. Líneas celulares

En el presente trabajo se utilizó la línea mielocítica humana PLB-985 (PLB-985) [160]. Esta línea fue gentilmente cedida por la Dra. Mary C. Dinauer de la Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, EEUU.

La línea PLB-985 fue cultivada en medio completo suplementado con glutamina 2 mM en una estufa humidificada a 37°C y en una atmósfera de CO₂ 5 % y 95 % de aire. Para diferenciar la línea PLB-985 a granulocitos neutrófilos se expuso a las células en crecimiento exponencial a dimetilformamida (DMF) 0,5 % por 5 días, con un cambio de medio al tercer día [161]. La diferenciación fue comprobada por citometría de flujo mediante la ganancia de la expresión del marcador CD11b con un anticuerpo anti-CD11b conjugado a ficoeritrina (PE) (Immunothech-Beckman Coulter, República Checa), y por la adquisición de la capacidad de producir intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) en respuesta a PMA (Sigma) detectada con el indicador fluorescente de IRO, dihidrorhodamina 123 (DHR123, Invitrogen) [162].

3.3. Determinación de la producción de IRO

Los neutrófilos (o las células PLB-985) fueron incubados a una densidad de 1,5 x10⁶ células/ml en medio completo con 10 µM de DHR123 durante 5 min. Luego fueron estimulados con los agonistas indicados e incubados durante 30 min a 37°C. Como control positivo de la producción de IRO se utilizó PMA 50 ng/ml. Las muestras fueron transferidas a un baño con hielo y la fluorescencia en el canal FL-1 fue analizada inmediatamente por citometría de flujo.

3.4. Evaluación de la viabilidad Celular

Para determinar la viabilidad de las células sometidas a distintos tratamientos se utilizaron dos técnicas. En una de ellas, luego del cultivo, las células fueron incubadas con el colorante 7-aminoactinomicina D (7-AAD, 10 µg/ml, Calbiochem), el cual, a la concentración empleada, es permeable a través de las membranas de las células no viables (apoptóticas o necróticas) [163]. La incorporación de 7-AAD fue monitoreada a través de la detección de la emisión de fluorescencia por citometría de flujo. La viabilidad celular también fue monitoreada con Anexina V/Ioduro de Propidio. Para ello, las células fueron lavadas con PBS, resuspendidas en el buffer de marcación de Anexina V (Solución de 0,1M Hepes (pH 7.4); 1,4M NaCl; y 25 mM CaCl₂) e incubadas con anexina V conjugada a isotiocinato de fluoresceína (FITC) (1:20) durante 15 minutos. Previamente al análisis por Citometría de Flujo, se las tiñó con ioduro de propidio (1 µg/ml).

3.5. Reactivos utilizados

Los medios de cultivo RPMI 1640 y Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) fueron obtenidos de Life Technology y ThermoFisher Scientific (Massachusetts, EEUU) respectivamente. El suero fetal bovino se obtuvo de Internegocios (Buenos Aires, Argentina). El Ficoll y el Dextrán 500 utilizados fueron obtenidos de GE Healthcare (Munich, Alemania) y el Triyosom fue adquirido de Justesa Imagenes (Buenos Aires, Argentina). El sustrato colorimétrico 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) de la enzima peroxidasa se obtuvo de Thermo Fisher Scientific. El líquido de montaje empleado (Aqua-Poly/Mount Coverslipping Medium) fue adquirido de Polysciences (Warrington, EEUU). Las cámaras de cultivo para los ensayos de microscopía confocal (Lab-Tek Chambers) se obtuvieron de Nalge Nunc International (Nueva York, EEUU). El resto de los reactivos utilizados fueron obtenidos en Sigma Aldrich (San Louis, EEUU).

3.6. Estimulación de la producción de IL-1 β por neutrófilos

Los neutrófilos purificados de sangre periférica fueron resuspendidos en medio completo a 5×10^6 células/ml. Los neutrófilos diferenciados de las líneas PLB-985 fueron resuspendidos en medio completo fresco sin DMF a una densidad de 2×10^6 células/ml. En ambos casos, las células fueron tratadas con vehículo o estimuladas con LPS proveniente de *Escherichia coli* cepa O111:B4 250 ng/ml por 2 hs para inducir la síntesis de la proIL-1 β . Posteriormente fueron estimuladas con 2,5 mM ATP. A los tiempos indicados, los sobrenadantes fueron removidos y la IL-1 β secretada al sobrenadante fue cuantificada por ELISA (del acrónimo en inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

En los experimentos que involucraron la evaluación de la IL-1 β intracelular, las determinaciones fueron realizadas a las 4 hs postestimulación antes de que la citoquina fuera liberada de la célula, excepto que se indique lo contrario.

3.7. Esquema de los tratamientos a los que fueron sometidos los neutrófilos

En algunos experimentos, con el objetivo de inhibir o inducir el proceso autofágico, las células fueron sometidas a distintos tratamientos siguiendo el esquema experimental descrito en la figura 3.3. Las células fueron preincubadas con los inhibidores selectivos de la PI3K 3-Metiladenina (3-MA; 5 mM) o Wortmanina (WN; 100 nM)[164] durante 30 min a 37°C antes del tratamiento con LPS.

La Bafilomicina A1 (Baf A1; 100 nM) fue agregada 3 horas después de la estimulación con LPS.

Para estimular la autofagia por hambre celular, se realizó una sustitución del

medio de crecimiento por solución salina balanceada de Earle (EBSS) a las 4 horas postestimulación con LPS. En las condiciones control, el medio fue reemplazado por medio de cultivo completo fresco o no sustituido (*ensayo simulacro*).

Además, se ensayaron los siguientes inhibidores de proteasas. El inhibidor irreversible de serinproteasas AEBSF (200 μM), el inhibidor de cisteína proteasas E64d (1-10 μM) y el inhibidor de aspartil proteasas Pepstatina A (1-10 μM), los cuales fueron agregados a las 3 hs postestimulación con LPS.

Excepto que se indique lo contrario, luego de 5 hs de cultivo, los sobrenadantes fueron removidos y la IL-1 β secretada fue cuantificada por ELISA. En los experimentos que involucraron la evaluación de la IL-1 β intracelular, las determinaciones fueron realizadas a las 4 hs postestimulación, antes de que la citoquina fuera liberada de la célula.

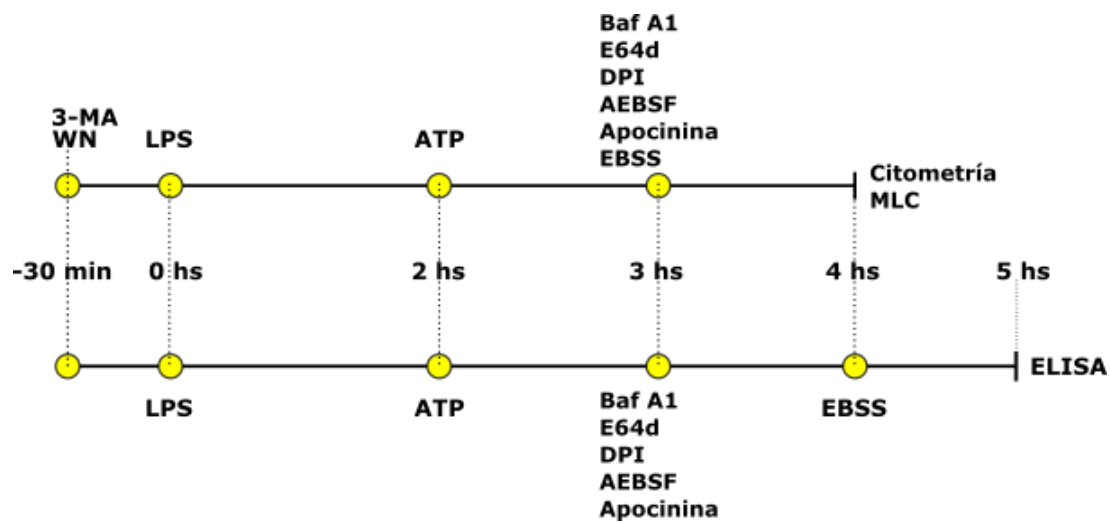


Figura 3.3: Esquema del modelo experimental al cual fueron sometidos los neutrófilos.

3.8. Cuantificación de citoquinas por ELISA

A menos que se explice lo contrario, las citoquinas liberadas a los sobrenadantes de cultivo de neutrófilos, fueron recolectadas a las 5 horas post estimulación con LPS. En paralelo, en algunos casos, se prepararon extractos de los pellets celulares para la detección intracelular utilizando un buffer conteniendo Tritón X-100 0,1 % e inhibidores de proteasas (Aprotinina 100 $\mu\text{g/ml}$, Pepstatina 10 $\mu\text{g/ml}$, 10 Leupeptina $\mu\text{g/ml}$, AEBSF 1 mM y PMSF 1 mM). En dichas muestras se determinó la concentración de IL-1 β mediante ELISA (BD Biosciences OptEIA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.9. Marcaciones intracitoplasmáticas

3.9.1. Fijación y permeabilización

Los neutrófilos fueron fijados con una solución de paraformaldehído (PFA) al 4 % en buffer fosfato salino (PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Luego fueron permeabilizados utilizando acetona fría (-20°C) durante 5 minutos con posterior rehidratación en buffer PBS. Este método de permeabilización fue escogido porque asegura una mejor preservación de la morfología celular y aumenta la sensibilidad de detección de determinados antígenos, en comparación con el uso de detergentes [162].

3.9.2. Bloqueo de epítopes inespecíficos

Se bloquearon los grupos aldehídos libres que pudieran haber resultado del tratamiento con PFA con glicina 0,1 M durante 10 minutos a TA. Luego se procedió al bloqueo de sitios de pegado inespecíficos con suero normal de cabra al 5 %. El paso de bloqueo se extendió a 1 hora a TA, o se dejó a 4°C durante la noche (ON).

3.9.3. Anticuerpos

Posteriormente se procedió a realizar la inmunomarcación intracitoplasmática empleado el anticuerpo primario correspondiente. Todas las marcaciones fueron realizadas con buffer PBS suplementado con suero normal de cabra 1 % durante 1 hora a TA, excepto que se indique lo contrario. A continuación se detallan los anticuerpos primarios y secundarios empleados en este estudio.

Anticuerpos		
Antígeno	Anticuerpos primarios (origen y tipo)	Referencia
IL-1 β hu- mana	Ratón monoclonal IgG anti-IL-1 β Humana	BD Pharmingen (552289)
LC3 β hu- mana	Conejo policlonal IgG anti-MAP LC3 β humana (H-50)	Biotechnologies (28266)
gp91 phox humana	Ratón monoclonal IgG anti-citocromo b-245 humana	BioLgend (650101)
p47 phox humana	Ratón monoclonal anti-p47-phox (A-7) humana	Santa Cruz (17844)
Anticuerpos Secundarios		
IgG(H+L) Ratón	Cabra Fragmento Fab Anti-IgG Ratón	Inmunoresearch (115-486-071)
IgG(H+L) Ratón	Cabra Fragmento Fab conjugado a Alexa 488 anti-IgG Ratón	Jackson (115-547-003)
IgG,F(ab) ₂ Ratón	Cabra anti-IgG ratón conjugado Alexa 647	Jackson (115-606-072)
IgG(H+L) Conejo	Cabra policlonal anti-IgG conejo conjugado DyLight 488	Jackson (111-486-144)
IgG(H+L) Conejo	Cabra policlonal anti-IgG conejo conjugado Dylight 549	Jackson (111-506-405)
IgG(H+L) Ratón	Cabra policlonal anti-IgG Ratón conjugado Dylight 549	Jackson (115-506-062)
IgG(H+L) Ratón	Cabra policlonal anti-IgG Conejo conjugado Alexa Fluor 647	Jackson (111-606-144)

Figura 3.4: Tabla con todos los anticuerpos, primarios y secundarios, utilizados en este trabajo. Se detalla fabricante y número de catálogo entre paréntesis

3.9.3.1. Inmunomarcación simple

Las células fueron incubadas con un anticuerpo primario, o con el isotipo correspondiente, durante 1 hora a TA. Luego fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado al fluorocromo indicado por 30 minutos a TA.

3.9.3.2. Inmunomarcación doble

Las células fueron incubadas en simultáneo con ambos anticuerpos primarios, o con la mezcla de los correspondientes anticuerpos controles de isotipos, durante 1 hora a TA. Luego fueron incubadas con los anticuerpos secundarios conjugados a diferentes fluorocromos, específicos contra las inmunoglobulinas de la especie correspondiente al anticuerpo primario empleado por 30 minutos a TA.

3.9.3.3. Inmunomarcación triple

Algunas marcaciones se realizaron empleando al menos dos anticuerpos primarios no marcados de la misma especie. En esos casos se procedió de acuerdo al protocolo recomendado por Jackson ImmunoResearch [165]. Brevemente las células fueron incubadas con un anticuerpo primario o con el isotipo correspondiente durante 1 hora a TA. Luego las células fueron incubadas con los fragmentos Fab anti IgG de ratón conjugadas alexa 488, durante 1 hora a TA. Este anticuerpo debe ser agregado en altas concentraciones de forma de cubrir todos los epítopes posibles. Posteriormente se procedió a lavar con PBS y se volvió a bloquear con suero de cabra 5 % durante una hora. Finalmente, se agregaron los anticuerpos restantes de forma simultanea, como en la inmunomarcación doble anteriormente descripta.

3.9.4. Tinción nuclear y montaje

Para la observación por Microscopía Laser Confocal, el ADN fue coloreado con agentes intercalantes con el fin de visualizar el núcleo. En el caso de las marcaciones con anticuerpos conjugados a fluorocromos cuya emisión no se superpone con la del IP, se incubó a las células con el mismo para teñir el ADN. En el resto de los casos, se utilizó el reactivo comercial TO-PRO-3 cuya excitación/emisión corresponde a las longitudes de onda 642/661. Finalmente los preparados fueron transferidos a un portaobjetos mediante citocentrifugación, y los cubreobjetos fueron montados utilizando el reactivo de montaje Aqua-Poly/Mount.

3.10. Microscopia Laser Confocal (MLC)

Los preparados se observaron en un microscopio confocal invertido Olympus Fluoview 1000 (Olympus, Tokio, Japón) equipado con un objetivo Plapon 60X de apertura numérica 1,42. Las imágenes fueron analizadas mediante el software *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis* [166].

3.11. Citometría de flujo

En algunos casos, luego de las inmunomarcaciones, la fluorescencia asociada a las células fue determinada mediante citometría de flujo. En esos casos los estudios fueron realizados empleando un citómetro de flujo FACScalibur, Becton Dickinson. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software FlowJo, Tree Star Inc.

3.12. Método de evaluación de autofagia por citometría de flujo

Utilizamos el detergente Saponina para remover selectivamente el LC3 no asociado a autofagosomas (LC3-I) [167], según la técnica desarrollada en [168], lo que

nos permite identificar al LC3 unido a autofagosomas (LC3-II). Luego de tratadas las células fueron fijadas suavemente (PFA 1 %) y permeabilizadas como se describió anteriormente, y posteriormente divididas en partes iguales. La mitad de estas se sometieron a un lavado con PBS Saponina 0,05 % durante una hora a TA de forma de remover la LC3-I, mientras que el resto fueron solo tratadas con PBS. Finalmente ambas se marcaron con un anticuerpo primario anti-LC3B capaz de reconocer tanto la forma libre, como la forma asociada de LC3 y un secundario marcado anti-especie del primario. La fluorescencia asociada a las células fue determinada mediante citometría de flujo. Mediante esta metodología se caracterizó la modulación del flujo autofágico a través de las variaciones en la fluorescencia remanente (Flu_{rem}), que corresponde a la marca asociada a la LC3 unida membrana, en comparación con la Fluorescencia total (Flu_{tot}) sin extracción con Saponina.

3.13. ARN de interferencia de *ATG5*

Células PLB-985 en el tercer día de diferenciación, fueron nucleoporadas con 50 nmol/L de ARN de interferencia de ATG5, o una secuencia control aleatoria de ARN (Scramble) utilizando el equipo de transfección Nucleofector™4D, según el protocolo provisto por el fabricante [169]. La eficiencia de la transfección fue determinada mediante la cotransfección de un plásmido que codifica para GFP (pmaxGFP) también provisto por el fabricante. La eficiencia de la interferencia en la expresión de la proteína ATG5 humana fue determinada mediante inmunomarcación usando un anticuerpo primario anti ATG5 humano (ProteinTech™) por citometría de flujo.

3.14. Metodología de experimentos con lysotracker

Se realizó una tinción y seguimiento de orgánulos ácidos en células vivas, utilizando las sondas LysoTracker®Red DND-99 (Excitación/emisión: 577/590 nm). Brevemente, neutrófilos fueron sometidos a incubación con la sonda antes o después del estímulo con LPS/LPS+ATP, dependiendo del tratamiento a ensayar. Luego, la fluorescencia fue monitoreada en tiempo real por MLC durante diferentes periodos de tiempo utilizando una cámara de cultivo con 5 % de CO₂ a 37°C asociada al microscopio, de modo de no afectar la viabilidad celular.

3.15. Análisis de la colocación de imágenes

Es importante destacar que los coeficientes de Manders son muy sensibles a los niveles de ruido; para evitar este problema calculamos los valores M1 y M2, definiendo los umbrales de señal positiva según el valor de ruido de fondo, en lugar de llevar este a cero. Para el cálculo de los valores umbrales se utilizaron diferentes

algoritmos provistos por el software Fiji [Schneider2012], de forma de minimizar la subjetividad en este paso de calibración .

3.16. Análisis estadístico

Los datos fueron presentados como la media $\pm$ error estandard de n experimentos realizados por triplicado. La significación estadística de los resultados obtenidos fue determinada mediante la prueba de ANOVA de dos factores con medidas repetidas seguida por un test de comparación múltiple de Bonferroni utilizando GraphPad Prism versión 6.00 para Windows. Se definió la significación estadística como $p < 0,05$.

Capítulo 4

Resultados

4.1. Determinación del tiempo experimental óptimo para la detección intra y extracelular de IL-1 β

Estudios realizados a finales de la década del ochenta determinaron que los neutrófilos humanos producen IL-1 β [170, 171]. Posteriormente nuestro grupo de trabajo, empleando neutrófilos altamente purificados, demostró en 2013 que el LPS induce la síntesis y secreción de IL-1 β , mientras que la adición de ATP promueve su secreción, efecto acorde con la capacidad del ATP de inducir la activación del inflamasoma en neutrófilos [88].

En la mayor parte de los ensayos que formaron parte de este estudio, se cultivaron a los neutrófilos en ausencia o presencia de LPS durante 2 hs, y luego se los estimuló o no con ATP. Posteriormente se determinó la concentración intra y extracelular de IL-1 β .

Como puede observarse en la figura 4.1A, el LPS estimuló la liberación de IL-1 β tanto a las 18 hs como a las 5 hs. El ATP en cambio fue incapaz por sí mismo de estimular la liberación de IL-1 β . Sin embargo, en los neutrófilos pretratados con LPS, el ATP estimuló la secreción de IL-1 β obteniéndose valores máximos a las 5 hs postestimulación. A su vez, fuimos capaces de detectar a la IL-1 β intracelularmente a las 4 hs. postestimulación. Ver Figura 4.1B.

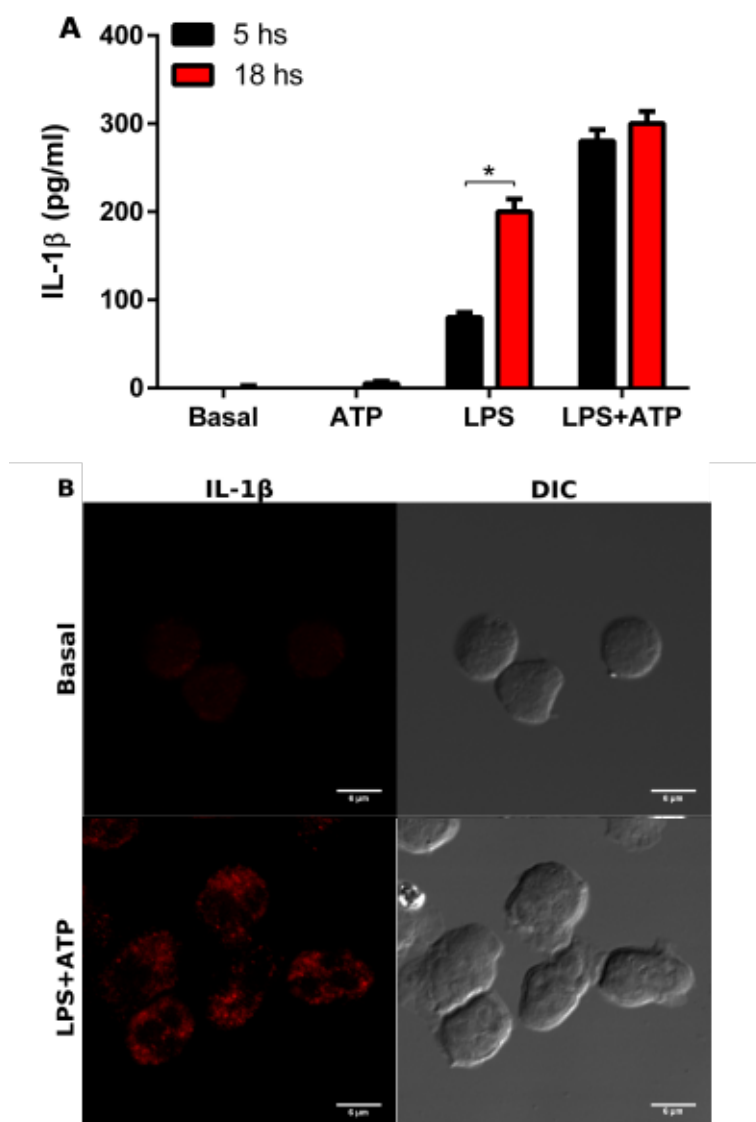


Figura 4.1: Los neutrófilos fueron estimulados o no con LPS (250 ng/ml) y luego de 2 hs. cultivados en presencia o ausencia de ATP (2,5 mM) durante 2, 3 o 16 hs. adicionales. Luego, se recuperaron los sobrenadantes y las células del cultivo, y se determinó (A) la presencia de IL-1 β en los sobrenadantes por ELISA a las 5 o 18 hs totales de cultivo; y (B) la expresión de IL-1 β en las células por inmunofluorescencia y microscopía confocal a las 4 hs postestimulación. Las barras representan las medias $\pm$ ES de 5 experimentos realizados por triplicado. Las imágenes son representativas de dichos experimentos.

Dado que este trabajo de tesis doctoral tenía por objetivo determinar si el proceso autofágico está involucrado en la secreción de IL-1 β , tiempos prolongados de incubación no resultarían adecuados, ya que la autofagia puede ser un proceso celular que ocurre a gran velocidad y en periodos breves [164]. De hecho, en el proceso de

autofagia degradativa, se ha descrito que la vida media de las vesículas autofágicas puede extenderse desde unos pocos minutos a unos 30 minutos [164]. Por ello, decidimos modular los procesos autofágicos en el menor tiempo experimental posible, donde fuésemos aun capaces de medir variaciones en la concentración de IL-1 β , intra y extracelularmente.

Con el objetivo de determinar el tiempo experimental óptimo para la detección de la IL-1 β intracelular, evaluamos la producción y liberación de IL-1 β por neutrófilos entre las 2 hs y 5 hs posestimulación. Para ello, transcurridos los diferentes tiempos de incubación, recuperamos los sobrenadantes de cultivo y los pellets celulares. Luego, determinamos por ELISA la concentración de IL-1 β en el medio extracelular, y por inmunomarcación y citometría de flujo el contenido de IL-1 β intracelular.

Como puede observarse en la figura 4.2 la inducción de la síntesis de la IL-1 β por LPS ocurre tempranamente, dado que a las 3 hs ya es posible detectarla intracelularmente. Resulta interesante notar que los niveles de expresión de IL-1 β intracelular en las células tratadas con LPS, no difieren marcadamente de aquellos observados en células tratadas con LPS+ATP a 4 y 5 hs posestimulación. En cambio, sí se observan diferencias en la dinámica con que la IL-1 β es liberada al sobrenadante.

En conjunto, estos ensayos indicaron que los tiempos óptimos para la evaluación de los mecanismos implicados en la exportación de la IL-1 β , se encontrarían entre las 4 y 5 hs postestimulación. Por ello, los ensayos subsiguientes, excepto que se explicita lo contrario, fueron realizados dentro de esos tiempos.

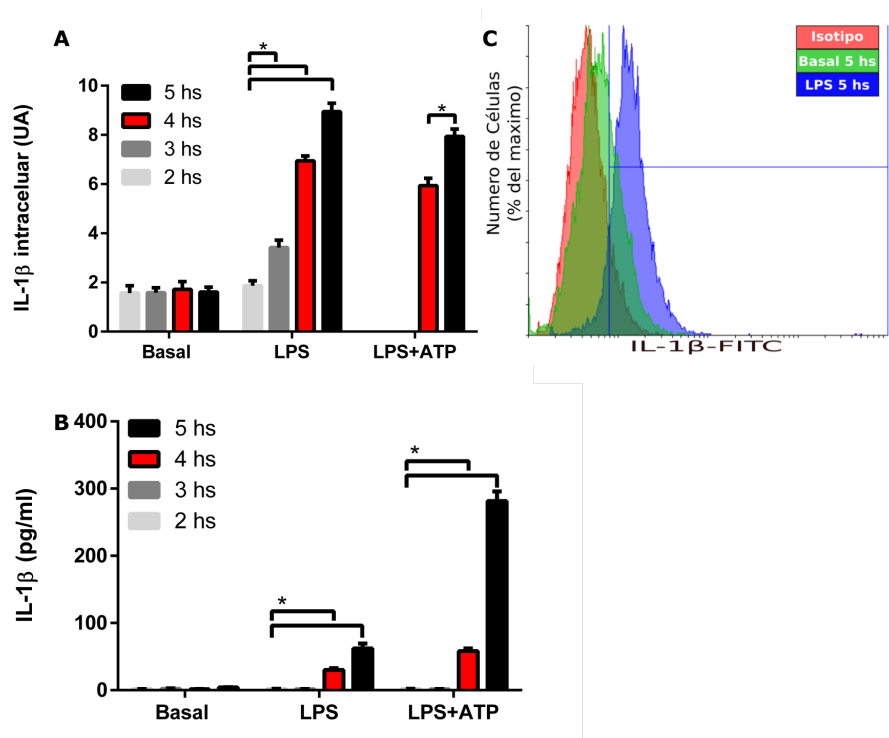


Figura 4.2: Los neutrófilos fueron estimulados con LPS 250 ng/ml o vehículo y dos horas más tarde estimulados o no con ATP 2,5 mM. A los tiempos indicados post-estimulación con LPS, se recuperaron los sobrenadantes y los pellets celulares. (A) Expresión intracelular de IL-1 β determinada por citometría de flujo. Los datos están expresados como la media $\pm$ SEM de las intensidades medias de fluorescencia en unidades arbitrarias (UA) de 3 experimentos realizados por triplicado, correspondientes a la región de células con parámetros FSC y SSC compatibles con los de células polimorfonucleares. (B) Concentración de IL-1 β en los sobrenadantes de cultivo determinada por ELISA. Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 3 experimentos realizados por triplicado. (C) Histograma representativos de la población a partir de la cual se analizaron los niveles de IL-1 β intracelular por citometría de flujo.

4.2. Determinación de la capacidad del LPS y LPS + ATP de inducir el flujo autofágico en los neutrófilos

Dado que nuestro primer objetivo consistía en determinar si la autofagia está involucrada en el proceso que conduce a la secreción de IL-1 β por los neutrófilos humanos, determinamos si nuestros agonistas son capaces de inducir un proceso autofágico.

Como ya se mencionó, un rasgo característico de la activación de la autofagia es

el cambio en la distribución citoplasmática de la proteína LC3B-I, que al conjugarse con fosfatidiletanolamina, genera la isoforma LC3B-II (forma activa) la cual se asocia a la membrana de los autofagosomas nacientes. Ver Figura 1.8. Por ello, la aparición de vesículas LC3B+ constituye un indicador clave del proceso autofágico [164].

Abordamos la caracterización de una posible modulación del flujo autofágico por nuestros agonistas con diferentes técnicas. En primer lugar, realizamos un análisis mediante la técnica de western blot, que permite detectar variaciones en la proporción LC3B-I / LC3B-II. Esto es debido a la diferente movilidad electroforética que exhibe la versión lipídica (LC3B-II) en relación a la citoplasmática LC3B-I. Ver Figura 4.3. Es importante notar que la conversión a la forma activa de LC3B, no siempre refleja una acumulación de la misma. La propia inducción puede llevar a un reciclaje o degradación acelerada de la forma LC3B-II, por lo que para una correcta interpretación de los resultados, es importante evaluar en paralelo, el impacto de los agonistas en presencia de inhibidores que impidan la fusión de autofagosomas con lisosomas, y por ende dificulten el reciclaje o degradación de la forma de LC3B unida a membranas [164]. Como se puede ver en la figura 4.3, la cantidad de LC3B-II aumentó en los neutrófilos cuando se los estimuló con LPS o LPS+ATP. Un primer análisis parece indicar que la inducción de la autofagia es menor en el caso de neutrófilos estimulados con LPS+ATP, sin embargo con el uso de Baf A1, vemos claramente que los agonistas no sólo inducen la autofagia, sino que el tratamiento con LPS+ATP parece ser más eficiente en la conversión a la forma activa LC3B-II. Este resultado se condice con la posibilidad de que la autofagia esté involucrada en la secreción de IL-1 β , ya que también se observa una mayor capacidad de los neutrófilos de secretar IL-1 β al ser estimulados con esa combinación de agonistas.

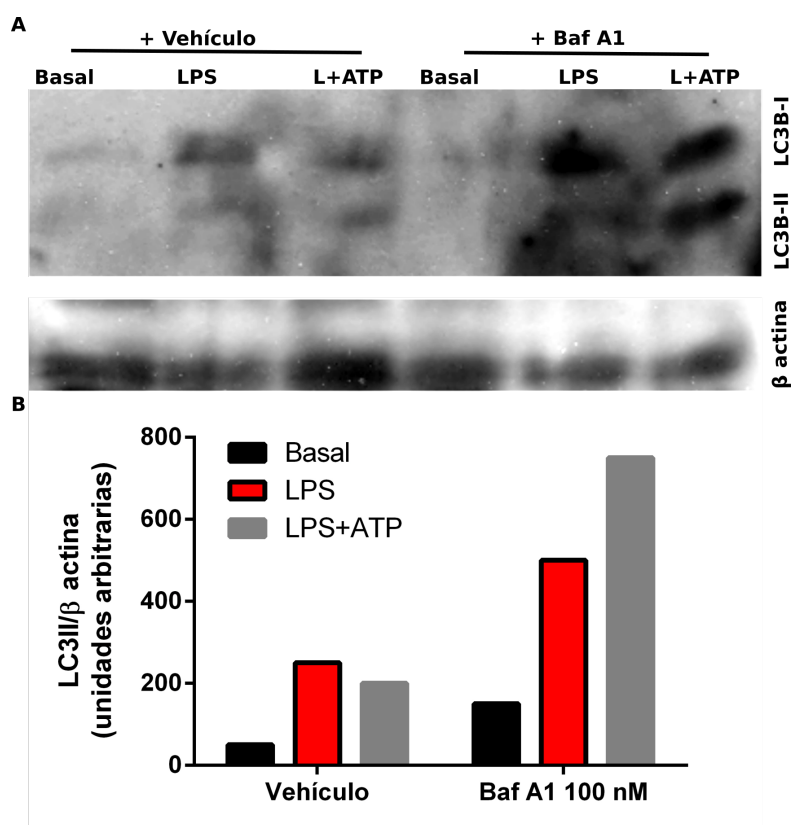


Figura 4.3: (A) Imagen representativa de un western blot de neutrófilos humanos revelado con un anticuerpo anti-LC3B humana. Se utilizó como control de carga a la β actina. (B) Cuantificación densitométrica de las bandas del western blot de la parte A. El gráfico representa la expresión relativa de LC3BII/ β actina. El experimento es representativo de dos realizados.

Para confirmar si en nuestras condiciones experimentales el LPS+ATP es capaz de inducir la autofagia en neutrófilos, también realizamos experimentos utilizando inmunomarcación intracitoplasmática, con el objeto de evidenciar la presencia de autofagosomas LC3B positivos mediante MLC. Las imágenes adquiridas indicaron un incremento en la cantidad de autofagosomas (vesículas LC3B+) en células estimuladas con LPS+ATP, en relación a los autofagosomas exhibidos por células no estimuladas (condición basal) (Figura 4.4A). A partir de estos experimentos, realizamos un recuento de células positivas para autofagia, considerando como tales a aquellas que tienen al menos tres vesículas LC3B+ diferenciables, criterio sugerido y adoptado por diferentes grupos de trabajo [164] (Figura 4.4B).

El tratamiento con LPS+ATP incrementó significativamente el número de células positivas para autofagia respecto de las observadas en condiciones basales, confirmando que este estímulo induce autofagia en neutrófilos. Es importante destacar, que el número de células positivas para autofagia no se modificó significativamente, como consecuencia del tratamiento con Baf A1. Esto podría deberse a que, tal como está reportado [164], el tratamiento con Baf A1 al impedir la fusión de las vesículas

autofágicas con los lisosomas, favorece eventos de fusión entre las mismas.

En conjunto, los hallazgos realizados por western blot y MLC indicaron que el LPS y el LPS+ATP inducen el flujo autofágico en los neutrófilos.

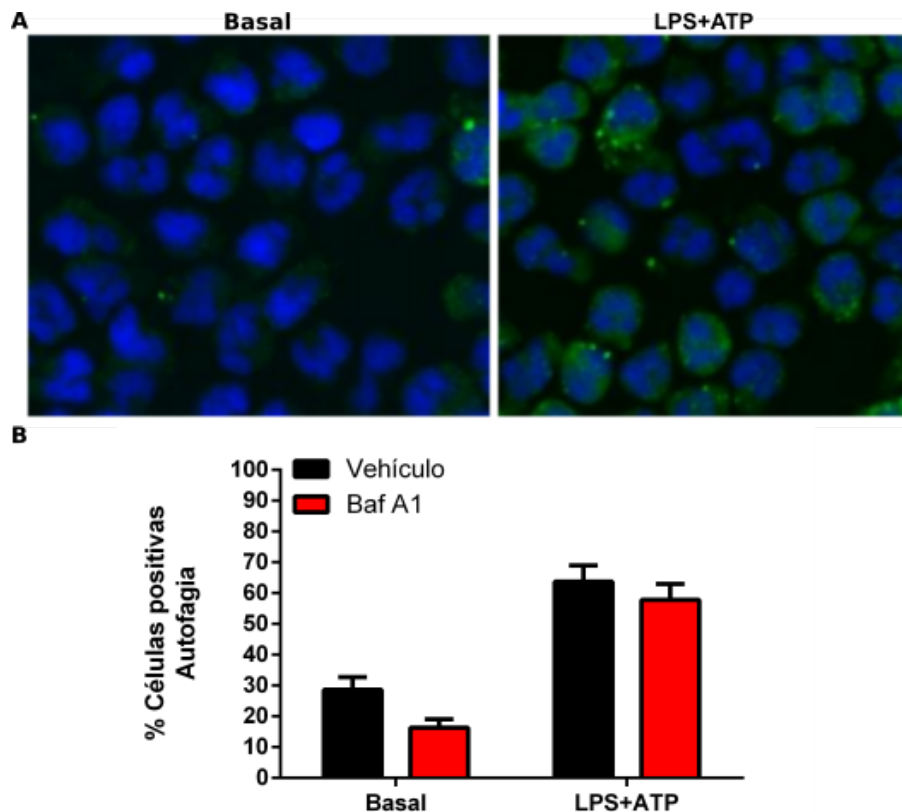


Figura 4.4: Los neutrófilos fueron estimulados siguiendo el esquema descrito en la figura 3.3. A las 4 horas postestimulación con LPS las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas con un anticuerpo de conejo anti-LC3B y un anticuerpo secundario obtenido en cabra conjugado a Alexa 488. Luego se adquirieron imágenes con un microscopio confocal y a partir de ellas se cuantificaron las células LC3B+ positivas de 50 células al azar por condición experimental. Las células fueron consideradas LC3B+ cuando fue posible identificar al menos 3 vesículas LC3B+ en su citoplasma. (A) Imagen representativa de neutrófilos tratados con medio (basal; izquierda) o con LPS+ATP (derecha). (B) Cuantificación de imágenes de neutrófilos estimulados o no con LPS+ATP en ausencia o presencia de Baf A1. Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes.

Los métodos para evaluar la capacidad de inducir la autofagia, que mencionamos en los párrafos anteriores, conllevan la dificultad de requerir una gran cantidad de células. Utilizamos aproximadamente cuatro millones de neutrófilos para cada condición experimental evaluada por western blot, y más de un millón de células

por cada marcación individual para microscopia confocal.

Teniendo en cuenta que para realizar estudios cinéticos la cantidad de células requeridas sería limitante, decidimos implementar un protocolo sugerido por Phadwal y colaboradores [172], que permite evaluar el nivel de expresión de LC3B-II por citometría de flujo. Esta técnica presenta una alta sensibilidad y nos permite trabajar con un número reducido de células, en el orden de quinientas mil células por tratamiento. La misma, esta basada en la capacidad de LC3B-II de permanecer unida a membranas autofagosomales, aun cuando las células son sometidas a un tratamiento con detergente suave como la saponina, el cual, extrae el LC3B-I que se encuentra libre en el citoplasma. Utilizando este método, se realizaron inmunomarcaciones intracitoplasmáticas de LC3B, que luego fueron analizadas por citometría de flujo. Para ello un mismo conjunto experimental, se dividió en dos grupos iguales previo a la inmunomarcación. Al primer grupo (A) se procedió a marcarlo con anti-LC3B. Al segundo grupo (B), previo a la inmunomarcación se lo trató con saponina, de forma de remover todo el LC3B-I libre no asociado a membrana. Finalmente ambos grupos experimentales fueron analizados por citometría de flujo. De esta forma obtuvimos del grupo A una lectura que llamamos Fluorescencia total, ya que proviene de la contribución de ambas formas de LC3B, y del grupo B, una lectura que llamamos fluorescencia remanente, enriquecida en la forma LC3B-II, resistente al lavado con saponina.

Como puede verse en la figura 4.5, los niveles de LC3B-II se encontraron aumentados inmediatamente después de la purificación de los neutrófilos. Creemos que esto podría deberse a la manipulación de las células por el proceso de purificación, durante el cual las mismas son puestas en contacto con distintos compuestos químicos (Ficoll y dextrán), sometidas a estrés osmótico durante la lisis con agua destilada, estrés mecánico producto de la centrifugación, y principalmente, a un breve periodo de privación de nutrientes. Finalmente estos valores descienden y se vuelven constante a lo largo del tiempo. Por el contrario, en los neutrófilos estimulados con LPS+ATP, la autofagia se incrementó a las 2 hs posestimulación y luego fue descendiendo progresivamente conforme pasó el tiempo, observándose el menor nivel de la misma a las 4 y 5 hs posestimulación.

Pudimos confirmar por esta técnica, los resultados obtenidos tanto por western blot como MLC, en donde veíamos que los agonistas ensayados, son capaces de inducir la autofagia en neutrófilos humanos obtenidos de sangre periférica.

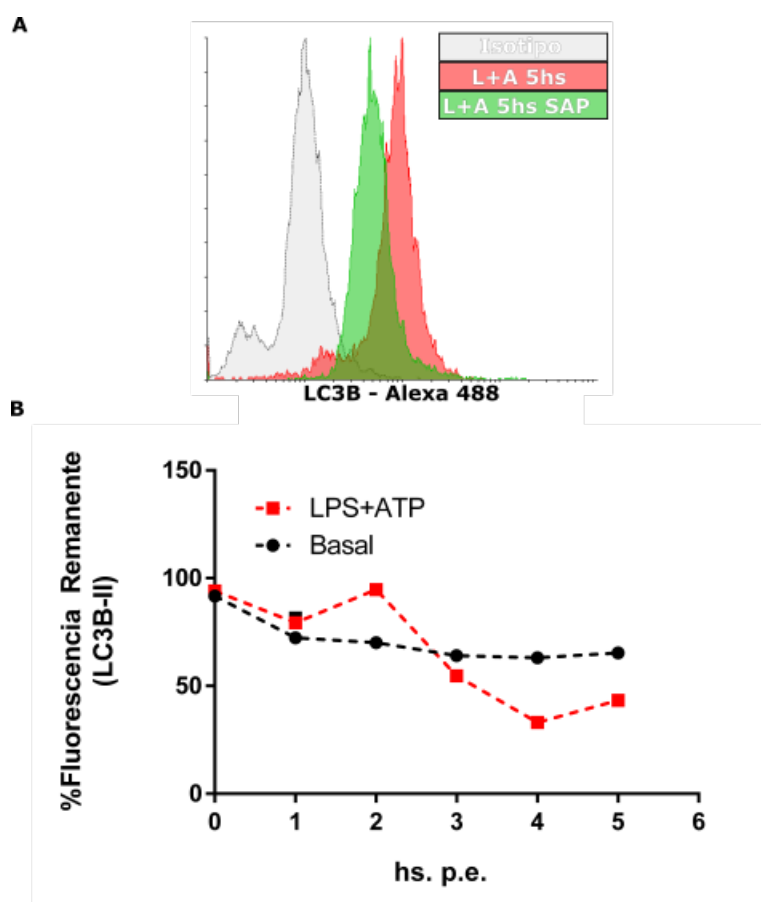


Figura 4.5: Evaluación de la autofagia inducida por LPS+ATP por citometría de flujo. (A) Histograma representativos que muestran la expresión de LC3B en neutrófilos humanos estimulados con LPS+ATP, tratados previo a la inmunomarcación con saponina para remover el LC3B citoplasmático (verde) y no tratado (rojo). (B) Análisis de la modulación del flujo autofágico a lo largo del tiempo, a partir del análisis de la fluorescencia remanente como indicador de la forma lipidada de LC3B. Las barras representan las medias $\pm$ ES de 3 experimentos realizados por duplicado.

4.3. Inhibición de la autofagia y su impacto en la liberación de IL-1 β

4.3.1. Inhibición del flujo autofágico por 3-MA y WN

Teniendo en cuenta que nuestros agonistas demostraron inducir la autofagia en los neutrófilos, quisimos determinar si este proceso estaba involucrado en el mecanismo que conduce a la secreción de IL-1 β .

El proceso autofágico convencional, como previamente se describe en la intro-

ducción, puede ser dividido esencialmente en 4 pasos: inducción, nucleación, expansión/secuestro y degradación. Ver Figura 1.6. En este trabajo de tesis nos propusimos alterar este proceso en sus distintos pasos, y evaluar si la interrupción o la estimulación del flujo autofágico afecta la secreción de la IL-1 β . Con este objetivo, se evaluó el impacto de los inhibidores 3-metiladenina (3-MA) y wortmanina (WM) sobre la secreción de IL-1 β inducida por LPS y LPS+ATP. Estos compuestos inhiben la autofagia mediante la inhibición de la fosfatidilinositol 3 quinasa de clase III (PI3KC3) [164], enzima que es esencial para el paso de nucleación.

En primer lugar, se determinó la secreción de IL-1 β en presencia de distintas concentraciones de 3-MA. Como se observa en la figura 4.6 todas las concentraciones evaluadas de 3-MA inhibieron marcadamente la secreción de IL-1 β . Dado que la concentración usualmente empleada en literatura para inhibir la autofagia es 5 mM, se decidió emplear esta concentración y analizar en paralelo su impacto sobre la viabilidad celular. En relación a la wortmanina, se trabajó con 50 nM porque estudios previos reportaron que a esa concentración, inhibe a la PI3K y no tiene efectos sobre otras quinastas del neutrófilo [173].

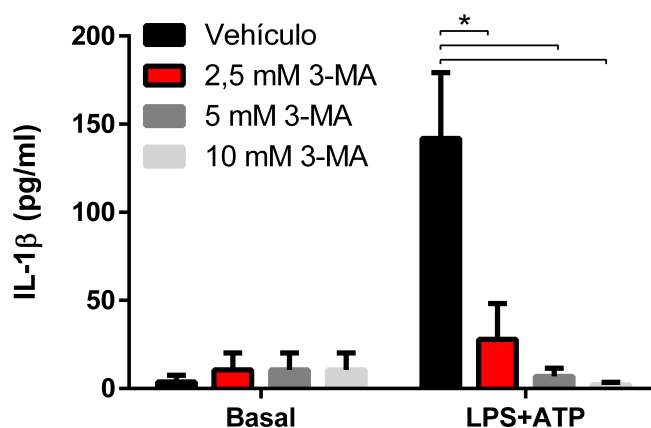


Figura 4.6: Efecto de concentraciones crecientes de 3-MA sobre la secreción de IL-1 β por neutrófilos humanos estimulados o no con LPS+ATP. La secreción de IL-1 β se evaluó por ELISA. Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 4 experimentos realizados por triplicado, * $p < 0,05$ respecto al vehículo.

Nuestros resultados indicaron que tanto la 3-MA como la WN inhibieron la secreción de IL-1 β inducida por LPS y LPS+ATP en neutrófilos (Figura 4.7), produciendo la 3-MA una inhibición casi absoluta en la secreción.

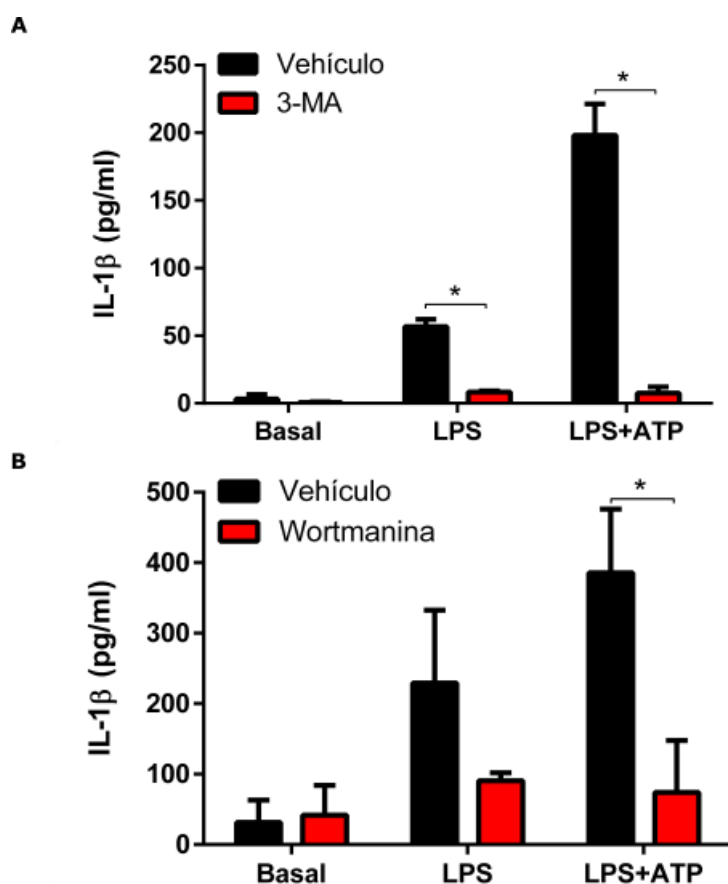


Figura 4.7: Efecto de la inhibición de la autofagia con 3-MA (A) o WN (B) sobre la secreción de IL-1 β . Los neutrófilos fueron tratados o no con 3-MA (5 nM) o WN 30 (50 nM) minutos antes de la estimulación con LPS. A las dos horas fueron estimulados o no con ATP y a las 5 hs p.e. con el LPS, la secreción de IL-1 β al sobrenadante fue evaluada por ELISA. Las barras representan las medias $\pm$ ES de 4 (A) y 3 (B) experimentos realizados por triplicado, * $p < 0,05$.

Para descartar que el efecto inhibitorio sobre la secreción de IL-1 β fuese causado por un efecto citotóxico no deseado, se determinó en simultáneo la viabilidad de las células tratadas con los inhibidores, mediante una doble marcación con Anexina V/Ioduro de Propidio por citometría de flujo. Como se observa en la figura 4.8, los efectos inhibitorios observados no pueden ser adjudicados a un efecto citotóxico de los inhibidores, ya que aun cuando con 3-MA se observa una disminución de la viabilidad [174], la misma no alcanzó la magnitud del efecto inhibitorio ejercido sobre la secreción de IL-1 β . Además, la máxima inhibición de la secreción de IL-1 β se observó con LPS+ATP, una condición en la que se observó la menor pérdida de la viabilidad. Estos hallazgos están en concordancia con estudios previos que reportaron que la 3-MA promueve la apoptosis espontánea de los neutrófilos pero reduce la apoptosis observada en células estimuladas con TNF α . Por su parte, la

WN inhibió la secreción de IL-1 β (Figura 4.7B) sin afectar significativamente la viabilidad celular (Figura 4.8B).

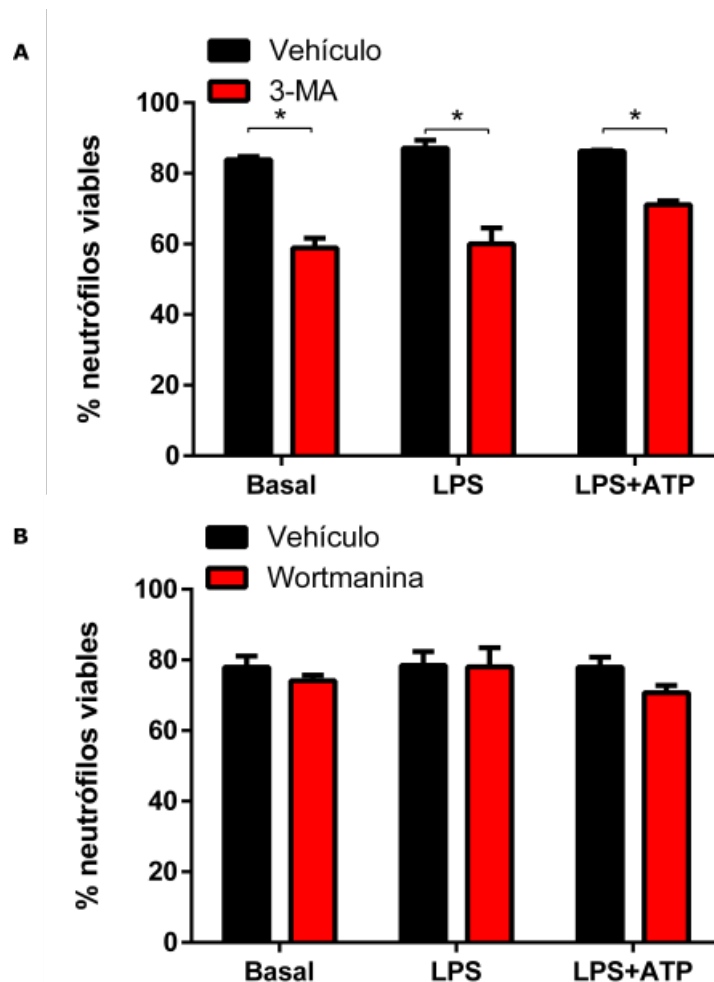


Figura 4.8: Viabilidad de los neutrófilos humanos estimulados o no con LPS o LPS+ATP pretratados o no con (A) 3-MA o (B) WN tal como se indicó en la Figura 3.3. La determinación fue realizada mediante la técnica de Anexina V/ Ioduro de Propidio y evaluada por citometría de flujo. Los datos están expresados como % de neutrófilos viables (AV-/IP-). Las barras representan las medias $\pm$ ES de 3 experimentos realizados por duplicado, * $p < 0,05$ respecto al vehículo.

Posteriormente, quisimos descartar que los inhibidores estuvieran ejerciendo un efecto inhibitorio general sobre la secreción de proteínas. Por ello decidimos evaluar el impacto de la 3-MA y de la WN sobre la secreción de la interleuquina-8 (IL-8), una citoquina cuya vía de secreción sigue la ruta canónica a través de RE-Golgi.

Los resultados mostrados en la figura 4.9, indicaron que el tratamiento con WN no inhibió la secreción de la IL-8, como sí lo hizo con la IL-1 β . La 3-MA, aun cuando produjo una inhibición de la secreción de IL-8 inducida por LPS y LPS+ATP,

esta no fue de la magnitud observada para la IL-1 β (Figura 4.7). Esta disminución en la cantidad de IL-8 secretada podría deberse a la reducción en la viabilidad que produce el tratamiento ($\sim 15\%$). Por otra parte, la 3-MA indujo por sí sola la secreción de IL-8 como se verifica en la condición basal, alcanzando niveles que no son significativamente diferentes a los inducidos por LPS, aunque las razones no son aún comprendidas.

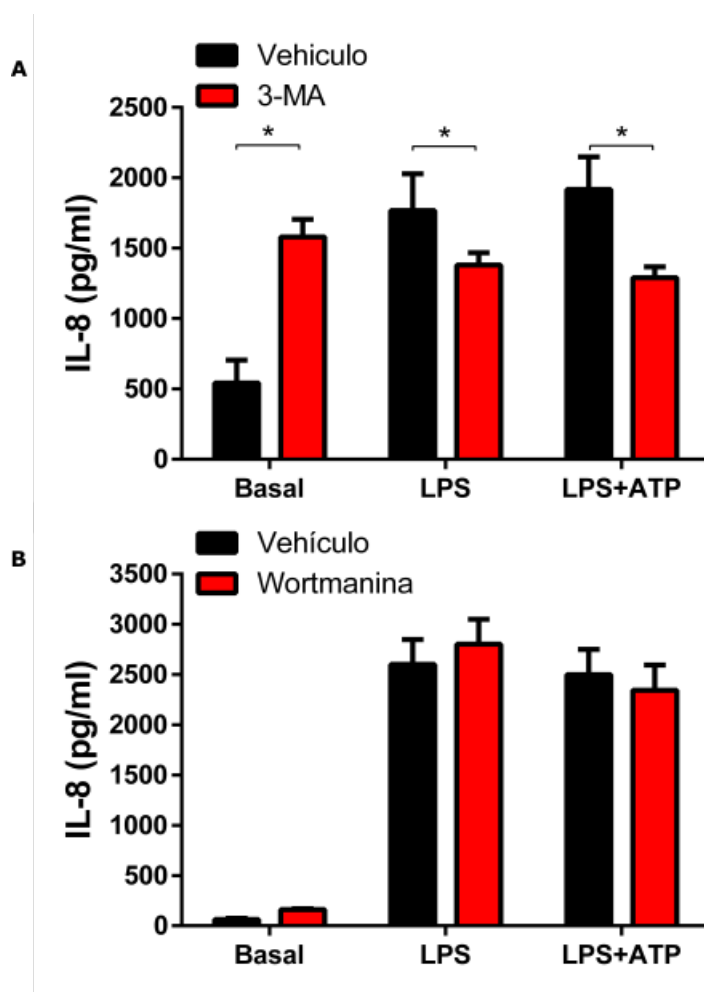


Figura 4.9: Efecto de la 3-MA (A) y de la WN (B) sobre la secreción de IL-8. Los neutrófilos pretratados o no con 3-MA o WN, fueron cultivados en ausencia o presencia de LPS y dos horas más tarde fueron estimulados o no con ATP. A las 5 hs p.e. con LPS, la secreción de IL-8 al sobrenadante fue evaluada por ELISA. Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 4 (A) y 3 (B) experimentos realizados por triplicado,* $p < 0,05$.

4.3.2. Inhibición del flujo autofágico mediante el empleo de bafilomicina A1 (Baf A1) y E64d

Habiendo inhibido los primeros pasos del flujo autofágico por medio de la 3-MA y la WN, ensayamos luego el efecto de dos inhibidores de la maduración del autofagosoma, la Baf A1 y el E64d sobre la secreción de IL-1 β . Baf A1 es un inhibidor autofágico que empleamos para evitar la maduración de la vesícula autofágica dado que inhibe a la V-ATPasa, y en consecuencia aumenta el pH de los lisosomas e impide su fusión con autofagosomas [164, 175]. De forma similar, el E64d afecta la proteólisis lisosomal, al inhibir a las cisteín proteasas.

En primer lugar se evaluó el efecto de Baf A1 agregada antes y después de la estimulación con LPS. Para ello, tratamos a los neutrófilos con Baf A1 30 min antes de la estimulación con LPS o 3 hs después de la misma. Como se muestra en la figura 4.10, el tratamiento con Baf A1 30 minutos antes de la estimulación de los neutrófilos con LPS, indujo un ligero incremento de la secreción. En cambio, al aplicar Baf A1 a las 3 hs postestimulación con LPS, se observó un efecto inhibitorio. Estos resultados contrastantes podrían deberse a múltiples motivos. Por un lado, como consecuencia de la alcalinización lisosomal, otros procesos celulares podrían ser afectados, conduciendo a alterar la síntesis/procesamiento de la proIL-1 β . Por otro lado, la concentración efectiva de Baf A1 recomendada en bibliografía para inhibir el flujo autofágico (100 nM) [164] podría no mantenerse constante a lo largo del tiempo, de modo que para el momento en que postulamos la IL-1 β sería incorporada a un autofagosoma, el efecto de la Baf A1 podría ser suboptimo. En este sentido, merece señalarse que se ha reportado que la Baf A1 posee efectos diferenciales, dependientes de su concentración. Mientras que en altas concentraciones este compuesto inhibe a la V-ATPasa y promueve la acumulación de vacuolas autofágicas [176-180], a concentraciones menores a las reportadas para inhibir a la V-ATPasa, es protectora frente a estímulos que perturban la fusión autofágica-lisosomal [181, 182]. Por otro lado, estos hallazgos podrían deberse a que luego de varias horas de tratamiento con Baf A1, se produjese un incremento en la autofagia debido a inhibición de MTORC1, tal como ha sido previamente sugerido [183]. Por todo lo expuesto, los siguientes experimentos que involucraron el empleo de Baf A1 fueron realizados incorporándola a las 3 hs. postestimulación de los neutrófilos con LPS. En un tiempo suficiente para que la transcripción, la síntesis proteica y el procesamiento de la proIL-1 β , así como también la estimulación de la autofagia tuvieran lugar.

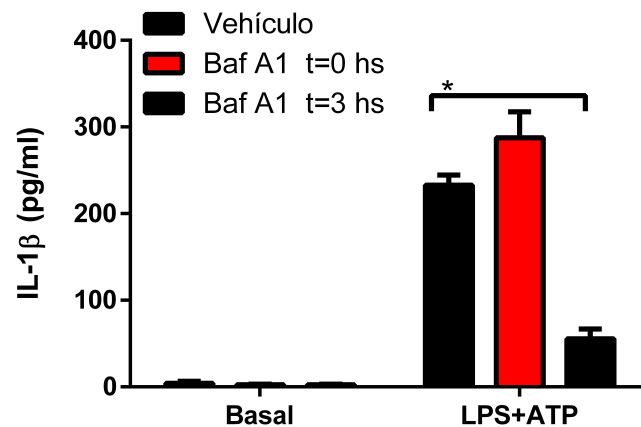


Figura 4.10: Efecto del tratamiento con Baf A1 (100 nM) previo y posterior a la estimulación de los neutrófilos con LPS. La secreción de IL-1 β se evaluó por ELISA. Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 4 experimentos realizados por triplicado, * $p < 0,05$.

Como se observa en la figura 4.11, nuestros resultados indicaron que la Baf A1 inhibió la secreción de IL-1 β inducida tanto por LPS como por LPS+ATP en neutrófilos, cuando fue incorporada a las 3 hs p.e. con LPS.

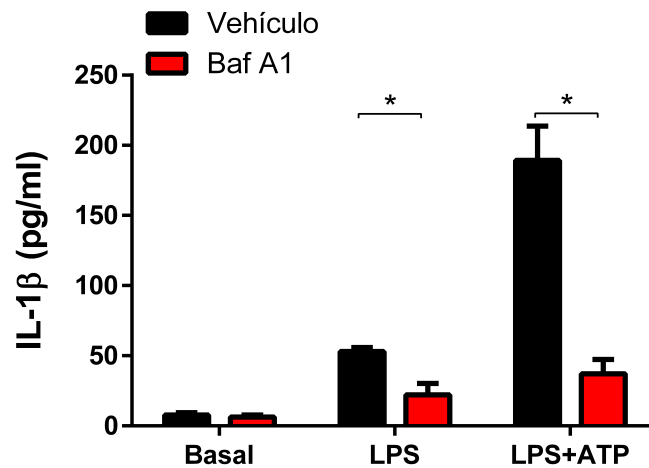


Figura 4.11: Efecto de la inhibición del flujo autofágico con Baf A1 sobre la secreción de IL-1 β . Los neutrófilos fueron estimulados o no con LPS o LPS+ATP. A las 3 hs. p.e. se adicionó Baf A1 (100 nM) y a las 5 hs. se recuperaron los sobrenadantes y en ellos se determinó la concentración de IL-1 β por ELISA. Las barras representan las medias $\pm$ ES de 5 experimentos realizados por triplicado, * $p < 0,05$.

Para descartar que el efecto inhibitorio de Baf A1 sobre la secreción de IL-1 β fuera consecuencia de una pérdida de la viabilidad celular, determinamos la misma

mediante una doble marcación con Anexina V/Ioduro de Propidio por citometría de flujo. Como se observa en la figura 4.12 no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad de neutrófilos estimulados con LPS o LPS+ATP en presencia o ausencia de Baf A1, que pudiesen justificar la disminución de la secreción de IL-1 β observada.

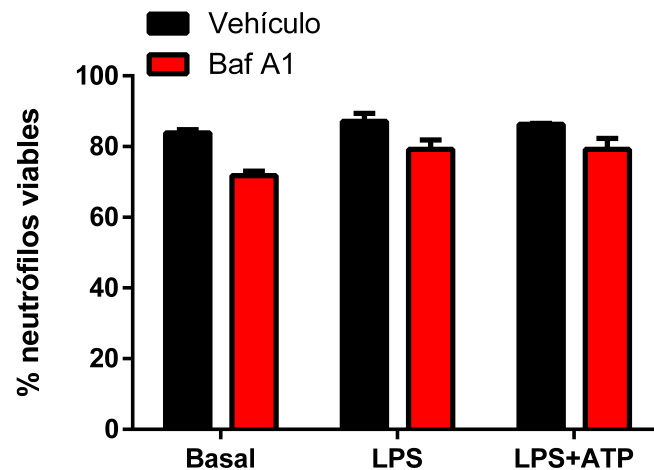


Figura 4.12: Efecto de la Baf A1 sobre la viabilidad de los neutrófilos estimulados o no con LPS o LPS+ATP como se indicó en la figura 3.3. La determinación fue realizada mediante la técnica de Anexina V/ Ioduro de Propidio y evaluada por citometría de flujo. Los datos están expresados como % de neutrófilos viables (AV-/IP-). Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 5 experimentos realizados por duplicado. Las diferencias entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas.

Este inhibidor tampoco moduló significativamente la secreción de IL-8, confirmando que, agregado a las 3 hs p.e. no impacta sobre la ruta canónica de secreción de RE-Golgi pero sí sobre la secreción no convencional de IL-1 β . Ver Figura 4.13.

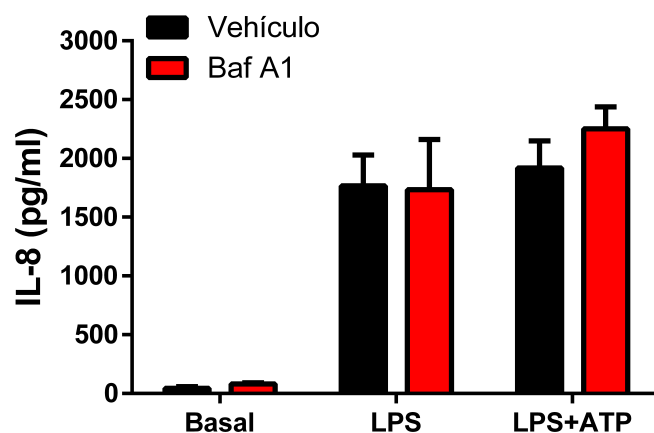


Figura 4.13: Efecto de la inhibición del flujo autofágico con Baf A1 sobre la secreción de IL-8. Los neutrófilos fueron estimulados como se indicó en la figura 3.3. Luego, la secreción de IL-8 al sobrenadante se evaluó por ELISA. Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 5 experimentos realizados por duplicado. Las diferencias entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas.

En ensayos adicionales, corroboramos que el inhibidor de cisteín proteadas lisosomales E64d, también es capaz de inhibir la secreción de IL-1 β . Ver Figura 4.14.

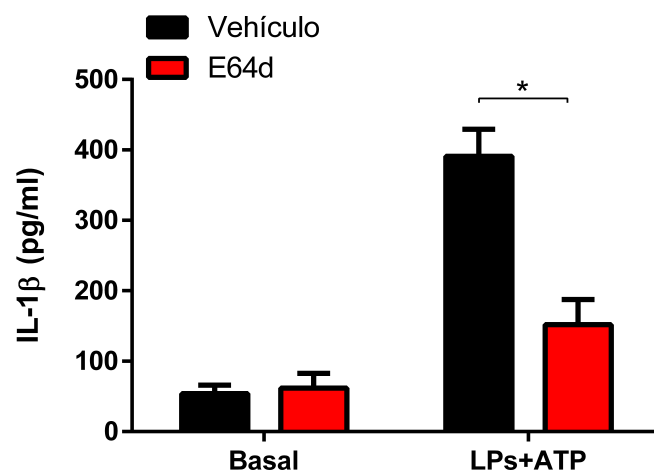


Figura 4.14: Efecto de la inhibición del flujo autofágico con E64d sobre la secreción de IL-1 β . Los neutrófilos fueron estimulados o no con LPS+ATP. A las 3 hs. p.e. se adicionó E64d o vehículo y a las 5 hs. se recuperaron los sobrenadantes y en ellos se determinó la concentración de IL-1 β por ELISA. Las barras representan las medias $\pm$ ES de 6 experimentos realizados por triplicado, * $p < 0,05$ respecto al vehículo.

4.3.3. Efecto de la disminución de la expresión de ATG5 sobre la secreción de IL-1 β por neutrófilos PLB-985

Con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos mediante el uso de inhibidores del proceso autofágico en neutrófilos aislados de sangre periférica, realizamos experimentos adicionales empleando la línea celular PLB-985. La misma deriva de la línea celular HL-60, la que a su vez proviene de una leucemia promielocítica aguda humana. Estas células presentan como ventaja, respecto de los neutrófilos maduros, el poder ser transfectadas. Ello nos permitiría trabajar con células en las cuales el proceso autofágico pudiese ser inhibido por interferencia de un intermediario clave del proceso autofágico. Para ello, las células PLB-985 fueron diferenciadas a neutrófilos por cultivo en presencia de 0,5 % DMF como se indicó previamente en materiales y métodos. En adelante a las células diferenciadas las denominaremos neutrófilos PLB-985. Los neutrófilos PLB-985 fueron cultivados en ausencia o presencia de LPS en combinación con ATP. Como puede observarse en la figura 4.15, los neutrófilos PLB-985 liberaron IL-1 β en respuesta a LPS+ATP. Para corroborar si la secreción de IL-1 β mediada por neutrófilos PLB-985 podía ser modulada de modo similar a lo observado en neutrófilos primarios, determinamos el impacto ejercido por inhibidores de la autofagia. Como se observa en la figura 4.15 Baf A1 y 3-MA modularon la secreción de IL-1 β inducida por LPS+ATP en neutrófilos PLB-985, de modo similar a lo que ocurre en neutrófilos primarios.

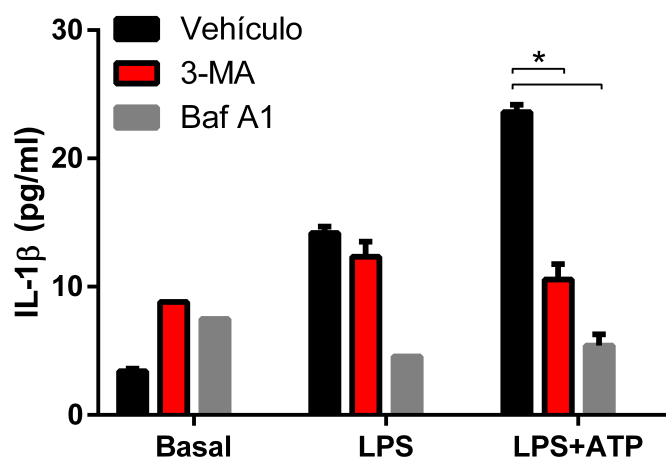


Figura 4.15: Secreción de IL-1 β por neutrófilos PLB-985. Las células fueron tratadas o no con 3-MA 30 min previo a la estimulación con LPS. Dos horas más tarde fueron estimuladas o no con ATP y a las 3 hs posestimulación con LPS a otro set de células se lo trató con Baf A1. A las 5 hs p.e. con LPS se recuperaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de IL-1 β por ELISA. Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 3 experimentos realizados por triplicado, * $p < 0,05$.

En estudios adicionales evaluamos el impacto ejercido por la disminución de la

expresión de un intermediario crítico del proceso autofágico como lo es la molécula Atg5, en neutrófilos PLB-985. Para ello, procedimos a inducir la disminución de la expresión de *ATG5* mediante el uso de ARN de interferencia. Como puede observarse en la figura 4.16A, una disminución de la expresión de *ATG5* de aproximadamente el 50 % inhibió fuertemente la secreción de IL-1 β 4.16B. Este resultado confirma, nuestros hallazgos realizados con las diferentes drogas inhibidoras del proceso autofágico empleando neutrófilos primarios. Por lo que concluimos que en neutrófilos humanos la inhibición de la autofagia inhibe la secreción de IL-1 β .

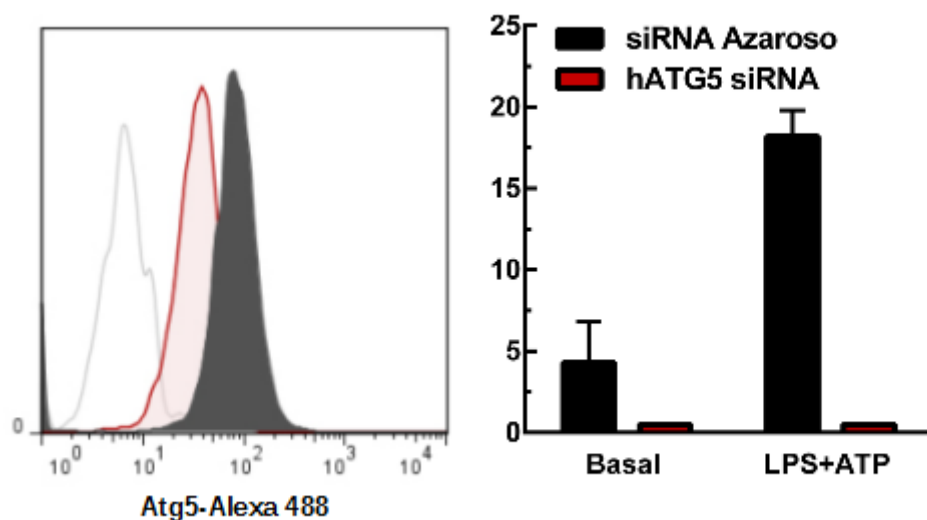


Figura 4.16: (A) Histograma representativo de la expresión de ATG5 en neutrófilos PLB-985 sometidos a tratamiento con un ARN de interferencia irrelevante (azaroso) (gris) o con un ARN interferencia de *ATG5* (rojo). (B) Concentración de IL-1 β en el sobrenadante de esas células estimuladas o no con LPS+ATP. La secreción de IL-1 β se evaluó por ELISA. Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 4 experimentos realizados por duplicado

4.4. Inducción de la Autofagia en neutrófilos y su impacto en la liberación de IL-1 β

Para confirmar que la autofagia es requerida para la secreción de IL-1 β , evaluamos el efecto que ejerce la estimulación positiva del flujo autofágico. Para ello determinamos el impacto de la privación de nutrientes (hambre) sobre la secreción de la IL-1 β en neutrófilos primarios estimulados con LPS o LPS+ATP.

Los resultados obtenidos indicaron que la estimulación de la autofagia por hambre, promueve la secreción de IL-1 β inducida por LPS y LPS+ATP (Figura 4.17). Realizamos como control adicional, un ensayo en el cual el medio de cultivo

fue reemplazado por medio completo (mock hambreado), de forma tal de descartar que la inducción de la secreción de la IL-1 β observada en la condición hambreado, se debiera a la manipulación adicional a la que fueron sometidos los neutrófilos cuando se les practicó el cambio de medio de cultivo. Aún en estas condiciones, la secreción de IL-1 β fue menor que en células sometidas a privación de nutrientes y similar a la observada en neutrófilos que permanecieron en medio completo por todo el período de cultivo.

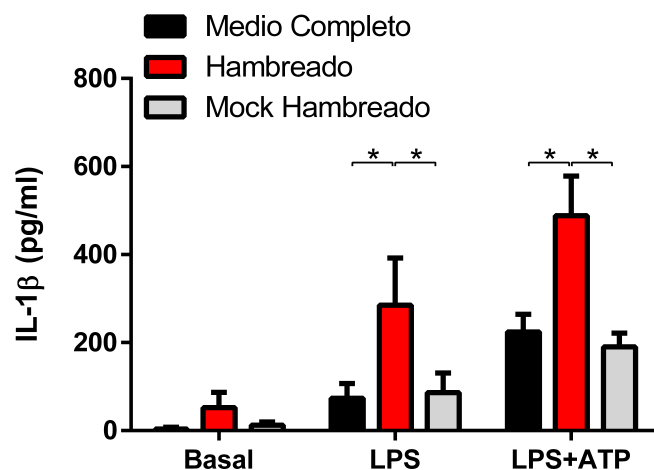


Figura 4.17: Efecto de la inducción de autofagia sobre la secreción de IL-1 β por neutrófilos. Las células fueron cultivadas por 2 hs en presencia o ausencia de LPS (250 ng/ml), posteriormente fueron estimuladas con ATP (2,5 mM) y a las 4hs post estimulación con LPS el medio de cultivo fue removido y reemplazado por EBSS (Hambreado) o por medio completo (mock hambreado) durante una hora adicional. En una condición experimental adicional las células no fueron sometidas a cambio de medio (medio completo). La secreción de IL-1 β al sobrenadante fue evaluada por ELISA. Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 4 experimentos realizados por triplicado, * $p < 0,05$ respecto al vehículo.

El efecto inductor de la secreción fue propio de la IL-1 β , ya que la privación de nutrientes no afectó la secreción de IL-8, citoquina que como hemos señalado, es secretada por la vía canónica de secreción de proteínas (Figura 4.18).

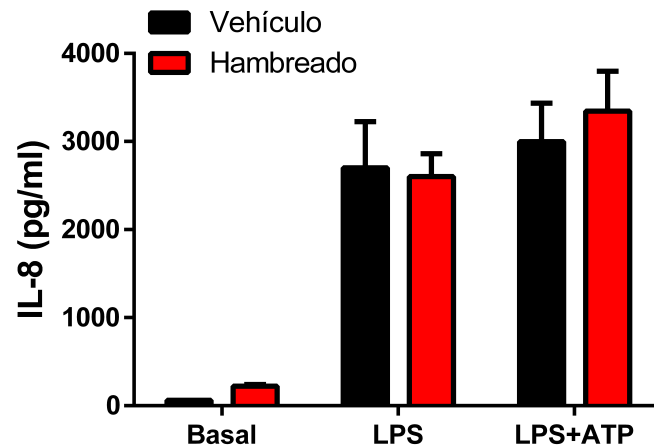


Figura 4.18: Concentración de IL-8 determinada por ELISA en los sobrenadantes de cultivo de neutrófilos estimulados como se indicó en la figura 3.3. Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 4 experimentos realizados por triplicado. Las diferencias entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas.

Para descartar la posibilidad de que bajo condiciones de privación de nutrientes, el incremento en la secreción de IL-1 β se debiese a una pérdida de la viabilidad que indujera la liberación del contenido intracelular al sobrenadante, analizamos la viabilidad de los neutrófilos estimulados con LPS y LPS+ATP. Como puede observarse en la figura 4.19, la privación de nutrientes durante la última hora de cultivo no afectó la viabilidad de los neutrófilos a las 5 hs. postestimulación.

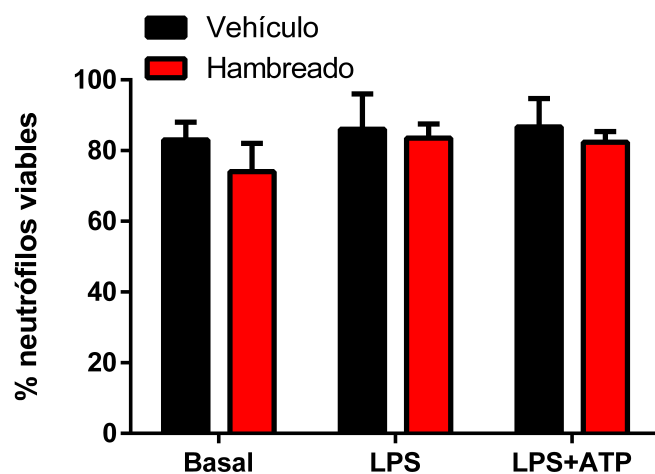


Figura 4.19: Viabilidad de los neutrófilos humanos tratados como se indicó en la figura 3.3. La determinación fue realizada mediante la técnica de Anexina V/ Ioduro de Propidio por citometría de flujo. Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 4 experimentos realizados por duplicado. Las diferencias entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas.

4.5. Identificación de IL-1 β en vesículas autofágicas

Un postulado necesario en nuestra hipótesis de trabajo sobre los efectos de la autofagia en la secreción, es la existencia de vesículas autofágicas que contengan IL-1 β . Con el objeto de determinar si la IL-1 β es incorporada a autofagosomas, realizamos experimentos estimulando a los neutrófilos con LPS+ATP y evaluando mediante inmunomarcación y MLC, la presencia de vesículas en las que la IL-1 β colocalizara con LC3B. Como puede observarse en la figura 4.20, en condiciones basales, los neutrófilos casi no produjeron IL-1 β (rojo) y exhibieron niveles muy bajos de autofagia (verde). Por el contrario, cuando las células fueron estimuladas con LPS+ATP, la marca de LC3B fue más abundante, lograndose identificar un mayor número de estructuras de tipo vesicular. Asimismo, se determinó la presencia de IL-1 β tanto citoplasmática como vesicular. Los eventos de colocalización, que se evidencian por la formación de color amarillo producto de la superposición de la señal de LC3B (verde) e IL-1 β (rojo), indicaron la presencia de vesículas autofágicas conteniendo IL-1 β . La presencia de vesículas autofágicas que no contienen IL-1 β son a su vez, un indicador de la especificidad de la marcación.

Para disponer de un parámetro objetivo del nivel de colocalización de la IL-1 β con LC3B realizamos un análisis de colocalización utilizando el software Fiji con el plugin JACoP [184]. Para la imagen mostrada en 4.20, correspondiente al tratamiento con LPS+ATP, el coeficiente de Pearson es de $r=0,713$. A su vez los

coeficientes de Manders fueron $M1(LC3B)=0,743$ y $M2(IL-1\beta)=0,716$.

Los valores promedios para 3 experimentos independientes son $CP=0,85\pm0,1$; $M1(LC3B)=0,77\pm0,2$; $M2(IL-1\beta)=0,80\pm0,15$, lo que soporta nuestra observación de colocalización en $IL-1\beta$ y LC3B.

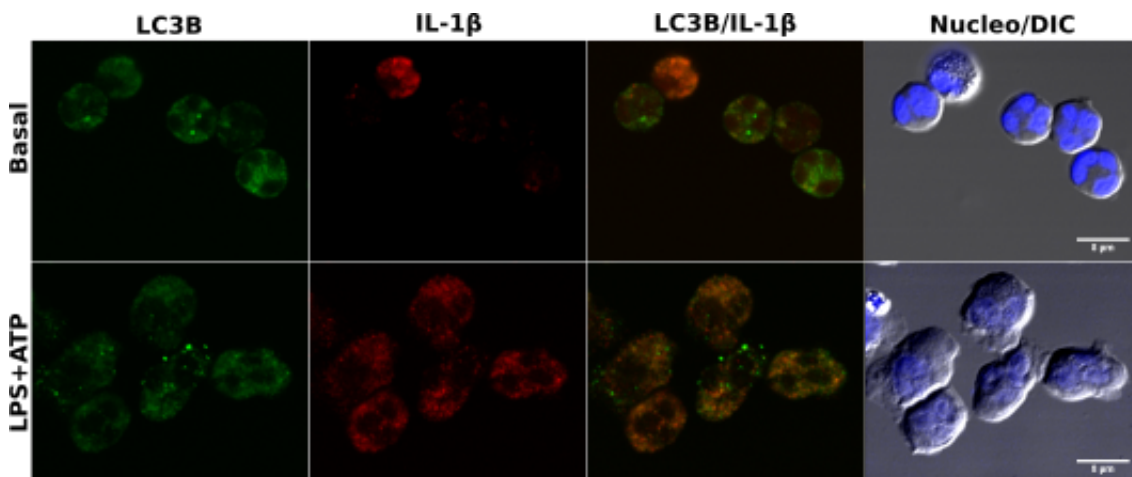


Figura 4.20: La estimulación de neutrófilos con LPS+ATP promueve la localización de $IL-1\beta$ en vesículas autofágicas. Los neutrófilos fueron estimulados siguiendo el esquema descrito en la figura 3.3. A las 4 horas postestimulación con LPS, las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas empleando anticuerpos de conejo anti-LC3B y de ratón anti- $IL-1\beta$ y los anticuerpos secundarios obtenidos en cabra conjugados a DyLight 488 (verde) y DyLight549 (rojo), respectivamente. Además, se realizó una tinción del ADN nuclear con ToPro3. Las imágenes, que son representativas de 4 experimentos realizados, fueron adquiridas mediante un microscopio confocal Olympus Fluoview1000 con un objetivo de inmersión Plapon 60X/NA 1.42.

A partir de las imágenes obtenidas, se cuantificaron las células con vesículas dobles positivas para LC3B e $IL-1\beta$ mediante un “object based-analysis” utilizando el software FIJI. Pudimos confirmar eventos de colocalización en casi el 40 % de las células estimuladas con LPS+ATP (Figura 4.21)A. Además, evaluamos si el tratamiento con Baf A1 o la privación de nutrientes modulan el número de células en las que se observa colocalización de $IL-1\beta$ con LC3B. Dado que estudios previos reportaron que la Baf A1 al inhibir la fusión de autofagosomas a lisosomas, impide la degradación de LC3B, razonamos que el tratamiento de los neutrófilos estimulados con LPS+ATP con Baf A1 debería aumentar el número de células en las que se observaran eventos de colocalización de $IL-1\beta$ con LC3B. Sin embargo no se detectó dicho aumento (Fig. 4.21). Esto podría deberse a que algunas de estas vesículas, cuya vida media es prologanda por Baf A1, podrían fusionarse entre si [164], aumentando el tamaño de las vesículas de células que ya habían sido consideradas positivas por poseer al menos un evento de colocalización.

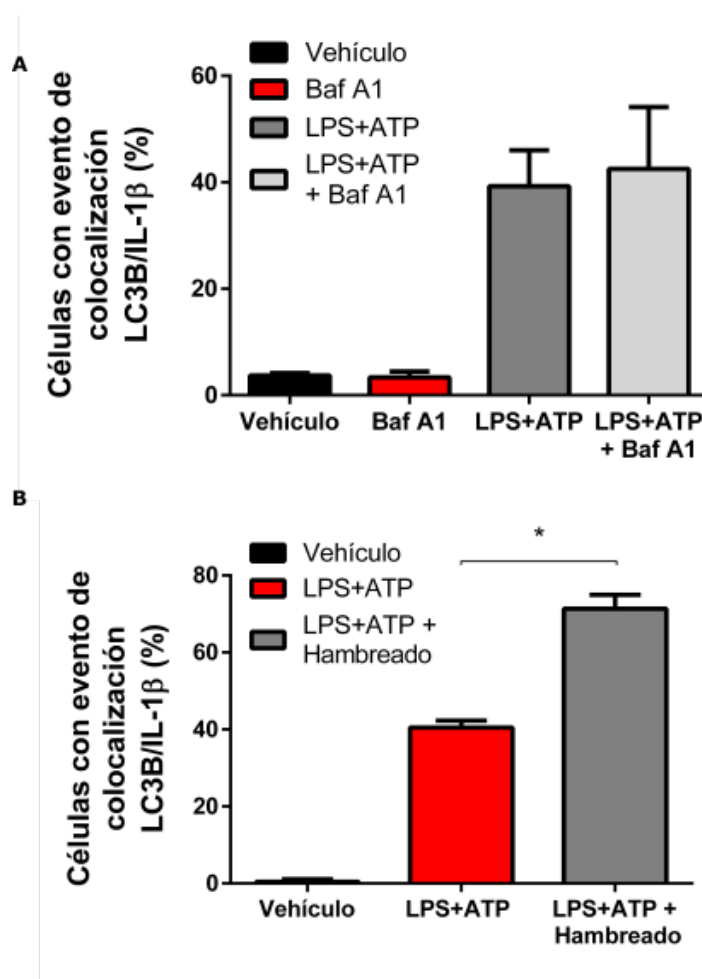


Figura 4.21: Cuantificación de células en las cuales se observa al menos un evento de colocalización de LC3B/IL-1 β . Los neutrófilos humanos fueron estimulados con LPS y dos horas más tarde con ATP. A las 3 hs p.e. con LPS, se les agregó (A) Baf A1 (100 nM) o (B) se les modificó el medio de cultivo por un medio deprivado de nutrientes y a las 4 hs, se fijaron, permeabilizaron e inmunomarcaron. Luego se adquirieron las imágenes con un microscopio confocal Olympus Fluoview1000 con un objetivo de inmersión Plapon 60X/NA 1.42 y se analizaron usando el plugin JACoB, del software Fiji. Los criterios umbrales para discriminar señales positivas de background, fueron calculados por el mismo software de forma independiente del experimentador. Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes, * p<0,05.

Por otra parte, nosotros consideramos que si la estimulación de la autofagia por privación de nutrientes promovió la secreción de IL-1 β , si realizáramos una evaluación una hora antes del tiempo al cual se analiza la secreción, este tratamiento debería incrementar la presencia de autofagosomas conteniendo IL-1 β . Los resultados indicaron que, tal como se esperaba, la privación de nutrientes incrementó la colocalización vesicular de la IL-1 β con LC3B, traduciéndose en un incremento del

porcentaje de células con eventos colocalizantes (Figura 4.21B). Merece señal que en algunas células el hambre indujo la aparición de extensas áreas celulares en las que IL-1 β colocalizaba con LC3B (Figura 4.22). En la figura se muestra con flechas, estas estructuras poseen diversos tamaños y pueden no colocalizar (A), como colocalizar completamente (B). La naturaleza de estas áreas no es clara. Una posibilidad es que sean grandes vesículas producto de la fusión de otras más pequeñas. Otra posibilidad es que se trate de múltiples vesículas pequeñas que se ubican cercanas en el espacio y que debido al límite de resolución de la MLC aparecen como una sola entidad. También cabe la posibilidad de que se trate de cuerpos multivesiculares.

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la IL-1 β es incorporada a un compartimiento autofágico a partir del cual es secretada al medio extracelular.

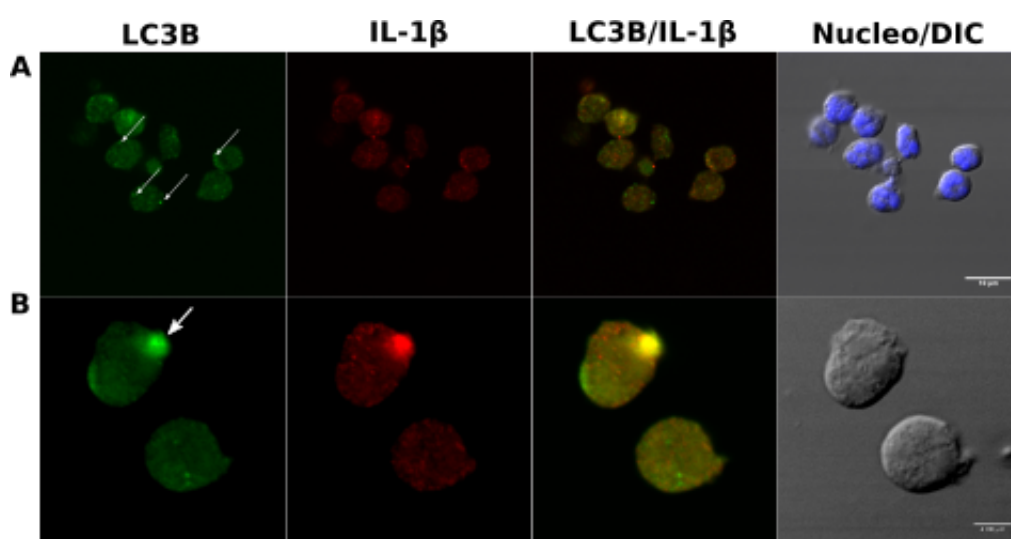


Figura 4.22: (A) Imágenes representativas de neutrófilos humanos estimulados con LPS+ATP, y sometidos al tratamiento inductor de autofagia por privación de nutrientes. (B) Imágenes encontradas en algunos de los campos microscópicos analizados. Las imágenes, que son representativas de 4 experimentos realizados, fueron adquiridas mediante un microscopio confocal Olympus Fluoview1000 con un objetivo de inmersión Plapon 60X/NA 1.42.

4.6. Relación temporal entre la inducción de la autofagia y la secreción de IL-1 β

Utilizando la técnica de seguimiento de autofagia por citometría de flujo, nos propusimos evaluar si existe una correlación temporal inversa entre los niveles de LC3B asociados a vesículas, y la secreción de IL-1 β .

Para ello realizamos experimentos estimulando o no a los neutrófilos con LPS y dos horas más tarde con ATP, tal como se describió en la figura 3.3. Se determinó el grado de autofagia por citometría de flujo en los pellets celulares, y en simultaneo

las concentraciones de IL-1 β liberada a los sobrenadantes por ELISA.

Como puede verse en la figura 4.23, los niveles de LC3B asociados a membrana, decayeron conforme avanzó el tiempo. Esta caída, coincidió con la aparición de IL-1 β en los sobrenadantes.

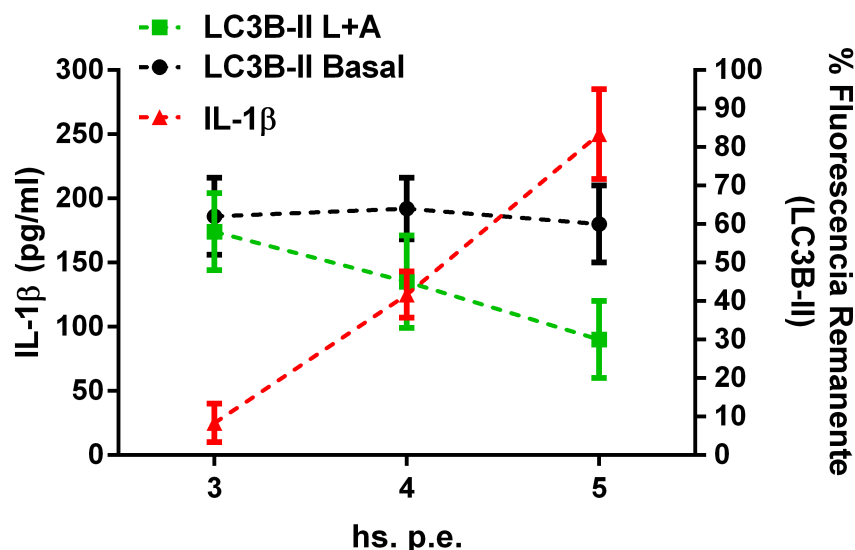


Figura 4.23: Cinética de la secreción de IL-1 β y de los niveles de autofagia en neutrófilos no estimulados y estimulados con LPS+ATP. En el eje izquierdo se grafica la concentración de IL-1 β determinada por ELISA en sobrenadantes de cultivo de neutrófilos humanos estimulados con LPS+ATP. En el eje derecho se grafica el % de fluorescencia remanente de LC3B tras el tratamiento con saponina. Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes.

Estos estudios indicaron que después de la estimulación de los neutrófilos con LPS+ATP, la concentración de IL-1 β en los sobrenadantes aumentó en simultáneo, con una disminución de los autofagosomas.

En conjunto, nuestros hallazgos están en concordancia con la posibilidad de que las vesículas LC3B+ conteniendo IL-1 β se fusionen con la membrana plasmática mediando la secreción de IL-1 β al medio extracelular, o sean liberadas desde cuerpos multivesiculares luego de la fusión de éstos con la membrana plasmática. No obstante, no es posible descartar que parte de la reducción del LC3B-II detectada sea debida a reciclaje celular del mismo.

4.7. Evaluación de los niveles de IL-1 β intracelulares, con el tratamiento con Baf-A1 y 3-MA

Los resultados mostrados previamente indicaron que la Baf A1 y la 3-MA, inhibieron la secreción de IL-1 β en neutrófilos estimulados con LPS+ATP. Teniendo en

cuenta, que la IL-1 β sintetizada no es secretada, evaluamos el contenido intracelular de dicha citoquina bajo los tratamientos anteriormente descritos.

En la 4.24, se muestra el contenido intracelular de IL-1 β a las 5 p.e. con LPS. El mismo se realizó produciendo una ruptura celular de las células tratadas, acompañada de un fuerte tratamiento contra proteasas endógenas.

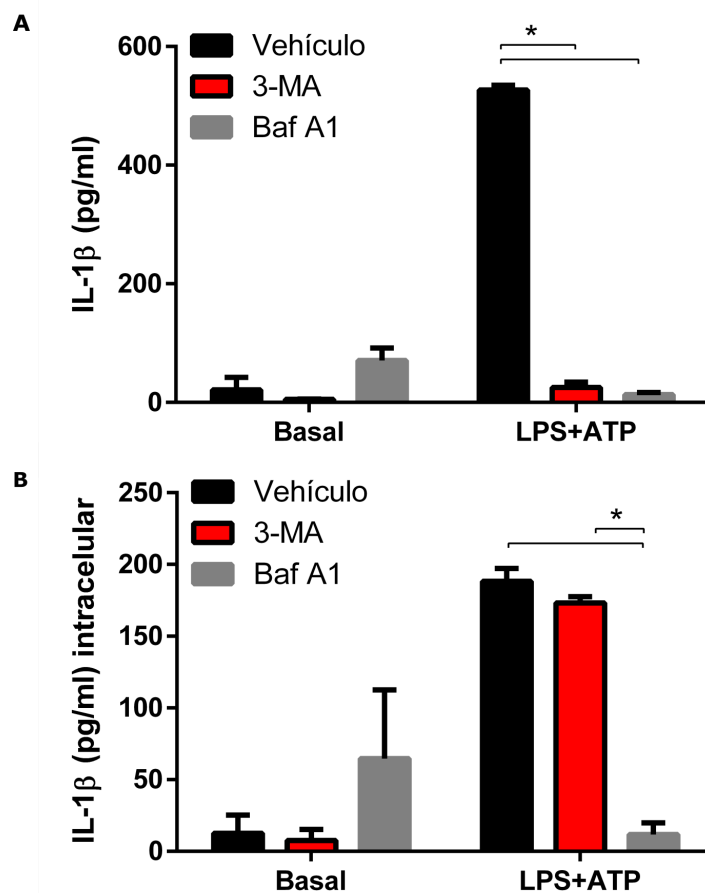


Figura 4.24: Efecto del tratamiento con 3-MA y Baf A1 sobre la secreción y expresión intracelular de IL-1 β . Los neutrófilos fueron estimulados o no con LPS+ATP y tratados o no con 3-MA y Baf A1. A las 5 hs se recuperaron los sobrenadantes en ellos se determinó la concentración de IL-1 β por ELISA (A) y en los pellets se determinó la expresión de IL-1 β por ELISA previa ruptura celular (B). Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 3 (A-B) experimentos por triplicado,* $p < 0,05$ respecto al vehículo.

Se observa en el caso de la 3-MA, que los niveles de IL-1 β intracelular no difieren significativamente de la condición estimulada normal, es decir no se ve una acumulación pese a la fuerte inhibición de la secreción. En el caso particular de la Baf A1, no solo no se ve una acumulación de la citoquina, sino que se observa una marcada

disminución. Fenómeno que podría ser explicado, mediante una degradación parcial o total de la misma.

4.8. Identificación de la NADPH oxidasa en vesículas que contienen IL-1 β

Los resultados previamente detallados indican que la IL-1 β es incorporada a un compartimiento autofágico. Surge entonces el interrogante de cómo podría la IL-1 β contenida en vesículas autofágicas escapar a la degradación lisosomal y ser secretada de la célula.

Dado que en estudios previos determinamos que la actividad de la enzima NADPH oxidasa es requerida para la exportación de la IL-1 β desde los neutrófilos humanos [88], nos planteamos una hipótesis sosteniendo que la actividad de esta enzima contribuye a evitar la acidificación de la vesícula que contiene a la IL-1 β y de este modo evitar sea degradada por proteasas lisosomales ácidas permitiendo de este modo que la molécula activa sea secretada.

Esta hipótesis se sustenta en estudios previos descritos en la sección Introducción. Dichos trabajos establecieron que, en las membranas fagosomales existen canales de protones activados por voltaje denominados canales Hv1, que bombean H⁺ al lumen fagosomal para compensar la carga eléctrica generada por la actividad de la NADPH oxidasa en dichos fagosomas. Estos estudios establecieron que este mecanismo permite mantener el pH fagosomal relativamente neutro por un lapso de tiempo prolongado (30 min), evitando además que V-ATPasas se incorporen a la membrana de dichos fagosomas e induzcan una disminución del pH fagosomal. Aun cuando esta información proviene de experimentos realizados con fagosomas, existen reportes indicando que la NADPH oxidasa se ensambla también en respuesta a agonistas solubles como el LPS en membranas endosomales y otros estudios indicando que los canales Hv1 se localizan en los mismos gránulos que contienen a los componentes de membrana de la NADPH oxidasa [80]. Estos antecedentes nos impulsaron a poner a prueba la hipótesis planteada, comenzando por determinar si en nuestro sistema experimental la NADPH oxidasa podía ser encontrada en vesículas conteniendo IL-1 β .

Para ello, realizamos inmunomarcaciones y determinamos por MLC la distribución de la molécula gp91, componente de membrana de la NADPH oxidasa, en conjunto con la distribución de IL-1 β y LC3B. Como puede observarse en la Figura 4.25 existe una abundante expresión de gp91 en toda la célula, con algunas zonas en las que colocaliza con la señal de la IL-1 β (amarillo), indicando que la IL-1 β puede alojarse en vesículas que contengan en su membrana al citocromo b558 de la NADPH oxidasa. Sin embargo, en muy pocas oportunidades la IL-1 β colocalizó con gp91 y LC3B simultáneamente. Es importante notar que existen varias zonas de alta intensidad de señal, tanto para el canal de la IL-1 β , como el de la LC3B o gp91, donde no hay colocalización alguna. Dado que las vesículas tienen un comportamiento dinámico, la aparición de zonas no colocalizantes es esperable. Paralelamente estas

marcas nos sirven de control de la especificidad de los anticuerpos, garantizando que no existe cruzamiento de señales. Se marca con flechas blanca, eventos puntales de superposición de las tres señales.

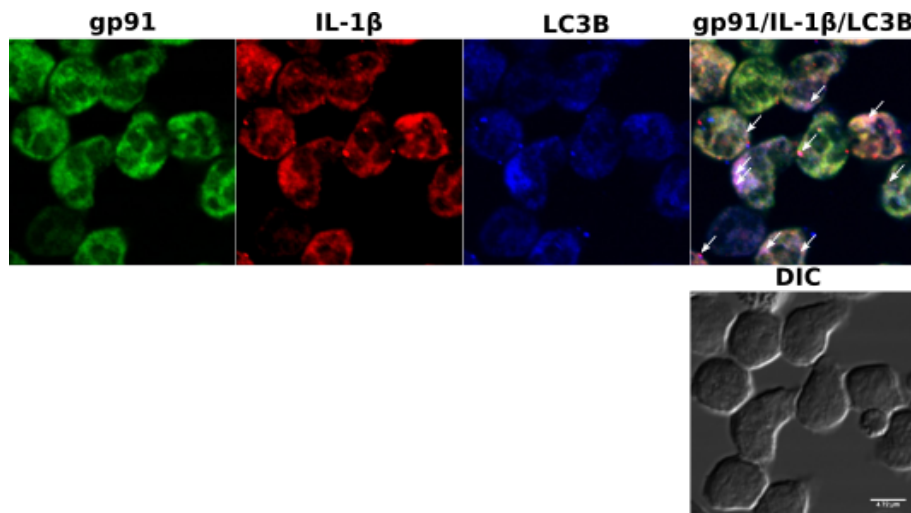


Figura 4.25: Los neutrófilos fueron estimulados siguiendo el esquema descrito en la figura 3.3. A las 4 horas postestimulación con LPS las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas empleando anticuerpos IgG obtenidos en conejo anti-LC3B, en ratón anti-IL-1 β , y en ratón anti-gp91, junto a los correspondientes anticuerpos secundarios. La marcación fue realizada de acuerdo al protocolo recomendado por Jackson ImmunoResearch para marcaciones múltiples que incluyen dos anticuerpos provenientes de la misma especie [165]. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Olympus Fluoview1000 con un objetivo de inmersión Plapon 60X/NA 1.42. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes

4.9. Efecto de la inhibición de la NADPH oxidasa sobre la expresión intracelular de IL-1 β y su secreción

Para evaluar si la actividad de la NADPH oxidasa está implicada en el rescate de la degradación de la IL-1 β , procedimos a evaluar el impacto de la inhibición de la NADPH oxidasa por acción de la droga DPI [185]. Ver figura 4.26.

Los neutrófilos fueron estimulados con LPS+ATP, luego de 3 hs. de la estimulación con el LPS se les adicionó el DPI, a las 5 hs se evaluó la expresión intracelular de IL-1 β y la concentración de IL-1 β en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Este esquema experimental fue diagramado para que al momento de adicionar el DPI, hubiese transcurrido un tiempo suficiente de síntesis de IL-1 β , posibilitando la incorporación a los autofagosomas.

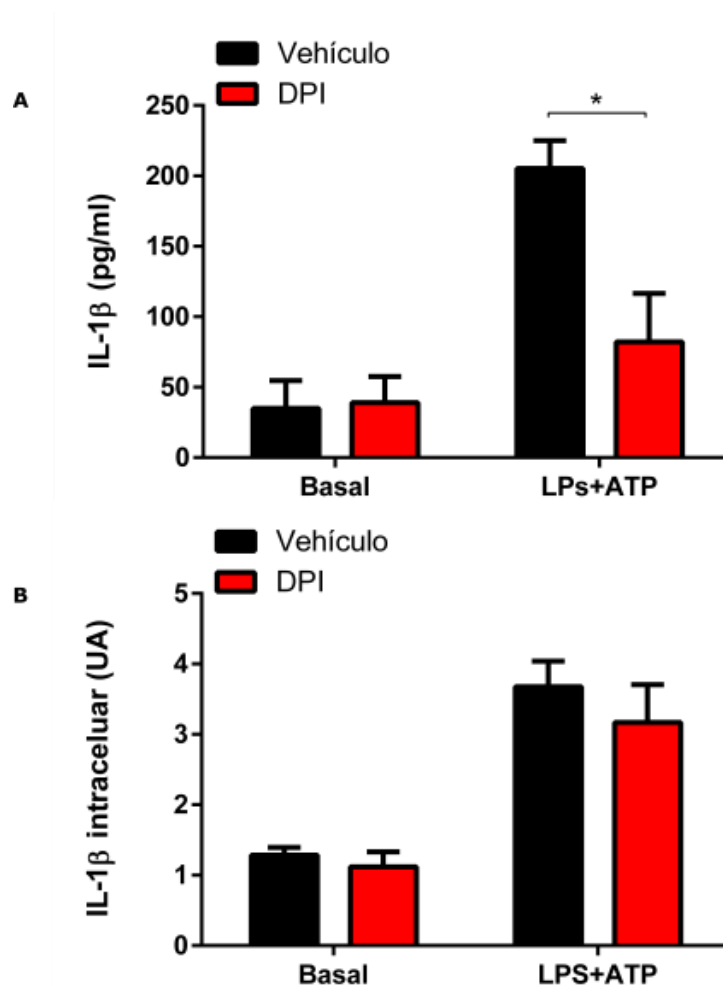


Figura 4.26: Efecto del tratamiento con DPI sobre la secreción y expresión intracelular de IL-1 β . Los neutrófilos fueron estimulados o no con LPS+ATP y a las 3 hs fueron tratados o no con DPI. A las 5 hs se recuperaron los sobrenadantes y en ellos se determinó la concentración de IL-1 β por ELISA (A) y en los pellets se determinó la expresión de IL-1 β por inmunomarcación y citometría de flujo expresándose como unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia (B). Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 5 (A) y 3 (B) experimentos por triplicado,* $p < 0,05$ respecto al vehículo.

Como puede observarse en la figura 4.26 la secreción de IL-1 β se encontró marcadamente disminuida con el tratamiento de DPI. Sin embargo, los niveles de IL-1 β intracelulares en los neutrófilos estimulados con LPS+ATP tratados o no con DPI fueron similares. Estos resultados indicaron que en presencia de DPI disminuyó la cantidad de IL-1 β total inducida por LPS+ATP, dado que no fue encontrada en el sobrenadante y no se vio acumulada intracelularmente, sugiriendo que cuando la oxidasa es inactivada, la IL-1 β podría sufrir un proceso degradativo. Para descartar que el efecto degradativo sea causado por DPI, de forma independiente de la inhi-

bición de la NADPH oxidasa, realizamos experimentos adicionales con Apocinina, otro inhibidor de la NADPH oxidasa.

Como puede observarse en la figura 4.27, la apocinina indujo una inhibición de la secreción de IL-1 β , sin que se observara acumulación intracelular de la IL-1 β .

Estos resultado acompañan nuestra hipótesis inicial, por la cual la actividad de la NADPH oxidasa regularía la degradación intracelular de la IL-1 β afectando su secreción.

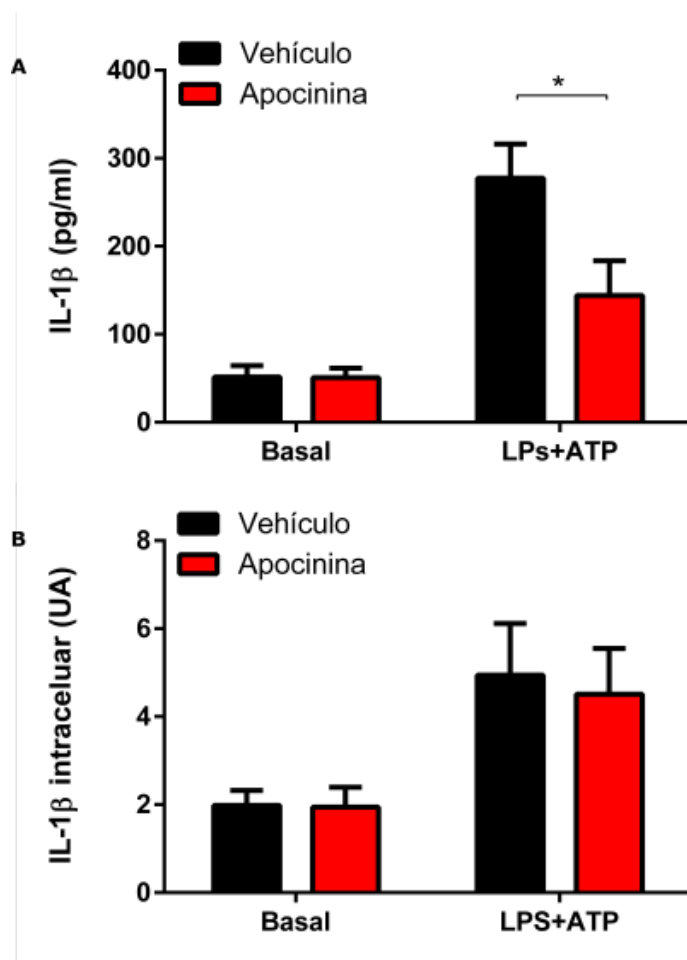


Figura 4.27: Efecto del tratamiento con apocinina sobre la secreción y expresión intracelular de IL-1 β . Los neutrófilos fueron estimulados siguiendo el protocolo descrito en la figura 3.3, excepto que la determinación de IL-1 β intracelular fue realizada a las 5 hs p.e. con LPS. (A) Concentración de IL-1 β en los sobrenadantes de cultivo. (B) Expresión intracelular de IL-1 β . Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 7 (A) y 3 (B) experimentos realizados por triplicado, (A) * $p < 0,05$ respecto al vehículo.

4.10. Evaluación de la acidificación vesicular tras la inhibición de la NADPH oxidasa

Si la actividad de la NADPH oxidasa fuese necesaria para evitar la acidificación vesicular y en consecuencia la degradación de la IL-1 β por proteasas ácidas, el tratamiento con DPI de neutrófilos estimulados con LPS+ATP debería incrementar el número de vesículas ácidas. Para evaluar esta posibilidad, empleamos la sonda acidotrópica Lysotracker Red DND-99 (LT), que se incorpora a organelas y emite fluorescencia en condiciones ácidas. Ver Figura 4.28. Merece destacarse que el neutrófilo posee múltiples compartimientos vesiculares y gránulos con pH ácido, por lo que la señal con esta sonda es alta aún en condiciones basales.

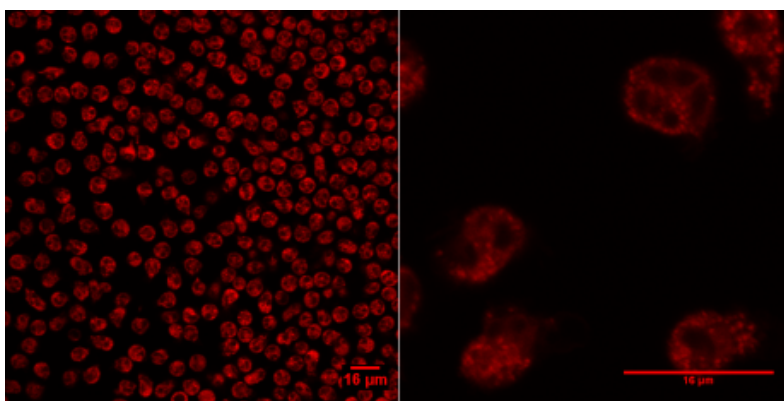


Figura 4.28: Imágenes representativas de neutrófilos estimulados con LPS+ATP y teñidos con la sonda acidotrópica Lysotracker Red[®] DND-99. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Olympus Fluoview1000 con un objetivo de inmersión Plapon 60X/NA 1.42 y son representativas de 3 experimentos independientes.

Realizamos experimentos en los cuales estimulamos a los neutrófilos con LPS+ATP, marcamos con LT y luego los tratamos o no con DPI. Posteriormente adquirimos imágenes por microscopía confocal. Se muestran en la figura 4.29A imágenes representativas de dichos experimentos. La gran cantidad de señal en ambos casos, no permite discriminar a simple vista, si el DPI moduló el número de vesículas ácidas.

Para poder cuantificar la fluorescencia emitida por el LT, establecimos un umbral por encima del cual, la señal detectada fuera considerada como señal positiva proveniente de las vesículas. Para determinar este umbral, utilizamos diferentes algoritmos independiente del operador contenido en el software de análisis de imágenes Fiji [166]. Luego de aplicar dicho umbral, se obtuvieron imágenes como las que se observan en la figura 4.29B. A partir de ellas se cuantificó la intensidad de fluorescencia media para cada tratamiento y se las graficó. Como se observa en la figura 4.29C, este análisis tampoco arrojó diferencias significativas entre tratamientos. Por último, relativizamos la contribución de señal fluorescente de LT por área celular, pero tampoco logramos ver diferencias significativas frente a los distintos tratamientos

(datos no mostrados).

Estos resultados indicaron que a través de esta metodología experimental no se observaron diferencias en el número de vesículas ácidas cuando las células fueron estimuladas con LPS+ATP y tratadas con DPI.

Sin embargo, consideramos que estos resultados podrían ser consecuencia de limitaciones de la metodología empleada. De hecho, el propio proveedor del producto señala en las especificaciones técnicas que en muchos casos en que se usa para cuantificar lisosomas, la contribución de la señal de los lisosomas es relativamente baja comparada con la fluorescencia total de la célula. Siendo nuestro modelo experimental una célula que exhibe tantas vesículas ácidas, es posible que la cantidad de vesículas que contengan a la NADPH oxidasa sea comparativamente muy reducida y la señal emitida como consecuencia de acidificación de las mismas podría ser insuficiente para observarse diferencias entre tratamientos. Independientemente de la causa, los resultados obtenidos a través de estos análisis no nos permitieron verificar que la inhibición de la NADPH oxidasa con DPI aumentase la cantidad de vesículas ácidas en el neutrófilo, al analizar la población entera de los experimentos realizados. Aun en aquellos casos aislados, donde vemos un incremento, no podemos afirmar que ese fenómeno, este asociado a vesículas involucradas en la secreción de IL-1 β .

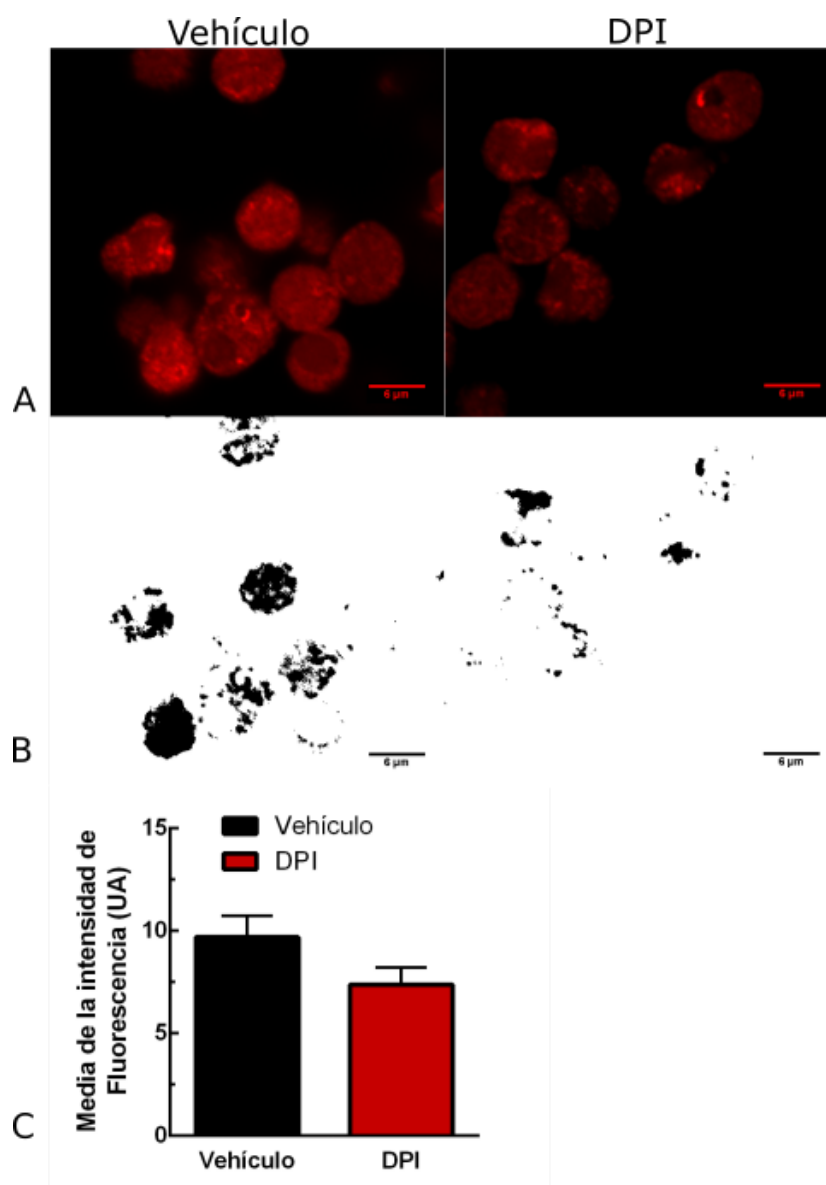


Figura 4.29: Efecto de la inhibición de la NADPH oxidasa con DPI sobre la cantidad de vesículas ácidas. (A) Imágenes representativas de neutrófilos estimulados con LPS+ATP, teñidos con la sonda acidotrópica Lysotracker Red® e incubados en presencia o ausencia de DPI. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Olympus Fluoview1000 con un objetivo de inmersión Plapon 60X/NA 1.42 y son representativas de 3 experimentos independientes. (B) Imagen producto de la conversión de imágenes postprocesado luego de sustraer un valor de fluorescencia umbral calculado utilizando el método de máxima entropía provisto en el software Fiji. (C) Comparación de la intensidad de fluorescencia media del LT por célula en neutrófilos estimulados con LPS+ATP tratados o no con DPI, expresado en unidades arbitrarias. Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes.

4.11. Análisis de colocalización en vesículas ácidas IL-1 β /LC3B+ positivas

Dado que según nuestra hipótesis de trabajo deberían existir vesículas autofágicas conteniendo IL-1 β que como consecuencia del tratamiento con DPI se acidificaran, intentamos identificar vesículas doble positivas para LC3B e IL-1 β , que incorporen LT bajo el tratamiento de DPI.

La superposición de imágenes es una técnica útil para la identificación espacial de eventos de colocalización, para caracterizar nuevos compartimientos o regiones celulares donde las moléculas de estudio colocalizan. Como se muestra en la figura 4.30, existe abundante cantidad de marca en los tres canales, y es posible ver superposición de señal entre los mismos. Sin embargo hay una baja cantidad de estructuras de apariencia vesicular clara positiva en todos los canales. Por el contrario hablamos de regiones de colocalización, lo que dificulta ver si existe un aumento en dichas estructuras por medio del recuento individual.

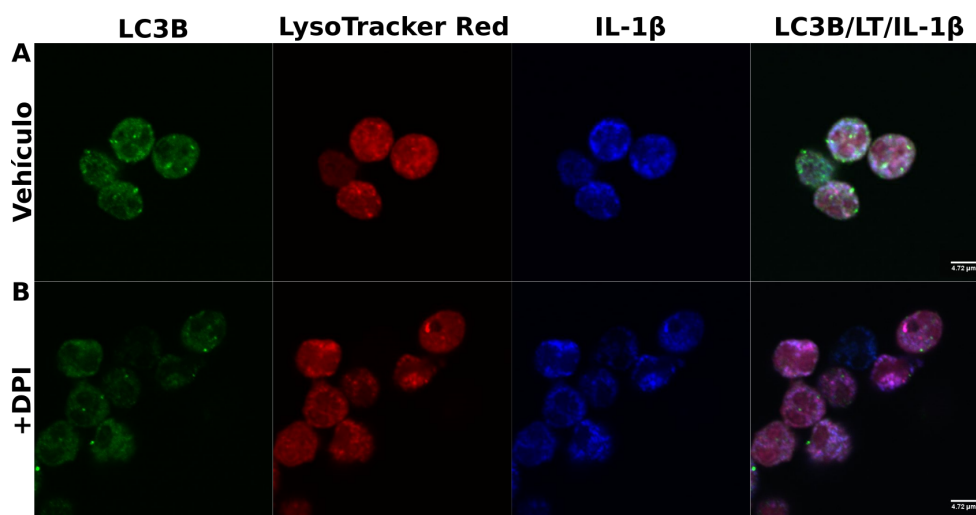


Figura 4.30: Imágenes de neutrófilos estimulados con LPS+ATP y cultivados en presencia de la sonda acidotrópica LysoTracker Red®. A las 4 horas postestimulación con LPS las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas empleando anticuerpos de conejo anti-LC3B y de ratón anti-IL-1 β y los anticuerpos secundarios obtenidos en cabra anti-IgG de conejo conjugado DyLight 488 (verde) y anti-IgG de ratón conjugado a DyLight 647 (azul), respectivamente. (A) neutrófilos no tratados con DPI. (B) neutrófilos tratados con DPI. Las imágenes fueron adquiridas mediante un microscopio confocal Olympus Fluoview1000 con un objetivo de inmersión Plapon 60X/NA 1.42 y son representativas de 3 experimentos independientes.

Analizamos luego la distribución de la fluorescencia de cada canal, graficando los datos de cada imagen mediante un diagrama de dispersión, donde la intensidad de

la fluorescencia de un canal fue graficada en función de la del otro para cada pixel. Ver figura 4.31. Este tipo de representaciones son útiles para detectar la presencia de diferentes poblaciones de compartimientos, y ver la relación que existe entre ambas señales para poder elegir un estadístico cuantitativo de colocación adecuado.

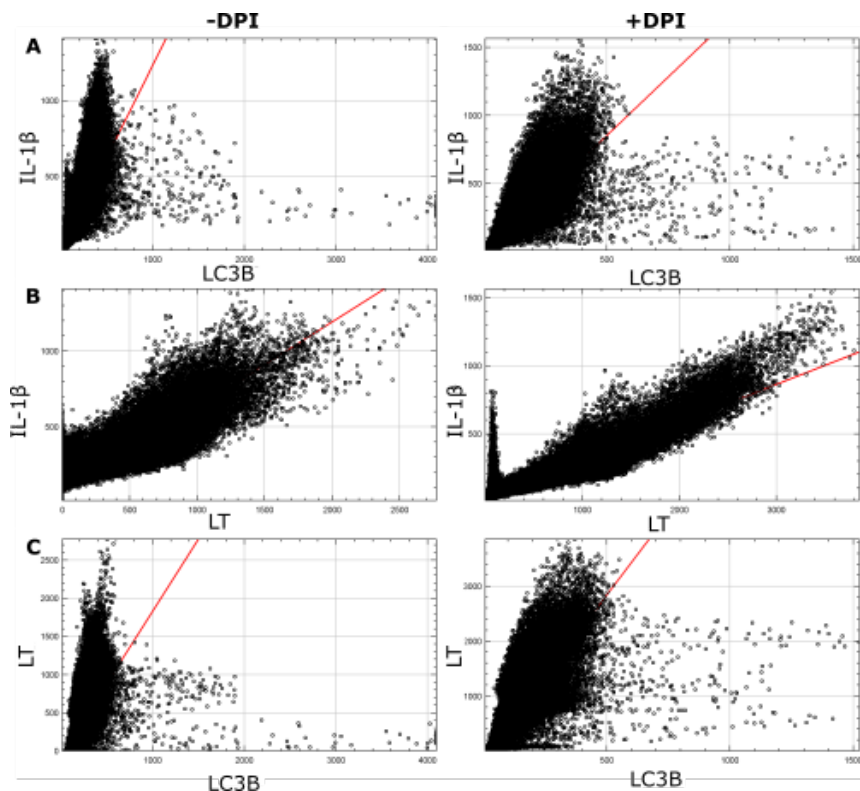


Figura 4.31: Diagrama de dispersión en dos dimensiones de la distribución espacial de intensidades de fluorescencia de los canales correspondientes a LC3B y LT e IL-1 β , obtenidos por microscopia confocal de neutrófilos estimulados con LPS+ATP tratados o no con DPI. (A) Dispersión de intensidad de fluorescencia para IL-1 β y LC3B. (B) Dispersión de intensidad de fluorescencia para IL-1 β y LT. (C) Dispersión de intensidad de fluorescencia para LT y LC3B.

Al analizar la distribución de la fluorescencia del LT en función de IL-1 β , como se muestra en la figura 4.31B, se observó que los eventos se distribuyeron mayoritariamente en una línea recta cuya pendiente representa la relación de fluorescencia de las dos señales, la cual ajusta a una regresión simple. En este caso, se desprende la utilidad de usar el coeficiente de correlación de Pearson (CP), como un estadístico de colocación cuantitativo [186]. El CP mide la covariación pixel a pixel de los niveles de señal de dos imágenes, de forma independiente del nivel de señal total y de la señal ruido de fondo en las imágenes. De esta forma el CP resulta un parámetro relativamente independiente de la interpretación o subjetividad del investigador.

Resulta interesante destacar, que la correlación de señal entre lysotracker y IL-1 β es marcada, incluso en la condición estimulada LPS+ATP sin el inhibidor DPI. El

tratamiento con DPI, también ajusta a una regresión simple y muestra la existencia de una población (o compartimiento diferente) de IL-1 β , que no esta asociada a las regiones de señal de LT.

Se realizaron tres experimentos independientes con neutrófilos estimulados con LPS+ATP, tratados con o sin DPI, donde se midieron al menos treinta células en seis campos ópticos diferentes. Para el análisis de CP se tomaron regiones de interés (RI) bordeando el contenido de cada célula en la imagen, y se graficaron los valores promedios en la figura 4.32. Los valores de CP teóricos van desde 1 para una situación de colocalización absoluta, a -1 para la correlación inversa de las sondas. Valores cercanos a ceros, nos muestran una falta de correlación espacial de la señal. Como se ve en la figura 4.32, el CP para IL-1 β /LT es $0,89 \pm 0,1$, por lo que veríamos colocalización en este caso.

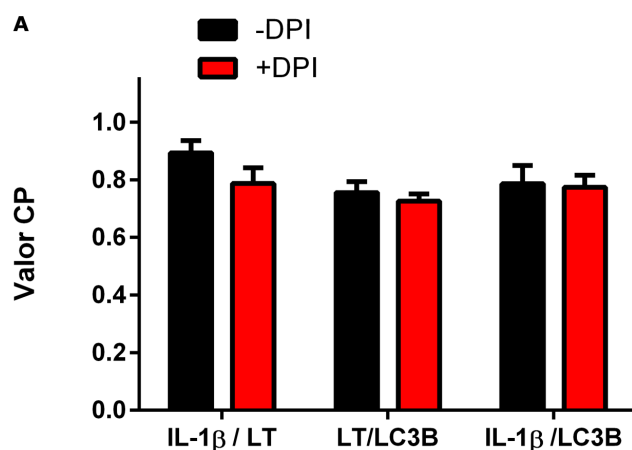


Figura 4.32: Gráfico de los parámetros de Pearsons, para Neutrófilos estimulados con LPS+ATP, tratados con o sin DPI. Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes.

Sin embargo los diagramas de dispersión en dos dimensiones para las señales de IL-1 β /LC3B (figura 4.31A), y el par LT/LC3B (figura 4.31C) no ajustan a una regresión simple. Este resultado nos habla de la complejidad de la relación entre estas tres señales, que no puede ser caracterizado únicamente por una sola identidad vesicular que contengas las tres señales de manera homogénea, o bien de las limitaciones de la técnica para individualizar solamente las estructuras de interés.

El CP que cuantifica el grado en que la variabilidad de la intensidad de señal de cada fluorescencia, se puede ajustar a una regresión lineal simple, proporciona una medida de colocalización deficiente en situaciones complejas, donde las sondas ocurren simultáneamente en diferentes proporciones, o en diferentes compartimentos de la célula. Incluso si dos proteínas ocurren simultáneamente en las mismas estructuras celulares, puede que no haya ninguna razón por la cual deban coexistir en proporciones fijas e iguales entre sí.

Si bien estos resultados evidencian un diferente comportamiento en la distribu-

ción espacial, nos interesaba poder cuantificar los espacios de superposición (solapamiento) entre señales. Anteriormente con el coeficiente de correlación de Pearson veíamos la asociación entre intensidad de una Imagen A con una Imagen B. En cambio ahora, buscamos cuantificar coincidencia espacial de elementos entre Imagen A y B. Para ello, trabajamos con el coeficiente de solapamiento de Manders [187]. Este nuevo coeficiente variará de 0 a 1, el primero corresponde a imágenes que no se superponen y el último refleja el solapamiento del 100 % entre ambas imágenes. Dados dos canales verde y rojo, M1 se define como la relación entre “intensidades sumadas de píxeles de la imagen verde para la cual la intensidad en el canal rojo es superior a cero” sobre la “intensidad total en el canal verde”. M2 se define a la inversa para el rojo. Por lo tanto M1 (o M2) es un buen indicador de la proporción de la señal verde coincidente con una señal en el canal rojo sobre su intensidad total, que incluso puede aplicarse si las intensidades en ambos canales son realmente diferentes entre sí. Es importante mencionar, que en este modelo, donde la intensidad relativa es sustraída, es necesario hacer correcciones de ruido de fondo, ya que la misma puede dar variaciones en los resultados. Por lo tanto, determinamos el umbral teniendo en cuenta las áreas de mayor intensidad, y excluyendo valores en la zona nuclear de la célula. Ver figura 4.33. Los resultados obtenidos a partir del uso de un algoritmo automatizado diseñado por nosotros para analizar múltiples imágenes (previamente definidas las áreas celulares), aplicando una substracción de ruido de fondo, nos aportaron una medida cuantitativa de la superposición de las señales.

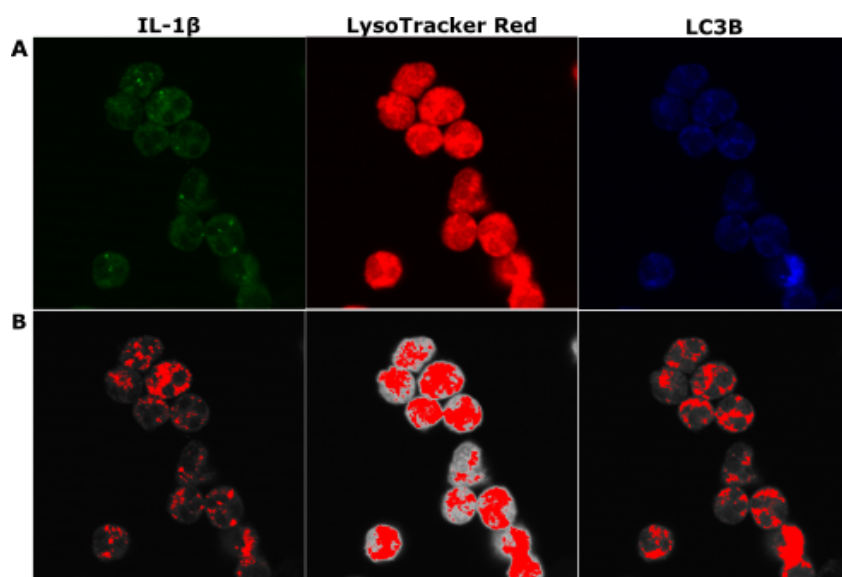


Figura 4.33: Imágenes de neutrófilos estimulados con LPS+ATP y cultivados en presencia de la sonda acidotrópica LysoTracker Red[®]. A las 4 horas postestimulación con LPS las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas empleando anticuerpos de conejo anti-LC3B y de ratón anti-IL-1 β y los anticuerpos secundarios obtenidos en cabra anti-IgG de raton conjugado DyLight 488 (verde) y anti-IgG de conejo conjugado a DyLight 647 (azul), respectivamente. (A) neutrófilos no tratados con DPI. (B) Análisis de umbral manual. Las imágenes fueron adquiridas mediante un microscopio confocal Olympus Fluoview1000 con un objetivo de inmersión Plapon 60X/NA 1.42 y son representativas de 3 experimentos independientes.

La primera columna de la figura 4.34A, muestra el valor de M1 para LT/IL-1 β , esto debe ser leído como la cantidad de señal de LT que superpone con la señal de IL-1 β , es decir que porcentaje del total de LT se encuentra compartiendo espacio con la señal total de IL-1 β . En este caso vemos que aproximadamente el 50 % del LT colocaliza con IL-1 β , tanto en presencia como en ausencia de DPI. A su vez, el valor complementario M2, que nos indica que porcentaje de IL-1 β tiene marca de LT, nos muestra que cerca del 90 % de la señal de IL-1 β , esta en regiones con marca de LT. Esta diferencia disminuye ligeramente en los tratados con DPI, pero no de forma significativa.

Nuevamente fuimos capaces de identificar la colocazliacion de IL-1 β con vesículas de LC3B, en este caso notamos que dicha asociación disminuyó con el tratamiento con DPI (figura 4.34B M2).

En cuanto a la distribución de LC3B con LT, detectamos una superposición cercana al 60 %, (figura 4.34A M1) significativamente menor que la proporción de IL-1 β asociada a LT. Dicha relación aumentó con el tratamiento con DPI. Es importante entender que si se degrada una proporción de moléculas que no se superponía, el porcentaje de superposición aumenta al bajar la cantidad de señal total, aunque

efectivamente no existan nuevos eventos de colocalización.

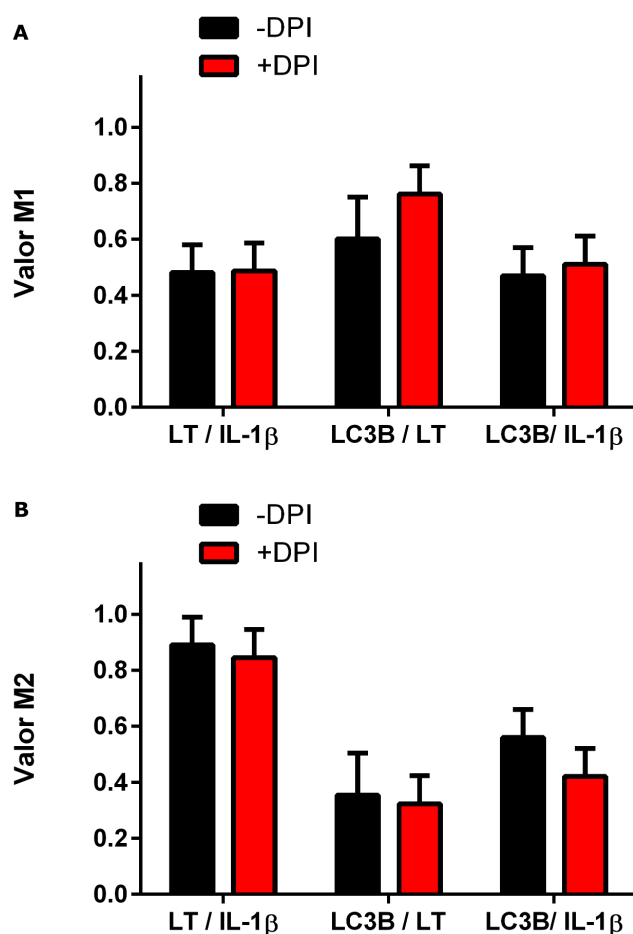


Figura 4.34: Gráfico de los parámetros Manders M1 (A) y M2 (B), para neutrófilos estimulados con LPS+ATP, tratados con o sin DPI. Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes.

Teniendo en cuenta que el tratamiento con DPI no modificó la proporción de IL-1 β vesicular que colocaliza con LT, estos resultados no nos permitieron corroborar la hipótesis planteada.

4.12. Análisis *in silico* de posibles sitios de corte en la secuencia de aminoácidos de IL-1 β

Quisimos determinar si la IL-1 β puede ser blanco de acción de distinto tipo de proteasas. Para ello, realizamos un estudio *in silico*, utilizando los servidores públicos de PROSPER (Protease specificity prediction server) [188], para predecir sitios de corte de proteasas en la secuencia aminoacídica de la proIL-1 β . Encontramos 59 posibles sitios de cortes, de los cuales 2 son utilizados por aspartato proteasas,

12 son por cisteína proteasas, 26 por metaloproteasas y 30 por serina proteasas, ver figura 4.35

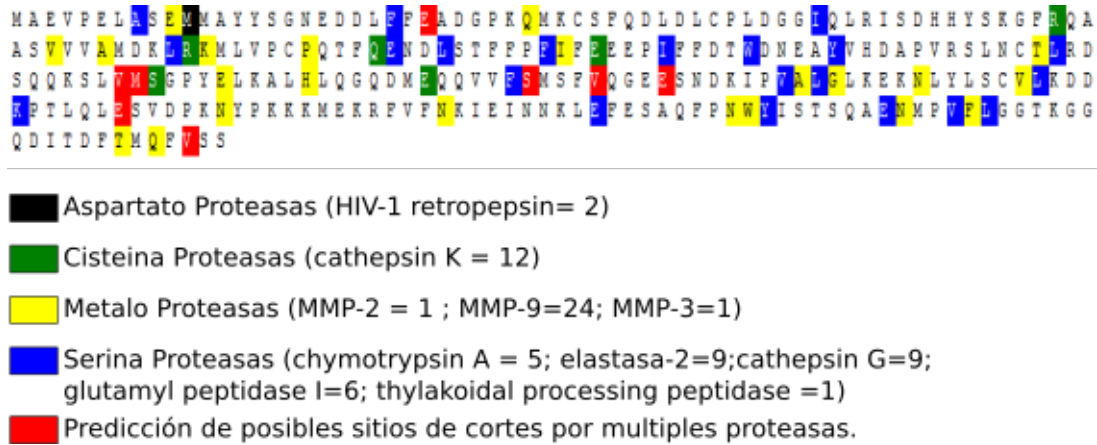


Figura 4.35: Predicción *in silico* de sitios de corte para proteasas en la proIL-1 β .

Dentro de las cisteínas proteasas la catepsina K no se expresa en neutrófilos, aunque éstos poseen otras como la dipeptidil peptidasa I y las Catepsinas C, Z, H, B, S y también la aspartil proteasa lisosomal catepsina D [189]. Dentro de la metaloproteasas la MMP-9 se expresa en neutrófilo, y predice 24 de los 26 posibles sitios para metaloproteasas. Finalmente, dentro del grupo más abundante, las serina proteasas tenemos a la elastasa-2 (9 sitios), catepsina G (9 sitios), que se expresan en neutrófilos [190].

Estos resultados indicaron que la IL-1 β es susceptible de ser clivada por diferentes tipos de proteasas, cuya funcionalidad puede estar determinada por el pH del microambiente en el que se alojan

4.13. Efecto de la inhibición de proteasas ácidas sobre la secreción y el contenido de IL-1 β intracelular del neutrófilo

Los experimentos descritos previamente indicaron que cuando se inhibe la NADPH oxidasa, se reduce marcadamente la secreción de IL-1 β , pero no se detecta acumulación de IL-1 β intracelular, sugiriendo que como consecuencia de la inhibición de la oxidasa la IL-1 β es degradada. Por ello, razonamos que si a las células estimuladas con LPS+ATP y tratadas con un inhibidor de la NADPH oxidasa las expusiéramos a inhibidores de proteasas ácidas, si nuestra hipótesis fuese correcta, deberíamos ver acumulación de IL-1 β intracelular o extracelular. Para evaluar esta posibilidad, sometimos a las células a tratamiento con E64d, un inhibidor de cisteínproteasas. Como se observa en las figuras 4.36, el tratamiento con E64d inhibió la secreción de IL-1 β inducida por LPS+ATP, tanto en células tratadas como no con apocinina (A).

Sin embargo, el E64d no modificó significativamente los niveles de IL-1 β intracelular tanto cuando fue aplicado a células estimuladas con LPS+ATP en ausencia como en presencia de apocinina (B).

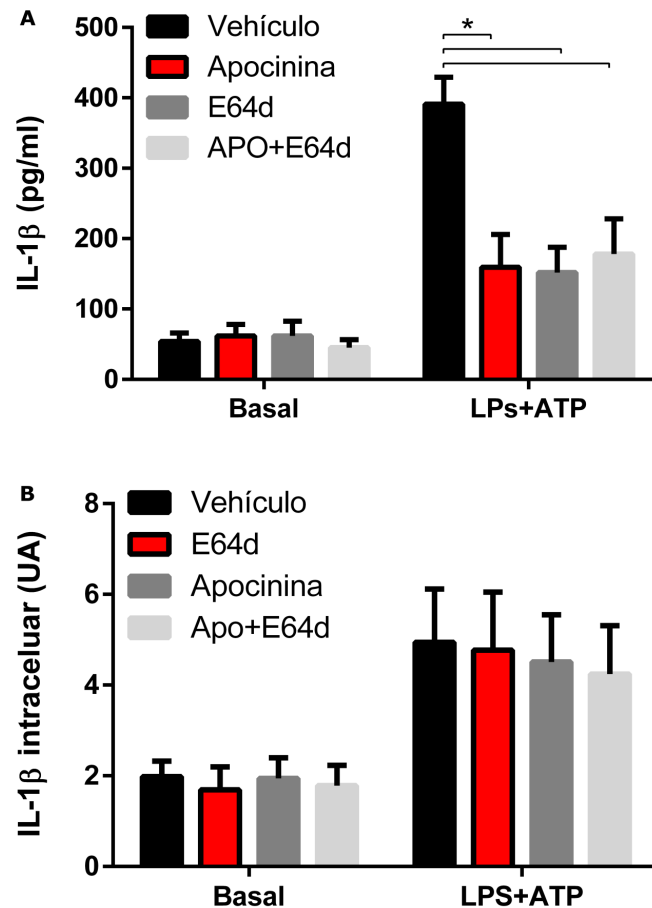


Figura 4.36: Efecto del tratamiento con E64d sobre la secreción de IL-1 β y sus niveles de expresión intracelular. Los neutrófilos fueron estimulados o no con LPS+ATP, luego fueron tratados con E64d (10 μ M), apocinina (10 μ M) o la combinación de ambos, y a las 5 hs p.e. se recuperaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de IL-1 β por ELISA (A). Los pellets celulares se fijaron, inmunomarcaron y la niveles de IL-1 β fue determinada por citometría de flujo (B). Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 6 (A) y 3 (B) experimentos realizados por triplicado,* $p < 0,05$.

Para verificar que los efectos inhibitorios de E64d y apocinina sobre la secreción de IL-1 β no fuesen producto de un efecto citotóxico, analizamos en paralelo la viabilidad celular (Figura 4.37). Como puede observarse, los resultados descartaron una pérdida de la viabilidad como consecuencia de dichos tratamientos.

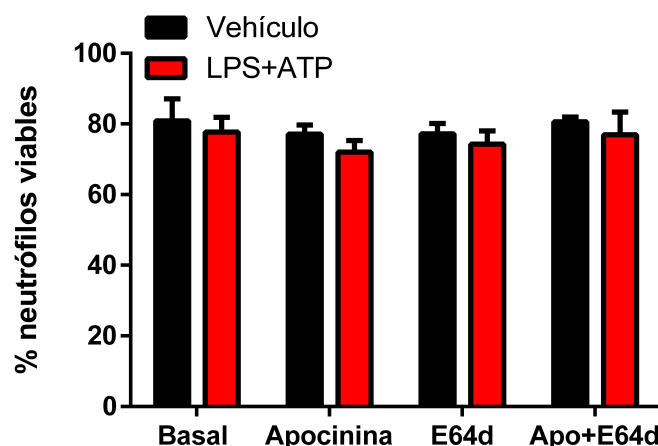


Figura 4.37: Evaluación de la viabilidad de los neutrófilos tratados como se indicó en la figura 3.3. La determinación fue realizada mediante la técnica de Anexina V/ Ioduro de Propidio por citometría de flujo. Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 3 experimentos realizados por duplicado.

La incapacidad del E64d para inducir la acumulación de IL-1 β intracelular podría deberse a que otras proteasas ácidas, no inhibibles por E64d, podrían estar activas y degradar igualmente a la IL-1 β cuando las células son tratadas con apocinina. Es por ello, que se recomienda utilizar al E64d en combinación con Pepstatina A, para inhibir la degradación del contenido de los autolisosomas [164]. Sin embargo, no nos fue posible evaluar el efecto combinado de ambas drogas, ya que la viabilidad del neutrófilo bajo estas condiciones se vio severamente afectada (datos no mostrados).

En conclusión, este conjunto de experimentos no nos permitió determinar que al inhibir las cisteínproteasas del neutrófilo se acumulara IL-1 β , o se revirtiese la inhibición de la secreción cuando las células fueron tratadas con apocinina.

4.14. Efecto de la inhibición de proteasas neutras sobre la secreción y el contenido intracelular de IL-1 β

En un estudio previo de nuestro grupo determinamos que el pretratamiento de neutrófilos con un inhibidor de elastasa y proteinasa 3 (Elafin), inhibe la secreción de IL-1 β a las 18 hs de cultivo. A partir de esos resultados, y sobre la base de antecedentes de la literatura concluimos que esas proteasas neutras, al igual que la caspasa 1, tienen capacidad de procesar a la proIL-1 β , y contribuyen a su secreción. Sin embargo, en esa oportunidad, no estudiamos el impacto de la inhibición de las proteasas neutras sobre el contenido de IL-1 β intracelular, ni se evaluaron los efectos aplicándola a tiempos posteriores a la síntesis y procesamiento de la misma.

Considerando que nuestros hallazgos no nos permitieron confirmar que la actividad de la NADPH oxidasa era requerida para evitar la degradación de la IL-1 β en un compartimiento ácido, nos planteamos experimentos adicionales para determinar si esta enzima podría modular la acción de proteasas neutras. Para ello, analizamos el impacto de la inhibición de las proteasas neutras una vez que la IL-1 β (o proIL-1 β) fuese incorporada a los autofagosomas, utilizando AEBSF (Pefabloc), un potente inhibidor de serinproteasas en neutrófilos estimulados o no con DPI. Ver figura 4.38.

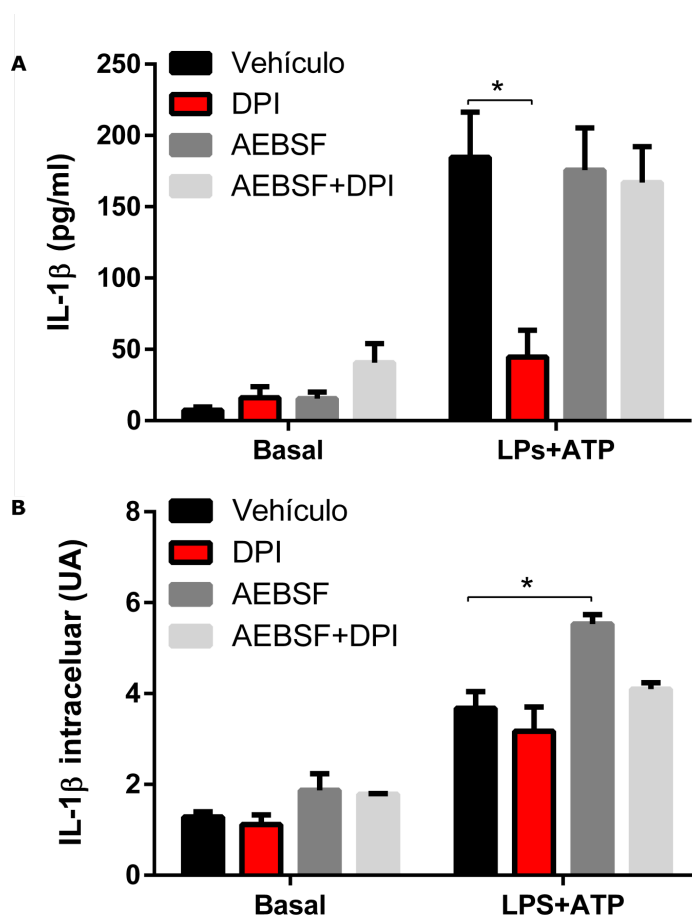


Figura 4.38: Efecto del tratamiento con AEBSF sobre la secreción de IL-1 β y sus niveles de expresión intracelular. Los neutrófilos fueron estimulados o no con LPS+ATP. A las 4 hs p.e. fueron tratados con AEBSF y a las 5 hs p.e. se recuperaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de IL-1 β por ELISA (A). Los pellets celulares fueron fijados, inmunomarcados y la expresión de IL-1 β intracelular fue determinada por citometría de flujo (B). Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 4 (A) y 3 (B) experimentos, * $p < 0,05$.

El tratamiento con AEBSF a las 3 h.s p.e no moduló la secreción de IL-1 β (Figura 4.38A), pero produjo un aumento significativo del contenido de IL-1 β intracelular

(Figura 4.38B). Por otro lado, el tratamiento con AEBSF revirtió el fuerte efecto inhibitorio del DPI sobre la secreción de la IL-1 β . Si bien se ve una tendencia al aumento de los niveles intracelulares de IL-1 β tratados con AEBSF+DPI, este incremento es menor que el visto con el tratamiento de AEBSF solamente.

Estos resultados sugieren que una parte de la IL-1 β sintetizada podría ser normalmente degradada por acción de las proteasas neutras y la posibilidad de que la NADPH oxidasa activa ejerza un rol regulatorio negativo sobre la actividad de las serinproteasas, modulando el pH de las estructuras autofágicas que contienen la IL-1 β , en forma similar a lo propuesto anteriormente para la proteasas ácidas.

Capítulo 5

Discusión

La IL-1 β es una citoquina proinflamatoria cuyo mecanismo de secreción no es completamente comprendido. Algunos estudios publicados en el transcurso del desarrollo de este trabajo de tesis, aportaron evidencias indicando que un mecanismo de autofagia no convencional podría estar involucrado en la secreción de IL-1 β en macrófagos y en células dendríticas. Sin embargo, no existen estudios que hayan abordado la investigación del mecanismo implicado en la secreción de IL-1 β en neutrófilos humanos. En el presente estudio se determinó que la autofagia participa en la secreción de IL-1 β en neutrófilos humanos inducida por LPS y LPS+ATP. Esta conclusión encuentra sustento en resultados de experimentos como la interrupción de la inducción de autofagia mediante el uso de inhibidores como la 3-MA y/o la WN, el bloqueo del flujo autofágico con Baf A1 o el E-64d, que disminuyeron significativamente los niveles de IL-1 β extracelulares. A su vez la estimulación de dicha vía metabólica mediante un tratamiento de privación de nutrientes, aumentó significativamente los niveles de IL-1 β detectados en los sobrenadantes de cultivo. En acuerdo con nuestra hipótesis de participación de la autofagia en la secreción de IL-1 β , pudimos determinar la existencia de vesículas doble positivas para el marcador de LC3B e IL-1 β mediante el uso de microscopia confocal, sugiriendo que la IL-1 β es translocada desde el citoplasma al interior de autofagosomas. Además, a través de ensayos cinéticos, comprobamos que la secreción de la IL-1 β aumentó conforme disminuyeron las vesículas LC3B positivas intracelulares, resultados que acompañan un modelo en el cual tras la incorporación de IL-1 β en autofagosomas la misma es guiada al medio extracelular.

El trabajo con neutrófilos presenta desafíos particulares. Al tratarse de una célula terminalmente diferenciada de corta vida media, numerosas técnicas moleculares desarrolladas para el estudio de la autofagia no pueden ser aplicadas directamente en este tipo celular. Para alcanzar nuestro primer objetivo fue necesario emplear inhibidores que actúan en distintos pasos de la vía autofágica, que como consecuencia dieron un marcado efecto inhibitorio en la secreción de IL-1 β . En paralelo verificamos la viabilidad de las células sometidas a los distintos tratamientos. Ningún inhibidor afectó significativamente la viabilidad, con la excepción de la 3-MA que redujo aproximadamente un 25 % la viabilidad de los neutrófilos no estimulados y

un 15 % de aquellos estimulados con LPS+ATP. Aun cuando se podría especular que la marcada inhibición de la secreción de IL-1 β ocasionada por este inhibidor fuese debida a una pérdida de la viabilidad celular, es poco probable que un 15 % de muerte celular sea responsable de una inhibición de la secreción de IL-1 β del 90 %. Es por ello que consideramos que el análisis de la viabilidad de los neutrófilos en presencia de inhibidores de la autofagia, descarta que la reducción de la secreción inducida por ellos sea consecuencia de la muerte celular, y en conjunto, permite sustentar un rol para la autofagia en la vía de secreción de la IL-1 β .

Nuestros hallazgos indicando que los inhibidores de autofagia no afectaron la secreción de IL-8, confirmaron que los mismos no modulan la vía canónica de secreción de proteínas que involucra al RE-Golgi, y sustentaron que la secreción de IL-1 β involucra una vía independiente de la misma. El hecho que la 3-MA fuese capaz de inducir por sí misma la liberación de IL-8 nos resultó sorprendente, dado que la liberación de IL-8 en neutrófilos es independiente de la vía mTOR, que es el blanco de acción del tratamiento con la 3-MA [191]. No obstante señales de estrés o daño celular pueden inducir la secreción de IL-8 [192-195], por lo que la aparición en las células sin estimular, podría deberse al aumento de la apoptosis registrada por el tratamiento con 3-MA.

Como ya mencionamos, existen multiples dificultades en la transfección de neutrófilos, de modo que para sortear esta imposibilidad y confirmar los hallazgos realizados con inhibidores de la autofagia en neutrófilos humanos, trabajamos con el modelo de células PLB985. Las mismas pueden ser diferenciadas a neutrófilos por tratamiento con DMF [160], y como determinamos previamente, también son capaces de secretar IL-1 β aunque en menores niveles [88]. La transfección de estas células con un ARN de interferencia para ATG5, redujo tanto la expresión de dicha proteína como la capacidad de estas células de secretar IL-1 β en respuesta a LPS+ATP, sustentando los resultados obtenidos con el uso de inhibidores de la autofagia.

Nuestros hallazgos indicando que la IL-1 β colocaliza con LC3B en un compartimiento vesicular del neutrófilo, son compatibles con la posibilidad de que una vez sintetizada, la IL-1 β sea incorporada por un mecanismo autofágico a un compartimiento vesicular. En este sentido, cabe señalar que validamos la conclusión de la colocalización de marcadores en las imágenes a través del cálculo de dos coeficientes, el coeficiente de correlación de Pearson (CP) y el de superposición de Mander (CM). El CP como estimador de la correlatividad es limitado en ciertos casos. Brinda información precisa cuando la relación estequiométrica de dos fluoróforos de estudio es similar, pero cuando esto no ocurre, se observa una mayor dispersión de los datos, lo que se refleja en un CP bajo, aun cuando puedan existir eventos de colocalización total, parcial o transitoria [184]. Los CM, en cambio, son independientes de la proporcionalidad de la señal de cada fluoróforo [187] y por ello, resultan más apropiados para el análisis de situaciones donde, los tratamientos alteran los niveles de fluorescencia de alguno de los parámetros. Los valores hallados para ambos coeficientes corroboraron que la IL-1 β colocaliza con LC3B en células estimuladas con LPS+ATP.

Nuestras conclusiones concuerdan con numerosos estudios previos realizados en

diferentes tipos celulares mieloides, que indicaron que la IL-1 β es secretada por mecanismos no convencionales. No obstante, la caracterización de estos mecanismos difieren entre distintos estudios. Se plantearon diferentes mecanismos como la liberación de IL-1 β involucra la exocitosis de lisosomas secretorios; o la liberación de microvesículas de membrana plasmática conteniendo IL-1 β , proIL-1 β y caspasa-1; la exocitosis de exosomas, la exportación utilizando transportadores de membrana de tipo ABC, poros de Gasdermina D o alternativamente la autofagia [122, 134, 135, 137, 138, 140, 142, 196-198]. En particular, los resultados de este trabajo de Tesis, concuerdan parcialmente con los publicados por Dupont y colaboradores para macrófagos derivados de médula ósea de ratón. De hecho, en su estudio, estos investigadores demostraron que la inducción de autofagia por privación de nutrientes o la inducción farmacológica por inhibición de mTOR, aumenta la secreción de IL-1 β mientras que la inhibición del flujo autofágico con Baf A1, la inhibe. Ellos también evidenciaron vesículas LC3B e IL-1 β doble positivas por microscopia confocal. A diferencia de nuestro estudio, donde no observamos que la autofagia modulara la secreción de IL-1 β en neutrófilos no estimuladas, Dupont y colaboradores observaron que la autofagia basal afectó negativamente la secreción de IL-1 β .

Nuestros hallazgos también están en acuerdo con trabajos que mostraron que la inhibición de la autofagia inhibe la secreción de IL-1 β en macrófagos humanos activados vía Dectina-1 [157]. Sin embargo, nuestros estudios contrastan con otros que adjudicaron a la autofagia un rol inhibitorio de la secreción de IL-1 β . De hecho, trabajos previos indicaron que la inhibición de la autofagia basal induce sobreproducción de IL-1 β [199]. También Harris y colaboradores determinaron que la inhibición de la autofagia con 3-MA y WN promovió la secreción de IL-1 β en macrófagos derivados de médula ósea de ratón y células dendríticas estimuladas con LPS, y la estimulación de la autofagia con Rapamicina inhibió la secreción inducida por LPS, o LPS en conjunto con estímulos que activan el inflammasoma [200]. Estos autores sugirieron que la secreción de la IL-1 β es regulada negativamente por la autofagia, la cual dirige a la proIL-1 β a ser degradada, y propusieron entonces que este efecto inhibitorio podría deberse a la degradación del inflammasoma mediada por autofagia. Las causas de las diferencias entre los resultados de nuestro estudio y aquellos en los que la autofagia limita la secreción de IL-1 β no son bien comprendidas, pero podrían deberse a diferencias en el procesamiento y secreción de la IL-1 β entre neutrófilos humanos y macrófagos de ratón [88]. A diferencia de lo que nosotros observamos, los autores determinaron que la secreción de IL-1 β inducida por LPS+ATP no requiere la actividad de la NADPH oxidasa.

Para comprender los mecanismos que podrían controlar la secreción de IL-1 β en los neutrófilos, es necesario tener en cuenta que éstas son células fagocíticas profesionales, provistas de gránulos que contienen poderosas enzimas especializadas en la degradación de componentes fagocitados y de aquellos atrapados en las NET que ellos son capaces de liberar. El contenido de los gránulos no sólo puede ser incorporado al interior del fagosoma, sino que también puede ser liberado al medio extracelular [45]. Esto pone en evidencia que los gránulos poseen la maquinaria para que su contenido sea exocitado. Como hemos mencionado en esta tesis, es conoci-

do que los autofagosomas pueden fusionarse con endosomas generando amfisomas. Por ello, nosotros especulamos que los autofagosomas conteniendo IL-1 β podrían también fusionarse con gránulos de los neutrófilos, generando vesículas híbridas que contengan además de IL-1 β a los componentes granulares. Esta posibilidad fue sustentada por observaciones indicando que en neutrófilos estimulados con LPS+ATP, la IL-1 β colocalizó parcialmente con gp91, un componente de la NADPH oxidasa que en células en reposo es encontrada mayoritariamente en gránulos secundarios y terciarios. Hallazgos adicionales de nuestro laboratorio, indicaron que, en respuesta a esos estímulos, la IL-1 β colocaliza parcialmente con los componentes de los gránulos primarios, elastasa y mieloperoxidasa, aportando evidencia de la fusión entre los mismos y los autofagosomas conteniendo IL-1 β [201].

Otro de los objetivos de este estudio fue investigar el rol de la NADPH oxidasa en el mecanismo de secreción de IL-1 β . Para ello empleamos inhibidores de la enzima como el DPI y la apocinina en una escala temporal precisa, con la intención de no afectar los procesos de transcripción, traducción y procesamiento de la proIL-1 β . Los resultados obtenidos indicaron que la inhibición de la NADPH oxidasa con Apocinina o DPI, disminuye los niveles de IL-1 β detectados extracelularmente, pero no conduce a una acumulación intracelular de la citoquina. Estos resultados, que están en acuerdo con los previamente publicados por nuestro grupo indicando que la actividad de la NADPH oxidasa es requerida para la secreción de la IL-1 β [88], sugieren que la IL-1 β es degradada intracelularmente cuando esta enzima se encuentra inhibida. Estudios previos determinaron que el pH fagosomal es regulado indirectamente por la acción de la NADPH oxidasa [80]. Dichos estudios determinaron que cuando la enzima es activa, no se acumulan V-ATPasas en los fagosomas de los neutrófilos y el pH fagosomal se mantiene neutro gracias al bombeo de protones a través de canales Hv1. Esta acción es necesaria para que las principales proteasas microbicidas del neutrófilo, las serinproteasas neutras elastasa, catepsina G y proteinasa 3, degraden al contenido fagosomal. Aun cuando estos resultados provienen de estudios que analizaron los acontecimientos que ocurren en un fagosoma, es importante señalar que existen reportes indicando que la NADPH oxidasa también se ensambla en endosomas tras la estimulación con agonistas solubles (no fagocitables) [202], y que los componentes de membrana de la NADPH oxidasa se alojan en los mismos gránulos en que se encuentran los canales Hv1 [80]. Estos hallazgos nos llevaron a hipotetizar que la actividad de la NADPH podría ser necesaria para impedir que las vesículas conteniendo IL-1 β se acidificaran por incorporación de V-ATPasas y así se evitara que la IL-1 β fuese degradada por proteasas ácidas lisosomales tras la fusión de las vesículas a lisosomas. Para testear esta hipótesis, analizamos por microscopía confocal si los autofagosomas conteniendo IL-1 β poseían a la NADPH oxidasa. Nuestros resultados indicaron que la subunidad gp91 de la NADPH oxidasa colocaliza con IL-1 β en un compartimiento vesicular. En algunos casos también identificamos vesículas en las cuales IL-1 β se solapaba con LC3B y gp91, aunque estos eventos fueron poco frecuentes. Dado que gp91 es una de las subunidades de la NADPH oxidasa que se encuentra expresada constitutivamente en la membrana de gránulos secundarios y terciarios, no podemos confirmar que las vesículas en las

que se halló a la IL-1 β colocalizando con gp91 contuvieran una NADPH oxidasa activa. Esto sí podría haber sido confirmado por la detección de vesículas p47^{Phox+} positivas que colocalizaran con IL-1 β y/o LC3B. Esto se debe a que la subunidad p47^{Phox+} exhibe una distribución citosólica en células en reposo, que sólo se transloca a membranas cuando las células son estimuladas con agonistas que activan el estallido respiratorio [202]. Nosotros realizamos experimentos adicionales empleando anticuerpos anti p47^{Phox+} para corroborar la existencia de vesículas conteniendo IL-1 β que tuvieran una oxidasa activa. Lamentablemente, la señal que obtuvimos fue comparativamente más débil que la de gp91, por lo que no logramos una buena relación señal/ruido (datos no mostrados), hecho que podría estar relacionado con la afinidad del anticuerpo empleado. De modo que no fue posible afirmar que la NADPH oxidasa de las vesículas en las que la IL-1 β estaba presente fuese activa, aunque tampoco lo descartan.

Como mencionamos, nuestra hipótesis de trabajo sostenía que la actividad de la NADPH oxidasa es necesaria para impedir que se acidifiquen las vesículas conteniendo IL-1 β , y de este modo evitar que la misma sea degradada por proteasas ácidas lisosomales. Por lo tanto, deberíamos detectar acidificación de vesículas conteniendo IL-1 β cuando se inhibe a la NADPH oxidasa. Sin embargo, el tratamiento con DPI no modificó significativamente la colocalización de vesículas conteniendo IL-1 β con LT. La gran cantidad de marca de LysoTracker Red, hace que sea sumamente difícil discriminar la aparición de nuevas vesículas de aquellas preexistentes, o de las que podrían formarse por otros procesos relacionados con la homeostasis normal, secreción de gránulos, o eventos apoptóticos celulares. Esto es debido a la gran cantidad de vesículas ácidas normalmente presentes en el neutrófilo, junto a la dinámica de degradación/reciclaje del LC3B, y la posibilidad de que la IL-1 β , también se degrade en un entorno ácido, plantean un escenario físico temporal por sobre las limitaciones de las técnicas empleadas que impidieron confirmar nuestra hipótesis.

Por otra parte, nuestras observaciones por microscopía confocal también indicaron la existencia de vesículas conteniendo IL-1 β carentes de NADPH oxidasa, por lo que no es posible descartar que la NADPH oxidasa contribuya a la secreción de la IL-1 β por mecanismos adicionales. En este sentido, es posible que el requerimiento de la NADPH oxidasa obedezca a la capacidad de los IRO producidos por activación de la NADPH oxidasa de inducir la autofagia, tal como ha sido reportado previamente [73, 203].

Como ya mencionamos, el neutrófilo posee poderosas serinproteasas (SPN) neutras y como demostramos a través de un análisis *in silico*, éstas son potencialmente capaces de clivar a la IL-1 β en múltiples sitios, y podrían contribuir a su degradación intracelular. Nuestros estudios mostraron que el AEBSF (inhibidor de SPN), no solo logró revertir el efecto de la inactivación de la NADPH oxidasa, además incrementa el contenido de IL-1 β intracelular. Estos resultados sugieren que parte de la IL-1 β que es sintetizada en respuesta a LPS+ATP podría ser degradada por proteasas neutras si el pH del compartimiento fuese el apropiado para la actividad de estas enzimas.

Hay evidencia en la literatura científica que la V-ATPasa es responsable de man-

tener y establecer el pH ácido de vesículas endocíticas y secretorias, bombeando H^+ desde el citoplasma al lumen de las mismas de forma dependiente de ATP. En los últimos años, además se ha determinado que la v-ATPasa ejerce una gran variedad de funciones, que podrían requerir o ser independientes de su capacidad de bombear protones. Estas funciones no canónicas incluyen, entre otras, la fusión de membranas, la asociación a citoesqueleto y el tráfico de vesículas endocíticas [204]. Particularmente, se propuso que siguiendo al pegado mediado por SNAREs, ciertos dominios de V-ATPasas en dos membranas adyacentes formarían un poro que ayudaría a la fusión de vesículas. Además, la V-ATPasa también es capaz de unir actina y se ha propuesto que ejerce un rol en el *sorting* vesicular y en el transporte durante la exocitosis y reciclado [204].

La v-ATPasa está compuesta por dos dominios, V1 y V0 [204]. El dominio V0 esta embebido en la membrana, en cambio el V1 se asocia con la porción citosólica de V0. Ambos dominios pueden disociarse reversiblemente en respuesta a estímulos como método para controlar su actividad. A su vez, cada dominio está integrado por subunidades. Dentro de estas subunidades, el dominio V0 incluye una subunidad α , una de cuyas isoformas es conocida como $\alpha 2V$. Recientemente Gilman-Sachs y colaboradores determinaron que la subunidad $\alpha 2V$ se encuentra asociada principalmente a gránulos primarios en neutrófilos humanos y en menor medida a secundarios, terciarios y vesículas secretorias [205]. En dichos estudios indicaron que la subunidad $\alpha 2V$ no está presente en la membrana plasmática de neutrófilos en reposo, pero cuando a éstos se los estimula con diferentes agonistas, entre ellos el LPS, la distribución de la v-ATPasa pasa a estar en gran parte en membrana plasmática. Dicha translocación es acompañada de la exocitosis del contenido granular y está asociada con la producción de IRO. Además, los autores determinaron que, siguiendo a la estimulación de los neutrófilos, el pH intragranular se torna ácido, pero éste se vuelve alcalino si la V-ATPasa es inhibida con Baf A1. Teniendo en cuenta estas observaciones, en conjunto a los resultados de esta tesis indicando que Baf A1 inhibe la secreción de IL-1 β y conduce a su degradación intracelular, nosotros especulamos que la secreción de IL-1 β contenida en vesículas autofágicas podría requerir la actividad de la V-ATPasa. Es posible que la misma regule el pH del compartimiento del autofagosome en el que se aloja la IL-1 β tornándolo más ácido, hecho que podría evitar que la citoquina sea degradada por la acción de las SPN neutras. Dado que no todas las vesículas conteniendo IL-1 β podrían contener la misma cantidad de V-ATPasas, es posible que una parte de las vesículas alcancen un pH intravesicular tal que la degradación por SPN neutras fuese eficiente. Esa podría ser la razón por la que el AEBSF incrementa el contenido de IL-1 β intracelular, sugiriendo que una porción de la IL-1 β sintetizada podría ser constitutivamente degradada. De este modo, la cantidad efectiva de IL-1 β que sería secretada por los neutrófilos en respuesta a la estimulación con LPS+ATP, resultaría de un balance de la resistencia a la acción de SPN y proteasas ácidas, el cual dependería del pH del compartimiento vesicular en el que se encuentra contenida la citoquina. Sin embargo, nuestros resultados no nos permiten descartar que la V-ATPasa sea necesaria en el paso de fusión de las vesículas conteniendo IL-1 β a la membrana plasmática.

Los resultados de los experimentos realizados permiten explicar en parte los mecanismos involucrados en la secreción de IL-1 β en neutrófilos. Sin embargo, estos hallazgos plantearon nuevas interrogantes que requerirán estudios adicionales para ser contestados. Un modelo posible capaz de explicar los resultados obtenidos y descritos en este manuscrito es el ilustrado en la figura 5.1.

En nuestro modelo experimental, indujimos la síntesis *de novo* de proIL-1 β con LPS. La misma se sintetiza en el citoplasma, y es procesada por la caspasa-1 dentro del inflammasoma [88]. La estimulación de los neutrófilos también induce la activación de la autofagia por un mecanismo que podría requerir la actividad de la NADPH oxidasa. La IL-1 β es entonces incorporada a vesículas que poseen marcadores de autofagosoma (LC3B+), desde las cuales sería secretada al medio extracelular siguiendo una vía no convencional de autofagia. Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado, es posible que la IL-1 β contenida en vesículas autofágicas requiera también de la actividad de la v-ATPasa para mantener un pH intravesicular tal que impida su degradación por SPN. Es decir, de no darse el rescate por v-ATPasa, en aquellos autofagosomas donde están presentes las SPN, la IL-1 β sería degradada por la acción de estas proteasas neutras. Estas V-ATPasas podrían ser reclutadas directamente a autofagosomas, y/o incorporadas a los mismos por su fusión con gránulos primarios o con endosomas que previamente se hubiesen fusionado a dichos gránulos [204].

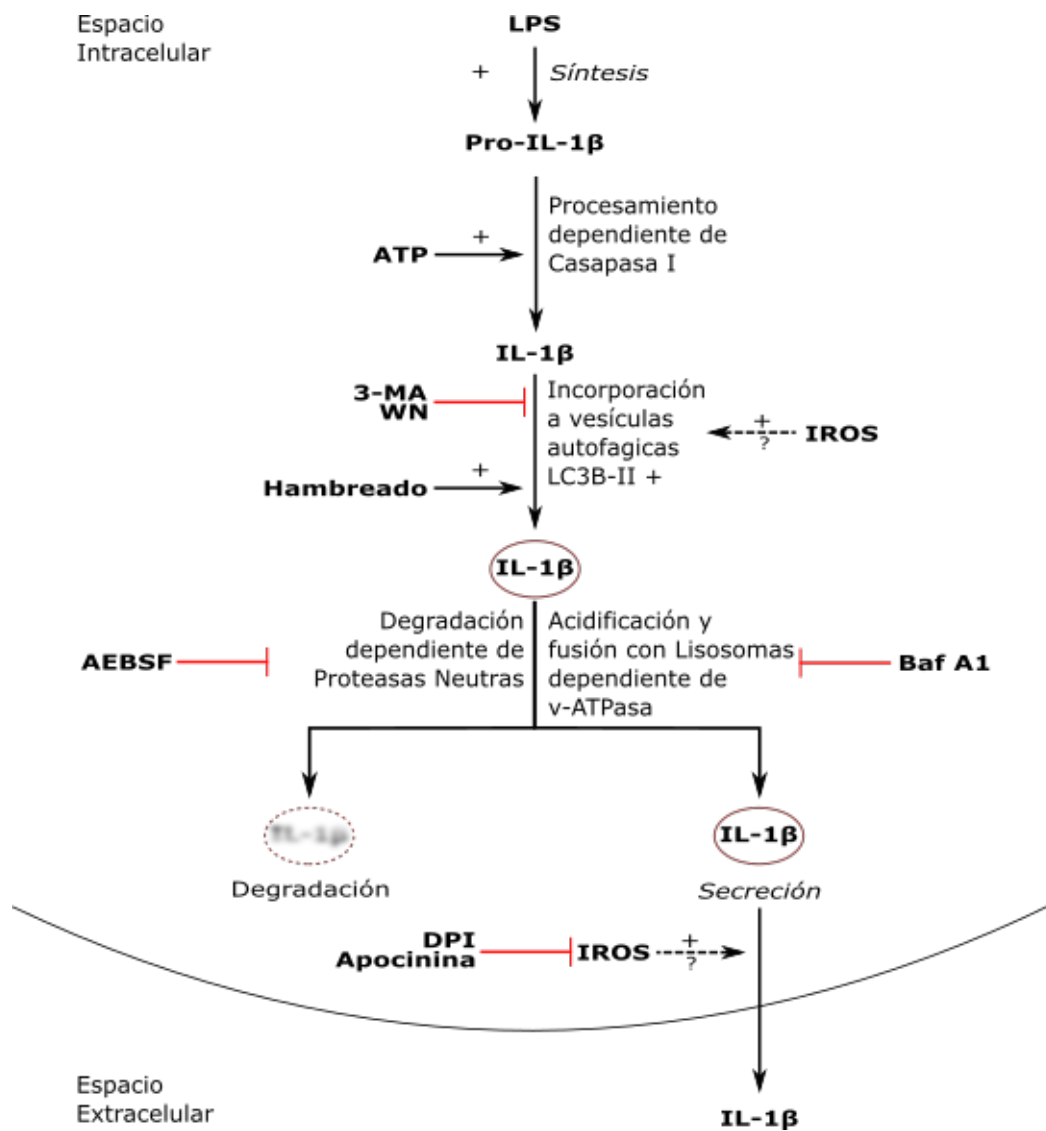


Figura 5.1: Modelo propuesto

Parte de los resultados del presente trabajo de tesis dieron lugar a la siguiente publicación:

“Autophagy Mediates Interleukin-1 β Secretion in Human Neutrophils” Front Immunol. 2018 Feb [201].

Referencias

- [1] Niels Borregaard y col. «Neutrophils, from marrow to microbes.» En: *Immunity* 33.5 (2010), págs. 657-70. ISSN: 1097-4180. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.11.011. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21094463>.
- [2] G J Lieschke y col. «Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization.» En: *Blood* 84.6 (1994), págs. 1737-1746. ISSN: 0006-4971. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7521686>.
- [3] Klaus Ley, Emily Smith y Matthew A Stark. «IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes». En: *Immunol Res* 34.3 (2006), págs. 229-242. ISSN: 0257-277X. DOI: 10.1385/ir:34:3:229. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16891673>.
- [4] Matthew A Stark y col. «Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17». En: *Immunity* 22.3 (2005), págs. 285-294. ISSN: 10747613. DOI: 10.1016/j.immuni.2005.01.011. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15780986>.
- [5] Javier Mestas y Christopher C W Hughes. «Of mice and not men: differences between mouse and human immunology.» En: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172.5 (2004), págs. 2731-8. ISSN: 0022-1767. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14978070>.
- [6] Janesh Pillay y col. «In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days.» En: *Blood* 116.4 (2010), págs. 625-7. ISSN: 1528-0020. DOI: 10.1182/blood-2010-01-259028. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20410504>.
- [7] Stephen J Galli, Niels Borregaard y Thomas A Wynn. «Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils.» En: *Nature immunology* 12.11 (2011), págs. 1035-44. ISSN: 1529-2916. DOI: 10.1038/ni.2109. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22012443><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3412172>.
- [8] Kelvin W Li y col. «Deuterium and neutrophil kinetics.» En: *Blood* 117.22 (2011), 6052-3; author reply 6053-4. ISSN: 1528-0020. DOI: 10.1182/blood-2010-12-322271. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21636721>.

- [9] Paul S Tofts y col. «Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days.» En: *Blood* 117.22 (2011), 6050-2; author reply 6053-4. ISSN: 1528-0020. DOI: 10.1182/blood-2010-10-310532. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21636720>.
- [10] Charlotte Summers y col. «Neutrophil kinetics in health and disease.» En: *Trends in immunology* 31.8 (2010), págs. 318-24. ISSN: 1471-4981. DOI: 10.1016/j.it.2010.05.006. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20620114><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2930213>.
- [11] F Colotta y col. «Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products.» En: *Blood* 80.8 (1992), págs. 2012-20. ISSN: 0006-4971. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1382715>.
- [12] Min-Ho Kim y col. «Neutrophil survival and c-kit(+)-progenitor proliferation in Staphylococcus aureus-infected skin wounds promote resolution.» En: *Blood* 117.12 (2011), págs. 3343-52. ISSN: 1528-0020. DOI: 10.1182/blood-2010-07-296970. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21278352><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3069674>.
- [13] Elzbieta Kolaczowska y Paul Kubes. «Neutrophil recruitment and function in health and inflammation.» En: *Nature reviews. Immunology* 13.3 (2013), págs. 159-75. ISSN: 1474-1741. DOI: 10.1038/nri3399. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435331>.
- [14] N Borregaard y J B Cowland. «Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte.» En: *Blood* 89.10 (1997), págs. 3503-21. ISSN: 0006-4971. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9160655>.
- [15] V Le Cabec y col. «Targeting of proteins to granule subsets is determined by timing and not by sorting: The specific granule protein NGAL is localized to azurophil granules when expressed in HL-60 cells.» En: *PNAS* 93.13 (1996), págs. 6454-7. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.93.13.6454. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8692836><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC39044><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8692836><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC39044>.
- [16] Sara Rørvig y col. «Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors.» En: *Journal of leukocyte biology* 94.4 (2013), págs. 711-21. ISSN: 1938-3673. DOI: 10.1189/jlb.1212619. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23650620>.
- [17] H Sengeløv, L Kjeldsen y N Borregaard. «Control of exocytosis in early neutrophil activation.» En: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 150.4 (1993), págs. 1535-1543. ISSN: 0022-1767. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8381838>.

- [18] H Sengelov y col. «Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils». En: *J Immunol* 154.8 (1995), págs. 4157-4165. ISSN: 0022-1767. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7535822>.
- [19] Claus Fittschen y Peter M Henson. «Linkage of azurophil granule secretion in neutrophils to chloride ion transport and endosomal transcytosis». En: *Journal of Clinical Investigation* 93.1 (1994), págs. 247-255. ISSN: 00219738. DOI: 10.1172/JCI116952. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8282794><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC293759>.
- [20] E N N'Diaye y col. «Fusion of azurophil granules with phagosomes and activation of the tyrosine kinase Hck are specifically inhibited during phagocytosis of mycobacteria by human neutrophils.» En: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 161.9 (1998), págs. 4983-91. ISSN: 0022-1767. DOI: 10.4049/jimmunol.1301645. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9794435><http://www.jimmunol.org/content/161/9/4983.full>.
- [21] M Häger, J B Cowland y N Borregaard. «Neutrophil granules in health and disease.» En: *Journal of internal medicine* 268.1 (2010), págs. 25-34. ISSN: 1365-2796. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2010.02237.x. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20497300>.
- [22] N Borregaard y col. «Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils.» En: *The Journal of clinical investigation* 90.1 (1992), págs. 86-96. ISSN: 0021-9738. DOI: 10.1172/JCI115860. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1378856><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC443066><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=443066{\&}tool=pmcentrez{\&}rendertype=abstract>.
- [23] H Sengeløv y col. «Subcellular localization and translocation of the receptor for N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils.» En: *The Biochemical journal* 299 (Pt 2.Pt 2 (1994), págs. 473-9. ISSN: 0264-6021. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8172608><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1138296><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1138296{\&}tool=pmcentrez{\&}rendertype=abstract>.
- [24] N Borregaard y col. «Identification of a highly mobilizable subset of human neutrophil intracellular vesicles that contains tetranectin and latent alkaline phosphatase.» En: *The Journal of clinical investigation* 85.2 (1990), págs. 408-16. ISSN: 0021-9738. DOI: 10.1172/JCI114453. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2298916><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC296439>.

- [25] Mahalakshmi Ramadass y Sergio D Catz. *Molecular mechanisms regulating secretory organelles and endosomes in neutrophils and their implications for inflammation*. 2016. DOI: 10.1111/imr.12452. URL: <http://doi.wiley.com/10.1111/imr.12452><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27558339>.
- [26] Volker Brinkmann y col. «Neutrophil extracellular traps kill bacteria.» En: *Science (New York, N.Y.)* 303.5663 (2004), págs. 1532-5. ISSN: 1095-9203. DOI: 10.1126/science.1092385. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001782>.
- [27] Mia Phillipson y Paul Kubes. «The neutrophil in vascular inflammation.» En: *Nature medicine* 17.11 (2011), págs. 1381-90. ISSN: 1546-170X. DOI: 10.1038/nm.2514. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22064428>.
- [28] Venizelos Papayannopoulos y col. «NETs: a new strategy for using old weapons.» En: *Trends in immunology* 30.11 (2009), págs. 513-21. ISSN: 1471-4981. DOI: 10.1016/j.it.2009.07.011. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19699684>.
- [29] Alberto Mantovani y col. «Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity.» En: *Nature reviews. Immunology* 11.8 (2011), págs. 519-31. ISSN: 1474-1741. DOI: 10.1038/nri3024. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21785456>.
- [30] O Chertov y col. «Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils.» En: *The Journal of experimental medicine* 186.5 (1997), págs. 739-47. ISSN: 0022-1007. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9271589><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2199011>.
- [31] Soumaya Bennouna y col. «Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection.» En: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171.11 (2003), págs. 6052-8. ISSN: 0022-1767. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14634118>.
- [32] Yasuhiro Tsuda y col. «Three Different Neutrophil Subsets Exhibited in Mice with Different Susceptibilities to Infection by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*». En: *Immunity* 21.2 (2004), págs. 215-226. ISSN: 10747613. DOI: 10.1016/j.immuni.2004.07.006. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761304001955>.
- [33] David Ermert, Arturo Zychlinsky y Constantin Urban. «Fungal and bacterial killing by neutrophils.» En: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 470 (2009), págs. 293-312. ISSN: 1064-3745. DOI: 10.1007/978-1-59745-204-5_21. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19089391>.

- [34] Charles M Robertson y col. «Neutrophil depletion causes a fatal defect in murine pulmonary *Staphylococcus aureus* clearance.» En: *The Journal of surgical research* 150.2 (2008), págs. 278-85. ISSN: 1095-8673. DOI: 10.1016/j.jss.2008.02.009. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18621398><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2605623>.
- [35] Gerben Bouma y col. «Recent advances in the understanding of genetic defects of neutrophil number and function.» En: *British journal of haematology* 151.4 (2010), págs. 312-26. ISSN: 1365-2141. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08361.x. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20813010>.
- [36] Gordon D Brown y col. «Hidden killers: human fungal infections.» En: *Science translational medicine* 4.165 (2012), 165rv13. ISSN: 1946-6242. DOI: 10.1126/scitranslmed.3004404. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23253612>.
- [37] Muthulekha Swamydas y col. «CXCR1-mediated neutrophil degranulation and fungal killing promote *Candida* clearance and host survival.» En: *Science translational medicine* 8.322 (2016), 322ra10. ISSN: 1946-6242. DOI: 10.1126/scitranslmed.aac7718. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26791948>.
- [38] Shizuo Akira. «Mammalian Toll-like receptors». En: *Current Opinion in Immunology* 15.1 (2003), págs. 5-11. ISSN: 09527915. DOI: 10.1016/S0952-7915(02)00013-4.
- [39] Charles A Janeway y Ruslan Medzhitov. «Innate immune recognition.» En: *Annual review of immunology* 20 (2002), págs. 197-216. ISSN: 0732-0582. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861602>.
- [40] Kenneth L Rock y col. «The sterile inflammatory response.» En: *Annual review of immunology* 28 (2010), págs. 321-42. ISSN: 1545-3278. DOI: 10.1146/annurev-immunol-030409-101311. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20307211><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4315152>.
- [41] Frank L van de Veerdonk y col. «Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection.» En: *Trends in immunology* 32.3 (2011), págs. 110-6. ISSN: 1471-4981. DOI: 10.1016/j.it.2011.01.003. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21333600>.
- [42] Marco E Bianchi. «DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger.» En: *Journal of leukocyte biology* 81.1 (2007), págs. 1-5. ISSN: 0741-5400. DOI: 10.1189/jlb.0306164. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17032697>.

-
- [43] Carl Nathan. «Neutrophils and immunity: challenges and opportunities.» En: *Nature reviews. Immunology* 6.3 (2006), págs. 173-82. ISSN: 1474-1733. DOI: 10.1038/nri1785. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16498448>.
 - [44] Bart W Bardoel y col. «The balancing act of neutrophils.» En: *Cell host & microbe* 15.5 (2014), págs. 526-36. ISSN: 1934-6069. DOI: 10.1016/j.chom.2014.04.011. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24832448>.
 - [45] Borko Amulic y col. «Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease.» En: *Annual Review of Immunology* 30.1 (2012), págs. 459-489. ISSN: 0732-0582. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-074942. URL: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-020711-074942><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22224774>.
 - [46] P M Henson y R B Johnston. «Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins.» En: *The Journal of clinical investigation* 79.3 (1987), págs. 669-74. ISSN: 0021-9738. DOI: 10.1172/JCI112869. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3546374><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC424175>.
 - [47] S J Weiss. «Tissue destruction by neutrophils.» En: *The New England journal of medicine* 320.6 (1989), págs. 365-76. ISSN: 0028-4793. DOI: 10.1056/NEJM198902093200606. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2536474>.
 - [48] Paula Nunes, Nicolas Demaurex y Mary C Dinauer. «Regulation of the NADPH oxidase and associated ion fluxes during phagocytosis.» En: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 14.11 (2013), págs. 1118-31. ISSN: 1600-0854. DOI: 10.1111/tra.12115. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23980663>.
 - [49] M B Hampton y col. «Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing.» En: *Blood* 92.9 (1998), págs. 3007-17. ISSN: 0006-4971. DOI: 10.1084/jem.112.6.1005. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9787133>.
 - [50] Steven M Holland. «Chronic granulomatous disease.» En: *Clinical reviews in allergy & immunology* 38.1 (2010), págs. 3-10. ISSN: 1559-0267. DOI: 10.1007/s12016-009-8136-z. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19504359>.
 - [51] Sarah a. Bissonnette y col. «Phosphatidylinositol 3-phosphate-dependent and -independent functions of p40phox in activation of the neutrophil NADPH oxidase.» En: *Journal of Biological Chemistry* 283.4 (2008), págs. 2108-2119. ISSN: 00219258. DOI: 10.1074/jbc.M706639200.
-

- [52] Chris Ellson y col. «PtdIns3P binding to the PX domain of p40phox is a physiological signal in NADPH oxidase activation.» En: *The EMBO journal* 25.19 (2006), págs. 4468-78. ISSN: 0261-4189. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601346. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16990793><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1589987>.
- [53] C D Ellson y col. «PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox).» En: *Nature cell biology* 3.7 (2001), págs. 679-82. ISSN: 1465-7392. DOI: 10.1038/35083076. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11433301>.
- [54] Chris Ellson y col. «PtdIns3P binding to the PX domain of p40phox is a physiological signal in NADPH oxidase activation.» En: *The EMBO journal* 25.19 (2006), págs. 4468-4478. ISSN: 0261-4189. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601346.
- [55] O V Vieira y col. «Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation.» En: *The Journal of cell biology* 155.1 (2001), págs. 19-25. ISSN: 0021-9525. DOI: 10.1083/jcb.200107069. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11581283><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2150784>.
- [56] B Holmes, A R Page y R A Good. «Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function.» En: *The Journal of clinical investigation* 46.9 (1967), págs. 1422-32. ISSN: 0021-9738. DOI: 10.1172/JCI105634. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6036538><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC292888>.
- [57] G L Mandell. «Bactericidal activity of aerobic and anaerobic polymorphonuclear neutrophils.» En: *Infection and immunity* 9.2 (1974), págs. 337-41. ISSN: 0019-9567. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4361295><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC414806>.
- [58] S J Klebanoff y R A Clark. «Iodination by human polymorphonuclear leukocytes: a re-evaluation.» En: *The Journal of laboratory and clinical medicine* 89.3 (1977), págs. 675-86. ISSN: 0022-2143. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/839126>.
- [59] Emer P Reeves y col. «Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux.» En: *Nature* 416.6878 (2002), págs. 291-7. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/416291a. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11907569>.
- [60] A Belaouaj y col. «Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis.» En: *Nature medicine* 4.5 (1998), págs. 615-8. ISSN: 1078-8956. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9585238>.

- [61] Emer P Reeves y col. «Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux.» En: *Nature* 416.6878 (2002), págs. 291-7. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/416291a. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11907569>.
- [62] Josephine Tkalcovic y col. «Impaired Immunity and Enhanced Resistance to Endotoxin in the Absence of Neutrophil Elastase and Cathepsin G». En: *Immunity* 12.2 (2000), págs. 201-210. ISSN: 10747613. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80173-9. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761300801739>.
- [63] D M MacIvor y col. «Normal neutrophil function in cathepsin G-deficient mice.» En: *Blood* 94.12 (1999), págs. 4282-93. ISSN: 0006-4971. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10590073>.
- [64] Lea Fialkow, Yingchun Wang y Gregory P. Downey. «Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function». En: *Free Radical Biology and Medicine* 42.2 (2007), págs. 153-164. ISSN: 08915849. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.09.030.
- [65] Nicholas K Tonks y col. «Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling.» En: *Cell* 121.5 (2005), págs. 667-70. ISSN: 0092-8674. DOI: 10.1016/j.cell.2005.05.016. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15935753>.
- [66] R Schreck, P Rieber y P A Baeuerle. «Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1.» En: *The EMBO journal* 10.8 (1991), págs. 2247-58. ISSN: 0261-4189. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2065663><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC452914>.
- [67] J H Brumell y col. «Endogenous reactive oxygen intermediates activate tyrosine kinases in human neutrophils.» En: *The Journal of biological chemistry* 271.3 (1996), págs. 1455-61. ISSN: 0021-9258. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8576138>.
- [68] L Fialkow, C K Chan y G P Downey. «Inhibition of CD45 during neutrophil activation.» En: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 158.11 (1997), págs. 5409-17. ISSN: 0022-1767. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9164962>.
- [69] L Fialkow y col. «Activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in neutrophils. Role of oxidants.» En: *The Journal of biological chemistry* 269.49 (1994), págs. 31234-42. ISSN: 0021-9258. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7983067>.

-
- [70] J E Salmon y col. «Fc gamma receptor IIIb enhances Fc gamma receptor IIa function in an oxidant-dependent and allele-sensitive manner.» En: *The Journal of clinical investigation* 95.6 (1995), págs. 2877-85. ISSN: 0021-9738. DOI: 10.1172/JCI117994. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7769129><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC295975>.
 - [71] Y Y Lo y T F Cruz. «Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes.» En: *The Journal of biological chemistry* 270.20 (1995), págs. 11727-30. ISSN: 0021-9258. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7744816>.
 - [72] Shyra Gardai y col. «Activation of SHIP by NADPH oxidase-stimulated Lyn leads to enhanced apoptosis in neutrophils.» En: *The Journal of biological chemistry* 277.7 (2002), págs. 5236-46. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M110005200. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11724799>.
 - [73] Ioannis Mitroulis y col. «Regulation of the autophagic machinery in human neutrophils.» En: *European journal of immunology* 40.5 (2010), págs. 1461-72. ISSN: 1521-4141. DOI: 10.1002/eji.200940025. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20162553>.
 - [74] A Jankowski y S Grinstein. «A noninvasive fluorimetric procedure for measurement of membrane potential. Quantification of the NADPH oxidase-induced depolarization in activated neutrophils.» En: *The Journal of biological chemistry* 274.37 (1999), págs. 26098-104. ISSN: 0021-9258. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10473559>.
 - [75] Thomas E DeCoursey, Deri Morgan y Vladimir V Cherny. «The voltage dependence of NADPH oxidase reveals why phagocytes need proton channels.» En: *Nature* 422.6931 (2003), págs. 531-4. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/nature01523. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12673252>.
 - [76] Gábor L Petheo y col. «Molecular and functional characterization of Hv1 proton channel in human granulocytes.» En: *PloS one* 5.11 (2010), e14081. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0014081. URL: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0014081>.
 - [77] Yoshifumi Okochi y col. «Voltage-gated proton channel is expressed on phagosomes». 2009.
 - [78] I Scott Ramsey y col. «Hv1 proton channels are required for high-level NADPH oxidase-dependent superoxide production during the phagocyte respiratory burst.» En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106.18 (2009), págs. 7642-7. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.0902761106. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19372380><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2669790>.
-

-
- [79] Antoun El Chemaly y col. «VSOP/Hv1 proton channels sustain calcium entry, neutrophil migration, and superoxide production by limiting cell depolarization and acidification.» En: *The Journal of experimental medicine* 207.1 (2010), págs. 129-139. ISSN: 0022-1007. DOI: 10.1084/jem.20091837.
- [80] Antoun El Chemaly y col. «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.» En: *Journal of leukocyte biology* 95.May (2014), págs. 827-839. ISSN: 1938-3673. DOI: 10.1189/jlb.0513251. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24415791>.
- [81] C A Dinarello. «The interleukin-1 family: 10 years of discovery.» En: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 8.15 (1994), págs. 1314-25. ISSN: 0892-6638. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8001745>.
- [82] A C Webb y col. «Interleukin-1 gene (IL1) assigned to long arm of human chromosome 2.» En: *Lymphokine research* 5.2 (1986), págs. 77-85. ISSN: 0277-6766. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3010001>.
- [83] B Mosley y col. «The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor.» En: *The Journal of biological chemistry* 262.7 (1987), págs. 2941-4. ISSN: 0021-9258. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2950091>.
- [84] R A Black y col. «Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor.» En: *The Journal of biological chemistry* 263.19 (1988), págs. 9437-42. ISSN: 0021-9258. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3288634>.
- [85] Charles A Dinarello. «Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family.» En: *Annual Review of Immunology* 27 (2009), págs. 519-50. ISSN: 0732-0582. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132612. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302047>.
- [86] John E. Sims y Dirk E. Smith. «The IL-1 family: regulators of immunity.» En: *Nature reviews. Immunology* 10.2 (2010), págs. 89-102. ISSN: 1474-1741. DOI: 10.1038/nri2691. arXiv: www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3006164&tool=pmcentrez&rendertype=abstract. [Figures, S., 2010. Supplementary information. Nature, 1(c), pp.1{7. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri2691>]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20081871>.
- [87] N A Thornberry y col. «A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes.» En: *Nature* 356.6372 (1992), págs. 768-74. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/356768a0. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1574116>.
-

-
- [88] María Laura Gabelloni y col. «NADPH oxidase derived reactive oxygen species are involved in human neutrophil IL-1 β secretion but not in inflammasome activation.» En: *European journal of immunology* 43.12 (2013), págs. 3324-35. ISSN: 1521-4141. DOI: 10.1002/eji.201243089. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23963575>.
 - [89] Luigi Franchi y col. «The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis.» En: *Nature immunology* 10.3 (2009), págs. 241-7. ISSN: 1529-2916. DOI: 10.1038/ni.1703. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19221555><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2820724><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2820724{\&\&}tool=pmcentrez{\&\&}rendertype=abstract>.
 - [90] Mohamed Lamkanfi y Vishva M Dixit. «Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity.» En: *Immunological reviews* 227.1 (2009), págs. 95-105. ISSN: 1600-065X. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00730.x. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120479>.
 - [91] Fabio Martinon, Annick Mayor y Jürg Tschopp. «The inflammasomes: guardians of the body.» En: *Annual review of immunology* 27 (2009), págs. 229-65. ISSN: 0732-0582. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132715. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302040>.
 - [92] Luigi Franchi, Raul Muñoz-Planillo y Gabriel Núñez. «Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes.» En: *Nature Immunology* 13.4 (2012), págs. 325-332. ISSN: 1529-2908. DOI: 10.1038/ni.2231. URL: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ni.2231>.
 - [93] Fabio Martinon, Kimberly Burns y Jürg Tschopp. «The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β ». En: *Molecular Cell* 10.2 (2002), págs. 417-426. ISSN: 10972765. DOI: 10.1016/S1097-2765(02)00599-3. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12191486>.
 - [94] Lin Wang y Pypaf7. «a novel PYRIN-containing Apaf1- like protein that regulates activation of NF- κ B and caspase-1-dependent cytokine processing». En: *J. Biol. Chem* ().
 - [95] Si Ming Man y Thirumala Devi Kanneganti. *Regulation of inflammasome activation*. 2015. DOI: 10.1111/imr.12296. arXiv: 15334406. URL: <http://doi.wiley.com/10.1111/imr.12296>.
 - [96] Sanjeev Mariathasan y col. «Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP». En: *Nature* 440.7081 (2006), págs. 228-232. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/nature04515. URL: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature04515>.
-

-
- [97] Yuan He, Hideki Hara y Gabriel Núñez. «Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation». En: *Trends in Biochemical Sciences* xx (2016), págs. 1-10. ISSN: 09680004. DOI: 10.1016/j.tibs.2016.09.002. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000416301487>.
 - [98] Franz G Bauernfeind y col. «Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression.» En: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183.2 (2009), págs. 787-91. ISSN: 1550-6606. DOI: 10.4049/jimmunol.0901363. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19570822><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2824855><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2824855&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 - [99] Jürgen Harder y col. «Activation of the Nlrp3 inflammasome by Streptococcus pyogenes requires streptolysin O and NF-kappa B activation but proceeds independently of TLR signaling and P2X7 receptor.» En: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183.9 (2009), págs. 5823-9. ISSN: 1550-6606. DOI: 10.4049/jimmunol.0900444. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19812205><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2765568><http://www.jimmunol.org/content/183/9/5823.full>.
 - [100] D J Hazuda y col. «Processing of precursor interleukin 1[beta] and inflammatory disease». En: *J. Biol. Chem.* 265.11 (1990), págs. 6318-6322.
 - [101] Florian R. Greten y col. «NF- κ B Is a Negative Regulator of IL-1 β Secretion as Revealed by Genetic and Pharmacological Inhibition of IKK β ». En: *Cell* 130.5 (2007), págs. 918-931. ISSN: 00928674. DOI: 10.1016/j.cell.2007.07.009. arXiv: NIHMS150003.
 - [102] U Schonbeck, F Mach y P Libby. «Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing». En: *Journal of Immunology* 161.7 (1998), págs. 3340-3346. ISSN: 0022-1767. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9759850.
 - [103] H Mizutani y col. «Rapid and specific conversion of precursor interleukin 1 beta (IL-1 beta) to an active IL-1 species by human mast cell chymase.» En: *The Journal of experimental medicine* 174.4 (1991), págs. 821-5. ISSN: 0022-1007. DOI: 10.1084/jem.174.4.821. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2118970&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 - [104] C Coeshott y col. «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.» En: *Proceedings*
-

- of the National Academy of Sciences of the United States of America 96.11 (1999), págs. 6261-6266. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.96.11.6261.
- [105] D. J. Hazuda, J. C. Lee y P. R. Young. «The kinetics of interleukin 1 secretion from activated monocytes. Differences between interleukin 1 α and interleukin 1 β ». En: *Journal of Biological Chemistry* 263.17 (1988), págs. 8473-8479. ISSN: 00219258.
- [106] Lloyd S Miller y col. «MyD88 mediates neutrophil recruitment initiated by IL-1R but not TLR2 activation in immunity against Staphylococcus aureus.» En: *Immunity* 24.1 (2006), págs. 79-91. ISSN: 1074-7613. DOI: 10.1016/j.immuni.2005.11.011. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16413925>.
- [107] C A Dinarello. «Biologic basis for interleukin-1 in disease.» En: *Blood* 87.6 (1996), págs. 2095-147. ISSN: 0006-4971. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8630372>.
- [108] Yeonseok Chung y col. «Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling.» En: *Immunity* 30.4 (2009), págs. 576-87. ISSN: 1097-4180. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.02.007. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19362022><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2705871>.
- [109] Eva V Acosta-Rodriguez y col. «Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17â“producing human T helper cells». En: *Nature Immunology* 8.9 (2007), págs. 942-949. ISSN: 1529-2908. DOI: 10.1038/ni1496. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17676045>.
- [110] Claire Jacques y col. *The Role of IL-1 and IL-1Ra in Joint Inflammation and Cartilage Degradation*. 2006. DOI: 10.1016/S0083-6729(06)74016-X.
- [111] Cem Gabay, Céline Lamacchia y Gaby Palmer. «IL-1 pathways in inflammation and human diseases.» En: *Nature reviews. Rheumatology* 6.4 (2010), págs. 232-41. ISSN: 1759-4804. DOI: 10.1038/nrrheum.2010.4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20177398>.
- [112] John S Cho y col. «Neutrophil-derived IL-1 β is sufficient for abscess formation in immunity against Staphylococcus aureus in mice.» En: *PLoS pathogens* 8.11 (2012), e1003047. ISSN: 1553-7374. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003047. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3510260&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [113] Ryan F Russell y col. «Partial Attenuation of Respiratory Syncytial Virus with a Deletion of a Small Hydrophobic Gene Is Associated with Elevated Interleukin-1 β Responses.» En: *Journal of virology* 89.17 (2015), págs. 8974-81. ISSN: 1098-5514. DOI: 10.1128/JVI.01070-15. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26085154><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4524082><http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

- gov/pubmed/26085154{\%}5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4524082.
- [114] Yash R Patankar, Rodwell Mabaera y Brent L Berwin. «Differential ASC Requirements Reveal a Key Role for Neutrophils and a Noncanonical IL-1 β Response to *Pseudomonas aeruginosa*». En: *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 309.8 (2015), ajplung.00228.2015. ISSN: 1040-0605. DOI: 10.1152/ajplung.00228.2015. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26472815><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4609944><http://ajplung.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajplung.00228.2015>.
- [115] Nastaran Mohammadi y col. «Neutrophils Directly Recognize Group B Streptococci and Contribute to Interleukin-1 β Production during Infection». En: *PLOS ONE* 11.8 (2016). Ed. por Edgardo Moreno, e0160249. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0160249. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27509078><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4980021><http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0160249>.
- [116] K Joop y col. «Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms». En: *Thrombosis and Haemostasis* 85.5 (2001), págs. 810-820. ISSN: 03406245. DOI: 01050810[pil]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11372673>.
- [117] Z Mallat y col. «Elevated levels of shed membrane microparticles with pro-coagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes.» En: *Circulation* 101.8 (2000), págs. 841-843. ISSN: 0009-7322. DOI: 10.1161/01.CIR.101.8.841. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10694520>.
- [118] J M Stein y J P Luzio. «Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human neutrophils. The sorting of endogenous plasma-membrane proteins and lipids into shed vesicles». En: *Biochemical Journal* 274.2 (1991), págs. 381-386. ISSN: 0264-6021. DOI: 10.1042/bj2740381. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1848755><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1150148><http://www.biochemj.org/content/274/2/381.abstract>.
- [119] Stephen J. Gould y Graça Raposo. «As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles.» En: *Journal of extracellular vesicles* 2.0 (2013), págs. 3-5. ISSN: 2001-3078. DOI: 10.3402/jev.v2i0.20389. URL: <http://www.journalofextracellularvesicles.net/index.php/jev/article/view/20389><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3760635{\&}tool=pmcentrez{\&}rendertype=abstract>.

- [120] Florence Sabatier y col. «Interaction of endothelial microparticles with monocyte cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity». En: *Blood* 99.11 (2002), págs. 3962-3970. ISSN: 00064971. DOI: 10.1182/blood.V99.11.3962. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12010795>.
- [121] N Satta y col. «Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide.» En: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 153.7 (1994), págs. 3245-55. ISSN: 0022-1767. DOI: 10.4049/jimmunol.169.12.6720. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7522256>.
- [122] Amanda Mackenzie y col. «Rapid Secretion of Interleukin-1 by Microvesicle Shedding». En: 8 (2001), págs. 825-835.
- [123] Olivier Gasser y col. «Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils». En: *Experimental Cell Research* 285.2 (2003), págs. 243-257. ISSN: 00144827. DOI: 10.1016/S0014-4827(03)00055-7. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482703000557>.
- [124] C Hess. «Ectosomes Released by Human Neutrophils are Specialized Functional Units.» En: *Journal of Immunology* 163.8 (1999), págs. 4564-4573. ISSN: 1098-6596. DOI: 10.1017/CB09781107415324.004. arXiv: arXiv:1011.1669v3. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10510400>.
- [125] Bobby L Johnson y col. «Neutrophil derived microvesicles: emerging role of a key mediator to the immune response.» En: *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* 14.3 (2014), págs. 210-7. ISSN: 2212-3873. DOI: EMIDDT-EPUB-61498[pil]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25051983><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4267953><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4267953&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [126] Jesmond Dalli y col. «Heterogeneity in neutrophil microparticles reveals distinct proteome and functional properties.» En: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 12.8 (2013), págs. 2205-19. ISSN: 1535-9484. DOI: 10.1074/mcp.M113.028589. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23660474><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3734580><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3734580&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [127] Viola Dengler y col. «Neutrophil intercellular communication in acute lung injury. Emerging roles of microparticles and gap junctions.» En: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 49.1 (2013), págs. 1-5. ISSN: 1535-4989. DOI: 10.1165/rcmb.2012-0472TR. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23815257><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3727882>.

-
- [128] Csaba I Timár y col. «Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes». En: *Blood* 121.3 (2013), págs. 510-518. ISSN: 00064971. DOI: 10.1182/blood-2012-05-431114. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23144171><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3548170>.
 - [129] Robert C Piper y David J Katzmann. «Biogenesis and function of multivesicular bodies.» En: *Annual review of cell and developmental biology* 23 (2007), págs. 519-47. ISSN: 1081-0706. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123319. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17506697><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2911632>.
 - [130] Thomas A. Hamilton. «Receptor-mediated endocytosis and exocytosis of transferrin in concanavalin A-stimulated rat lymphoblasts». En: *Journal of Cellular Physiology* 114.2 (1983), págs. 222-228. ISSN: 0021-9541. DOI: 10.1002/jcp.1041140212. URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.1041140212>.
 - [131] Catherine Rabouille. *Pathways of Unconventional Protein Secretion*. 2017. DOI: 10.1016/j.tcb.2016.11.007. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27989656>.
 - [132] A Rubartelli y col. «A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence.» En: *The EMBO journal* 9.5 (1990), págs. 1503-10. ISSN: 0261-4189. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601974. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2328723><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC551842><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=551842{\&}tool=pmcentrez{\&}rendertype=abstract>.
 - [133] Cristina Andrei y col. «Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes.» En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101.26 (2004), págs. 9745-50. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0308558101. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=470745{\&}tool=pmcentrez{\&}rendertype=abstract>.
 - [134] C Andrei y col. «The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles.» En: *Molecular biology of the cell* 10.5 (1999), págs. 1463-75. ISSN: 1059-1524. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=25302{\&}tool=pmcentrez{\&}rendertype=abstract>.
 - [135] Cinzia Pizzirani y col. «Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1beta-loaded microvesicles from human dendritic cells.» En: *Blood* 109.9 (2007), págs. 3856-64. ISSN: 0006-4971. DOI: 10.1182/blood-2005-06-031377. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17192399>.
-

-
- [136] Fabio Bianco y col. «Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia.» En: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174.11 (2005), págs. 7268-77. ISSN: 0022-1767. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15905573>.
 - [137] Yan Qu y col. «Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages.» En: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179.3 (2007), págs. 1913-25. ISSN: 0022-1767. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17641058>.
 - [138] David Brough y Nancy J Rothwell. «Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death.» En: *Journal of cell science* 120.Pt 5 (2007), págs. 772-81. ISSN: 0021-9533. DOI: 10.1242/jcs.03377. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17284521>.
 - [139] K a Hogquist y col. «Interleukin 1 is processed and released during apoptosis.» En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88.19 (1991), págs. 8485-9. ISSN: 0027-8424. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=525333&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 - [140] R E Laliberte, J Eggler y C A Gabel. «ATP treatment of human monocytes promotes caspase-1 maturation and externalization.» En: *The Journal of biological chemistry* 274.52 (1999), págs. 36944-51. ISSN: 0021-9258. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10601248>.
 - [141] Roberto Sitia y Anna Rubartelli. *The unconventional secretion of IL-1 β : Handling a dangerous weapon to optimize inflammatory responses*. 2018. DOI: 10.1016/j.semcd.2018.03.011. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S108495211730071X><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29571971>.
 - [142] Nicolas Dupont y col. «Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β .» En: *The EMBO journal* 30.23 (2011), págs. 4701-11. ISSN: 1460-2075. DOI: 10.1038/emboj.2011.398. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3243609&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 - [143] Claudia Eder. *Mechanisms of interleukin-1b release*. 2009. DOI: 10.1016/j.imbio.2008.11.007. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19250700>.
 - [144] Noboru Mizushima, Tamotsu Yoshimori y Yoshinori Ohsumi. «The role of Atg proteins in autophagosome formation.» En: *Annual review of cell and developmental biology* 27 (2011), págs. 107-32. ISSN: 1530-8995. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154005. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21801009>.
-

-
- [145] Daniel J. Klionsky, Eeva Liisa Eskelinen y Vojo Deretic. «Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... Wait, I'm confused». En: *Autophagy* 10.4 (2014), págs. 549-551. ISSN: 15548635. DOI: 10.4161/auto.28448.
 - [146] Wen-wen Li, Jian Li y Jin-ku Bao. «Microautophagy: lesser-known self-eating.» En: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69.7 (2012), págs. 1125-36. ISSN: 1420-9071. DOI: 10.1007/s00018-011-0865-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22080117>.
 - [147] Susmita Kaushik y col. «Chaperone-mediated autophagy at a glance.» En: *Journal of cell science* 124.Pt 4 (2011), págs. 495-9. ISSN: 1477-9137. DOI: 10.1242/jcs.073874. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3031365&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 - [148] Noboru Mizushima, Yoshinori Ohsumi y Tamotsu Yoshimori. «Autophagosome formation in mammalian cells.» En: *Cell structure and function* 27.6 (2002), págs. 421-9. ISSN: 0386-7196. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12576635>.
 - [149] Violetta N Pivtoraiko y col. «Oxidative stress and autophagy in the regulation of lysosome-dependent neuron death.» En: *Antioxidants & redox signaling* 11.3 (2009), págs. 481-96. ISSN: 1557-7716. DOI: 10.1089/ars.2008.2263. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18764739><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2933567>.
 - [150] Yongqiang Chen y Daniel J Klionsky. «The regulation of autophagy - unanswered questions.» En: *Journal of cell science* 124.Pt 2 (2011), págs. 161-70. ISSN: 1477-9137. DOI: 10.1242/jcs.064576. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21187343><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3037094>.
 - [151] R Kang y col. «The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis.» En: *Cell death and differentiation* 18.4 (2011), págs. 571-80. ISSN: 1476-5403. DOI: 10.1038/cdd.2010.191. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21311563><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3131912>.
 - [152] Jiefei Geng y Daniel J Klionsky. «The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series.» En: *EMBO reports* 9.9 (2008), págs. 859-64. ISSN: 1469-3178. DOI: 10.1038/embor.2008.163. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18704115><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2529362>.
-

- [153] Hitoshi Nakatogawa y col. «Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion». En: *Cell* 130.1 (2007), págs. 165-178. ISSN: 00928674. DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.021. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867407006587>.
- [154] David C Rubinsztein, Tomer Shpilka y Zvulun Elazar. «Mechanisms of autophagosome biogenesis.» En: *Current biology : CB* 22.1 (2012), R29-34. ISSN: 1879-0445. DOI: 10.1016/j.cub.2011.11.034. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22240478>.
- [155] Julia Romanov y col. «Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation.» En: *The EMBO journal* 31.22 (2012), págs. 4304-17. ISSN: 1460-2075. DOI: 10.1038/emboj.2012.278. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23064152><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3501226>.
- [156] Catherine Rabouille, Vivek Malhotra y Walter Nickel. «Diversity in unconventional protein secretion». En: *Journal of Cell Science* 125.22 (2012), págs. 5251-5255. ISSN: 0021-9533. DOI: 10.1242/jcs.103630. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23377655><http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.103630>.
- [157] Tiina Öhman y col. «Dectin-1 pathway activates robust autophagy-dependent unconventional protein secretion in human macrophages.» En: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192.12 (2014), págs. 5952-62. ISSN: 1550-6606. DOI: 10.4049/jimmunol.1303213. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24808366>.
- [158] Li-Jie Wang y col. «The Microtubule-associated Protein EB1 Links AIM2 Inflammasomes with Autophagy-dependent Secretion.» En: *The Journal of biological chemistry* 289.42 (2014), págs. 29322-33. ISSN: 1083-351X. DOI: 10.1074/jbc.M114.559153. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25164813>.
- [159] Patrizia Piccioli y Anna Rubartelli. «The secretion of IL-1 β and options for release.» En: *Seminars in immunology* 25.6 (2013), págs. 425-9. ISSN: 1096-3618. DOI: 10.1016/j.smim.2013.10.007. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24201029>.
- [160] K A Tucker y col. «Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity.» en. En: *Blood* 70.2 (1987), págs. 372-8. ISSN: 0006-4971. URL: <http://bloodjournal.org/content/70/2/372.abstract>.
- [161] Eric Pedruzzi y col. «Differentiation of PLB-985 myeloid cells into mature neutrophils, shown by degranulation of terminally differentiated compartments in response to N-formyl peptide and priming of superoxide anion production by granulocyte-macrophage colony-stimulating fact». En: *British*

- journal of haematology* 117.3 (2002), págs. 719-26. ISSN: 0007-1048. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12028049>.
- [162] MT Quinn, F Deleo y GM Bokoch. *Neutrophil methods and protocols*. 2014. ISBN: 9781627038447. URL: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-1-59745-467-4.pdf>.
- [163] Nadine C L Zembruski y col. «7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry». En: *Analytical Biochemistry* 429.1 (2012), págs. 79-81. ISSN: 00032697. DOI: 10.1016/j.ab.2012.07.005. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.07.005>.
- [164] DJ Klionsky y FC Abdalla. «Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy». En: ... April (2012), págs. 445-544. URL: <http://www.landesbioscience.com/journals/3/article/19496/>.
- [165] Jackson ImmunoResearch. *Fab Fragments for Blocking and Double Labeling of Primary Antibodies from the Same Host Species*. <https://www.jacksonimmuno.com/technical/products/protocols/double-labeling-same-species-primary/example-a>. 2010 (accessed May 5, 2016).
- [166] Caroline a Schneider, Wayne S Rasband y Kevin W Eliceiri. «NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis». En: *Nature Methods* 9.7 (2012), págs. 671-675. ISSN: 1548-7091. DOI: 10.1038/nmeth.2089. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- [167] Lotta Agholme y col. «Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy». En: April (2012), págs. 445-544.
- [168] Kai Er Eng y col. «A novel quantitative flow cytometry-based assay for autophagy». En: *Autophagy* 6.February 2015 (2010), págs. 634-641. ISSN: 15548627. DOI: 10.4161/auto.6.5.12112. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20458170>.
- [169] Lonza. *Cell & Transfection Database PLB-985*. <http://bio.lonza.com/6.html>. 2011 (accessed November 4, 2014).
- [170] A Lindemann y col. «Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor induces interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils». En: *J Immunol* 140.3 (1988), págs. 837-839. ISSN: 0022-1767. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3276781><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve{&}db=PubMed{&}dopt=Citation{&}list{&}uids=3276781>.
- [171] K Goh y col. «Production of interleukin-1-alpha and -beta by human peripheral polymorphonuclear neutrophils.» En: *International archives of allergy and applied immunology* 88.3 (1989), págs. 297-303. ISSN: 0020-5915. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2785968>.
- [172] Kanchan Phadwal y col. «A novel method for autophagy detection in primary cells». En: April (2012), págs. 677-689. URL: <http://www.landesbioscience.com/journals/autophagy/2011AUT00234R3.pdf>.

- [173] C Capodici y col. «Phosphatidylinositol 3-kinase mediates chemoattractant-stimulated, CD11b/CD18-dependent cell-cell adhesion of human neutrophils: evidence for an ERK-independent pathway». En: *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 160.4 (1998), págs. 1901-1909. ISSN: 0022-1767. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/160/4/1901> \backslash\$npapers2://publication/uuid/1A5A838C-24CB-4B2B-B786-B057F023C4B3.
- [174] Boris K Pliyev y Mikhail Menshikov. «Differential effects of the autophagy inhibitors 3-methyladenine and chloroquine on spontaneous and TNF- α -induced neutrophil apoptosis.» En: *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 17.10 (2012), págs. 1050-65. ISSN: 1573-675X. DOI: 10.1007/s10495-012-0738-x. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22638980>.
- [175] Caroline Mauvezin y Thomas P Neufeld. «Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion». En: *Autophagy* 11.8 (2015), págs. 1437-1438. ISSN: 15548635. DOI: 10.1080/15548627.2015.1066957. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26156798><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4590655><http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15548627.2015.1066957>.
- [176] T. Nishihara y col. «Specific inhibitors of vacuolar type H(+)-ATPases induce apoptotic cell death.» En: *Biochemical and biophysical research communications* 212.1 (1995), págs. 255-62. ISSN: 0006-291X. DOI: 10.1006/bbrc.1995.1964. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X8571964X><http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X8571964X>.
- [177] Kuninori Kinoshita y col. «Bafilomycin A1 induces apoptosis in PC12 cells independently of intracellular pH». En: *FEBS Letters* 398.1 (1996), págs. 61-66. ISSN: 00145793. DOI: 10.1016/S0014-5793(96)01182-9. URL: <http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793{\%}2896{\%}2901182-9>.
- [178] T Ohta y col. «Bafilomycin A1 induces apoptosis in the human pancreatic cancer cell line Capan-1.» En: *The Journal of pathology* 185.3 (1998), págs. 324-30. ISSN: 0022-3417. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199807)185:3<324::AID-PATH72>3.0.CO;2-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9771488>.
- [179] Shigehito Nakashima y col. «Vacuolar H+-ATPase inhibitor induces apoptosis via lysosomal dysfunction in the human gastric cancer cell line MKN-1.» En: *Journal of biochemistry* 134.3 (2003), págs. 359-64. ISSN: 0021-924X. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561721>.

-
- [180] Jiake Xu y col. «Effects of Bafilomycin A1: an inhibitor of vacuolar H (+)-ATPases on endocytosis and apoptosis in RAW cells and RAW cell-derived osteoclasts.» En: *Journal of cellular biochemistry* 88.6 (2003), págs. 1256-64. ISSN: 0730-2312. DOI: 10.1002/jcb.10477. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12647307>.
 - [181] John J Shacka, Barbara J Klocke y Kevin A Roth. *Autophagy, bafilomycin and cell death: The A-B-Cs of plecomacrolide-induced neuroprotection*. 2006. DOI: 2703[pil]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16874105>.
 - [182] Violetta N Pivtoraiko y col. «Low-dose bafilomycin attenuates neuronal cell death associated with autophagy-lysosome pathway dysfunction». En: *Journal of Neurochemistry* 114.4 (2010), págs. 1193-1204. ISSN: 14714159. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2010.06838.x. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20534000><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2910188>.
 - [183] Gábor Juhász. *Interpretation of bafilomycin, pH neutralizing or protease inhibitor treatments in autophagic flux experiments: Novel considerations*. 2012. DOI: 10.4161/auto.21544. URL: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/auto.21544>.
 - [184] S Bolte y F P Cordelières. «A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy.» En: *Journal of microscopy* 224.Pt 3 (2006), págs. 213-32. ISSN: 0022-2720. DOI: 10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210054>.
 - [185] A K Robertson y col. «The use of diphenylene iodonium, an inhibitor of NADPH oxidase, to investigate the antimicrobial action of human monocyte derived macrophages.» En: *Journal of Immunological Methods* 133.2 (1990), págs. 175-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2121828>.
 - [186] Kenneth W Dunn, Malgorzata M Kamocka y John H McDonald. «A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy». En: *AJP: Cell Physiology* 300.4 (2011), págs. C723-C742. ISSN: 0363-6143. DOI: 10.1152/ajpcell.00462.2010. arXiv: NIHMS150003. URL: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00462.2010><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21209361><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3074624><http://ajpcell.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpcell.00462.2010>.
 - [187] E M M Manders y col. «Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy». En: *Journal of cell science* 103 (Pt 3 (1992), págs. 857-862. ISSN: 0021-9533. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1478975>: {\%}5CUsers{\%}5CIvan{_}2{\%}5CDocuments{\%}5CReadCubeMedia{\%}5CJCellSci-1992-Manders-857-62(1).pdf{\%}5Cn<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1478975>.
-

- [188] Jiangning Song y col. «PROSPER: An Integrated Feature-Based Tool for Predicting Protease Substrate Cleavage Sites». En: *PLoS ONE* 7.11 (2012). Ed. por Narayanaswamy Srinivasan, e50300. ISSN: 19326203. DOI: 10.1371/journal.pone.0050300. URL: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0050300>.
- [189] Ralph Kettritz. «Neutral serine proteases of neutrophils». En: *Immunological Reviews* 273.1 (2016), págs. 232-248. ISSN: 1600065X. DOI: 10.1111/imr.12441.
- [190] George Lominadze y col. «Proteomic analysis of human neutrophil granules.» En: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 4.10 (2005), págs. 1503-21. ISSN: 1535-9476. DOI: 10.1074/mcp.M500143-MCP200. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15985654>.
- [191] Stephan W Lindemann y col. «Neutrophils alter the inflammatory milieu by signal-dependent translation of constitutive messenger RNAs.» En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101.18 (2004), págs. 7076-81. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0401901101. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15118085><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC406468><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=406468&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [192] Amelia J McFarland y col. «Paradoxical role of 3-methyladenine in pyocyanin-induced toxicity in 1321N1 astrocytoma and SH-SY5Y neuroblastoma cells.» En: *International journal of toxicology* 32.3 (), págs. 209-18. ISSN: 1092-874X. DOI: 10.1177/1091581813482146. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23525265>.
- [193] Elke Hoffmann y col. «Multiple control of interleukin-8 gene expression.» En: *Journal of leukocyte biology* 72.5 (2002), págs. 847-55. ISSN: 0741-5400. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429706>.
- [194] Naoki Hagimoto y col. «Induction of interleukin-8 secretion and apoptosis in bronchiolar epithelial cells by Fas ligation». En: *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 21.3 (1999), págs. 436-445. ISSN: 10441549. DOI: 10.1165/ajrcmb.21.3.3397.
- [195] Masako Narita y col. «Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes.» En: *Science (New York, N.Y.)* 332.6032 (2011), págs. 966-70. ISSN: 1095-9203. DOI: 10.1126/science.1205407. arXiv: NIHMS150003. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21512002><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3426290><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3426290&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- [196] A Rubartelli y col. «A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence.» En: *The EMBO journal* 9.5 (1990), págs. 1503-10. ISSN: 0261-4189. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601974. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2328723><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC551842><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=551842{\&}tool=pmcentrez{\&}rendertype=abstract>.
- [197] Cristina Andrei y col. «Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes.» En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101.26 (2004), págs. 9745-50. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0308558101. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15192144><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC470745><http://www.pnas.org/cgi/content/long/101/26/9745>.
- [198] Fabio Bianco y col. «Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia.» En: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174.11 (2005), págs. 7268-77. ISSN: 0022-1767. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15905573>.
- [199] Tatsuya Saitoh y col. «Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production.» En: *Nature* 456.7219 (2008), págs. 264-8. ISSN: 1476-4687. DOI: 10.1038/nature07383. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18849965>.
- [200] James Harris. «Autophagy and cytokines.» En: *Cytokine* 56.2 (2011), págs. 140-4. ISSN: 1096-0023. DOI: 10.1016/j.cyto.2011.08.022. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889357>.
- [201] L. Iula y col. «Autophagy mediates interleukin-1 β secretion in human neutrophils.» En: *Frontiers in Immunology* 9.FEB (2018). ISSN: 16643224. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00269.
- [202] Johan Bylund y col. «Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: How, where, and what for?» En: *Free Radical Biology and Medicine* 49.12 (2010), págs. 1834-1845. ISSN: 08915849. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.016. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.016>.
- [203] Ju Huang y col. «Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases.» En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106.15 (2009), págs. 6226-31. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.0811045106. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2664152{\&}tool=pmcentrez{\&}rendertype=abstract>.

- [204] Michelle E. Maxson y Sergio Grinstein. «The vacuolar-type H-ATPase at a glance - more than a proton pump.» En: *Journal of cell science* 127.Pt 23 (2014), págs. 4987-93. ISSN: 1477-9137. DOI: 10 . 1242 / jcs . 158550. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25453113><http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.158550>.
- [205] Gilman-Sachs A. y col. «Expression and role of a2 vacuolar-ATPase (a2V) in trafficking of human neutrophil granules and exocytosis». En: *Journal of Leukocyte Biology* 97.6 (2015), págs. 1111-1119. ISSN: 1938-3673. DOI: 10 . 1189 / jlb . 3A1214 - 620RR. URL: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord{\&}from=export{\&}id=L604696663{\&}5Cnhttp://dx.doi.org/10.1189/jlb.3A1214-620RR{\&}5Cnhttp://sfx.aub.aau.dk/sfxaub?sid=EMBASE{\&}issn=19383673{\&}id=doi:10.1189/jlb.3A1214-620RR{\&}atitle=Expression+and+role+of+a2+vacuola>.