



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

Estudio comparativo de la expresión y actividad del inflammasoma NLRP3 en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos

Memoria para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico

Felipe Eduardo Tapia Cáceres

Director: Dr. Guillermo Antonio Díaz-Araya
Directora: Pía Boza Fuentes

Patrocinante: Dr. Guillermo Antonio Díaz-Araya

Santiago, Chile 2015

AGRADECIMIENTOS

Los años transcurridos se reflejan en mis pensamientos y los deposito en la gaveta de las experiencias. El velo lentamente pareciera ir cayendo, permitiéndome vislumbrar un anhelado futuro, deseo de cualquier mente inquieta, dispuesta a perseverar por lo que espera. Si bien, entiendo que solo he llegado al principio, soy capaz de comprender la etapa que cierro tras mis pasos. Es por ello, que me es imposible voltear la mirada y contemplar el camino recorrido, sin detenerme en cada una de las personas que de alguna u otra manera, se transformaron en pieza clave en mis tiempos como estudiante. En cuanto a esto, es importante señalar que estaré en deuda eternamente con mi familia, manantial esencial de mi formación valórica y racional. En primer lugar con mi madre, Jacqueline, por sosegar con sus palabras y cuidados las inquietudes que exhalaba a diario. De igual manera con mi padre, Carlos, principal consejero en aquellos tiempos difíciles de manejar por un alma inexperta. Asimismo con mis hermanos: Pamela, Carlos y Constanza, los mosqueteros con quienes crecí y construí un millar de recuerdos. Siempre será menester nombrar a cada uno de ellos y así corresponder en cierta medida a toda la atención, cuidado y amor que me han brindado.

Dentro de este alud de agradecimientos, me corresponde mencionar a mis abuelas, María y Emma, por su inmenso compromiso con mis metas y sueños, haciéndome sentir como un hijo más. Así también, a mis amigos del colegio, Tito y Esteban, por mantener una fiel amistad a pesar de los años y distancia.

Aprovechando esta última alusión dirigida hacia la amistad, no puedo olvidar a mis compañeros y amigos de la universidad; Claudio, Gustavo, María Luisa, Andrea, Pedro, Gonzalo, Daniela, Pablo, Felipe y Yepe.

Por otra parte, quisiera agradecer profundamente a mi profesor y director de tesis, Guillermo Díaz, por la invitación a participar de manera activa en su laboratorio para desarrollar mi tesis. De este modo, pude acercarme a esta hermosa labor que es la investigación y conocer a un grupo de personas que día a día, hicieron que mi trabajo fuese más grato. Por lo tanto, gracias; Diego, Samir, Clodito, Renatto, Rodolfo, Rulo y Samuel.

También, es importante destacar a mi directora de tesis, Pía, por su paciencia y dedicación para guiar cada experimento que realicé. De igual forma a Raúl, ya que sus consejos y experiencia me permitieron continuar con mi trabajo en momentos carentes de resultados.

Finalmente, quisiera dedicar estas últimas palabras a Katherine, el motor de mis acciones y guía benevolente de mis intenciones. A su gran contención frente a aquellas situaciones que sentí escapar de las manos; convirtiéndose muchas veces en el árbol bajo el cual encontré descanso. Por esta e inmensurables razones, doy gracias por los recuerdos que conservo, el presente que disfruto y el futuro que me espera junto a ella.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE GENERAL.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	6
ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	9
SUMMARY.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Tejido cardíaco.....	11
1.2 Fibroblastos cardíacos.....	12
1.3 Diferenciación de FC a MFC.....	13
1.4 Miofibroblastos cardíacos.....	14
1.5 Inflamación en el tejido cardíaco.....	15
1.6 Toll-like receptor (TLRs).....	17
1.7 Inflamasoma.....	18
1.8 Regulación y activación del inflamasoma.....	19
2. HIPÓTESIS.....	24
3. OBJETIVO GENERAL.....	24
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
4.1 Reactivos.....	25
4.2 Obtención y cultivo de fibroblastos cardíacos.....	25
4.3 Obtención y cultivo de miofibroblastos cardíacos.....	26
4.4 Pasaje celular.....	27
4.5 Western blot.....	28
4.6 Ensayo actividad de caspasa-1.....	29
4.7 Ensayo secreción de IL-1 β	29
4.8 Ensayo citotoxicidad.....	29
4.9 Expresión de resultados y análisis estadístico.....	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1 Determinación de la expresión de los componentes del inflamasoma: NLRP3, ASC y procaspasa-1.....	30
5.2 Determinación de los niveles de proIL-1 β y la consecuente secreción de IL- 1 β , en respuesta a un estímulo con LPS+ATP.....	33
5.3 Determinación del nivel de activación del inflamasoma en respuesta a un estímulo con LPS+ATP.....	36
5.4 Citotoxicidad mediada por caspasa-1 debida a la activación por LPS y ATP	38

6. DISCUSIÓN	40
6.1 Señales de activación del inflammasoma NLRP3	40
6.2 Componentes proteicos del inflammasoma NLRP3	41
6.3 Niveles proteicos de proIL-1 β y secreción de IL-1 β	44
6.4 Actividad del inflammasoma NLRP3	46
6.5 Citotoxicidad mediada por caspasa-1 debida a la activación de LPS y ATP	47
.....	
7. CONCLUSIONES	50
8. BIBLIOGRAFÍA	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Expresión de niveles proteicos de procaspasa-1 en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos.....	31
Figura 2. Expresión de niveles proteicos de NLRP3 en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos.....	32
Figura 3. Expresión de niveles proteicos de ASC en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos.....	32
Figura 4. Expresión de niveles proteicos de proIL-1 β en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos.....	34
Figura 5. Secreción de IL-1 β en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos.....	35
Figura 6. Actividad de caspasa-1 en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos.....	37
Figura 7. Citotoxicidad en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos, inducida por LPS y ATP.....	39

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Mecanismos que regulan la secreción de IL-1 β	22
Esquema 2. Inflamasoma NLRP3 en FC y MFC.....	51

Abreviaturas

α -SMA	Alfa-actina de músculo liso
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DMEM F-12	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> fórmula 12
ET-1	Endotelina -1
ELISA	Ensayo inmuno enzimático
FBS	Suero fetal de bovino
FC	Fibroblastos cardíacos
FCN	Fibroblastos cardíacos de ratas neonatas
MFC	Miofibroblastos cardíacos
g	Gramos
GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
h	Hora
HSP	<i>Heat shock proteins</i>
HMGB1	<i>High-mobility group protein B1</i>
IL-1	Interleuquina 1
IL-6	Interleuquina 6
kDa	Kilo Dalton
LDH	Lactato deshidrogenasa
LPS	Lipopolisacárido
LRR	Repeticiones ricas en leucina
mA	Miliamper

MEC	Matriz extracelular
mg	Milígramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteasa
mV	Milivolt
NF-κB	Factor nuclear κB
nM	Nanomolar
PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Tampón fosfato salino
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SEM	Error estándar de la media
SRBP2	<i>Sterol regulatory element-binding protein 2</i>
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Receptor de tipo toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
WB	Western blot

RESUMEN

El inflamasoma NLRP3 es un complejo multiproteico que tiene como objetivo producir la fragmentación de la citoquina pro-inflamatoria, proIL-1 β , a su forma activa IL-1 β , facilitar su secreción al espacio extracelular y, de esta forma, regular y activar el sistema inmune innato. Este complejo está conformado por el receptor NLRP3, la proteína adaptadora ASC y la enzima llamada procaspasa-1. El inflamasoma puede ser encontrado en diversos tipos celulares, incluyendo los fibroblastos cardíacos (FC). Estas células, participan activamente en la homeostasis de la matriz extracelular (MEC) y responden a frente a estímulos patofisiológicos. Entre ellos, a TGF- β 1, el cual promueve la diferenciación de los FC a su forma más activa, los miofibroblastos cardíacos (MFC).

Con la finalidad de conocer las principales diferencias del inflamasoma NLRP3 entre FC y MFC, empleamos diversas metodologías experimentales de carácter analítica.

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias en los niveles proteicos de ASC, NLRP3 y en la secreción de IL-1 β , tanto en FC como en MFC. Sin embargo, tanto los niveles proteicos de procaspasa-1, así como también la actividad de caspasa-1, fueron mayores en MFC respecto de FC. Por otra parte, se observaron mayores niveles proteicos de proIL-1 β en FC, en comparación con los MFC. Finalmente, en base a los resultados obtenidos, se puede concluir que los MFC, presentan mayores niveles de expresión y actividad del inflamasoma NLRP3 que los FC.

SUMMARY

Comparative study of the protein expression and activity of inflammasome NLRP3 in cardiac fibroblast and myofibroblast.

The NLRP3 inflammasome is a multiprotein complex that aims to produce fragmentation of the pro-inflammatory, pro-IL-1 β , cytokine to its active IL-1 β , facilitating its secretion to the extracellular space and, thus, regulating and activating the innate immune system. The complex consists of: NLRP3 receptor, ASC adapter protein and an enzyme called pro-caspase-1. The inflammasome can be found in various cell types, including cardiac fibroblast (FC). These cells are actively involved in the homeostasis of extracellular matrix (ECM) and responds against pathophysiological stimuli, including TGF- β 1, which promotes the differentiation of FC to its active form, cardiac myofibroblast (MFC).

In order to know the NLRP3 inflammasome main differences between FC and MFC, we use various experimental methods of analytical character.

The results showed no difference in protein levels of ASC, NLRP3 and secretion of IL - 1 β , either FC or MFC. However both, protein levels of pro-caspase-1 as well as the activity of caspase-1, were higher in MFC regarding FC. Moreover, higher protein levels of pro- IL- 1 β in FC were observed compared to the MFC. Finally, based on the results obtained, it can be concluded that the MFC, have higher levels of expression and activity of the inflammasome NLRP3 than FC.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tejido Cardíaco

El corazón humano es un órgano muscular clave en el sistema circulatorio, que tiene como principal función bombear la sangre para el aporte y la remoción de gases, nutrientes, hormonas y otras sustancias de los diferentes órganos y tejidos del cuerpo. Esta función regulada por interacciones dinámicas y coordinadas, es llevada a cabo fundamentalmente por dos tipos celulares presentes en el tejido cardíaco: las musculares (cardiomiocitos) y las no musculares (fibroblastos cardíacos (FC), células endoteliales, células musculares lisas vasculares, células nerviosas, células del sistema inmune, etc.). Los primeros, constituyen un tercio de la población total de células cardíacas y son los responsables de otorgar la contractibilidad y fuerza mecánica al corazón. Mientras que los FC, conforman aproximadamente los dos tercios restantes del volumen del tejido miocárdico y son fuente esencial de los componentes de la matriz extracelular (MEC). La MEC, regula la estructura del corazón y, por lo tanto, las señales mecánicas, químicas y eléctricas entre los componentes celulares y no celulares del tejido cardíaco. Los FC, aparte de actuar como reguladores de la MEC, son de vital importancia en los procesos de remodelado cardíaco que ocurren en respuesta a cualquier injuria ocasionada en este tejido. Estos daños provocados, se presentan como consecuencia de cambios fisiopatológicos, tales como la hipertensión, el infarto al miocardio y la insuficiencia cardíaca (1).

Gran parte de las acciones funcionales de los FC, son mediadas a través de su diferenciación a miofibroblastos cardíacos (MFC). Fenotipo celular, capaz de expresar in vitro proteínas contráctiles, incluyendo la alfa actina del músculo liso (α -SMA), además de propiedades secretoras y proliferativas (2).

1.2 Fibroblastos Cardíacos

Durante el desarrollo cardíaco, los fibroblastos se forman a partir de las células progenitoras pluri-potenciales o de células madres de origen mesenquimal (2). En un corazón sano, los FC se encuentran dispuestos en láminas y hebras; asumiendo una morfología celular plana y alargada que se encuentra dentro de la red de colágeno, que forma parte de la estructura del tejido cardíaco. Los FC son las principales células responsables de crear la micro-estructura del tejido, es decir, otorgan la densidad, orientación, grosor y el entrecruzamiento con las fibras de colágeno (3).

Como se mencionó anteriormente, los FC presentan un rol importante en el soporte del tejido cardíaco y, para ello, es necesario mantener un fino balance entre los procesos de síntesis y degradación que sufren las fibras de colágeno. Por tal motivo, con el objeto de alcanzar esta homeostasis en el tejido, los FC producen de forma orquestada una variedad de citoquinas, factores de crecimiento y metaloproteinasas de la matriz (MMPs). Sin embargo, cualquier tipo de injuria ocasionada sobre el tejido cardíaco, produce un desbalance que activa a los FC. Esta activación desencadena, entre otras cosas, la expansión de la red de

colágeno, infiltración de células inmunes e inflamatorias, degradación de la MEC, repoblación de FC y, finalmente, fibrosis cardíaca (4, 5).

En la literatura los FC también se denominan células "centinelas", ya que actúan como sensores, intermediarios y amplificadores de señales de daño, para las células del sistema inmune y cardiomiocitos. Todo esto, a través de la producción de mediadores autocrinos y paracrinos como las citoquinas, factores de crecimiento, prostaglandinas y óxido nítrico (NO) (4, 6).

La liberación de citoquinas por parte de los FC, también se ve alterada en respuesta a los cambios mecánicos de la MEC, con incrementos observados en los factores de crecimiento (TGF- α , TGF- β) y en la endotelina-1 (ET-1) (2). Bajo estas circunstancias, normalmente el FC sale de su estado quiescente y se diferencia a MFC (7). Transición que se correlaciona con un incremento de la secreción de moléculas pro-fibróticas como colágeno y fibronectina (8).

1.3 Diferenciación de FC a MFC

Una vez ocurrida una injuria en el tejido cardíaco, los FC son estimulados de manera mecánica por patrones de activación y, químicamente, mediante mediadores inflamatorios que conllevan a su diferenciación fenotípica, hacia el MFC. Los FC en el tejido normal expresan ciertos marcadores particulares como la vimentina, presente en los filamentos intermedios y el receptor de colágeno discoidina. Por el contrario, este perfil de proteínas cambia dramáticamente en la diferenciación fenotípica, puesto que, en etapas tempranas de diferenciación, se

aprecia un aumento en los niveles de las proteínas de adhesión focal. Esto es un indicio del fenotipo, proto-miofibroblasto, células que exhiben un mayor estrés mecánico. Posteriormente, si este estímulo continúa, ocurre la diferenciación a MFC, caracterizado por la expresión de la proteína α -SMA (9, 10).

En cuanto a los estímulos referidos anteriormente, destacan en este proceso de diferenciación: la acción del factor de crecimiento beta (TGF- β 1), las citoquinas pro-inflamatorias como la proIL-1 β y los cambios mecánicos producidos por la MEC. Aun cuando, todas estas acciones son relevantes, destaca por su importancia en el proceso de diferenciación, el efecto que genera la citoquina TGF- β 1 sobre su receptor de tipo II, ya que gatilla una cascada de señalización que se traduce, finalmente, en un incremento en la producción de colágeno y en la expresión de α -SMA en el nuevo fenotipo celular (11).

1.4 Miofibroblastos Cardíacos

La definición de miofibroblastos está basada por su función contráctil, ya que corresponden a células que combinan características estructurales y funcionales del músculo liso (mio-), producto de la expresión de fibras de estrés contráctiles de actina/miosina, junto con el extenso retículo endoplásmico de los fibroblastos sintéticamente activos (11). Asimismo, son descritos como un fenotipo especializado de fibroblastos activos en respuesta a un estímulo apropiado, comúnmente un daño al miocardio. De manera similar a los FC, los MFC son células no excitables, pero expresan proteínas contráctiles que incluyen: α -SMA,

vimentina y desmina. A su vez, tienen la capacidad de contraer geles de colágeno in vitro (2, 4). Los microfilamentos internos presentes en los MFC, se encuentran conectados a dominios extracelulares de fibronectina, mediante adhesiones especializadas conocidas como adhesiones focales. Estas, permiten a los MFC ejercer una fuerza contráctil alrededor de la MEC.

La liberación de quimioquinas en el sitio dañado es mediada inicialmente por las células del sistema inmune; sin embargo, una vez que se ha iniciado el proceso de reparación tisular, son los mismos MFC, los que liberan más citoquinas y quimioquinas, permitiendo una mayor migración de los FC a dicho lugar. De esta forma, la producción y secreción de citoquinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10 y TNF- α), favorecen una respuesta inflamatoria mantenida frente al daño ocasionado (2). Aunque estos cambios sirven como una importante medida reparativa, a largo tiempo se transforman en una mala adaptación que conduce hacia la acumulación de colágeno, fibrosis y pérdida de la función cardíaca. Esta secuencia de eventos que procede a un temprano estado inflamatorio se conoce como remodelado cardíaco (12).

1.5 Inflamación en el tejido cardíaco

La inflamación se define como el proceso mediante el cual un organismo responde a un daño o infección, activando una serie de componentes propios del sistema inmune innato, entre ellos a los neutrófilos y macrófagos. En cuanto a las fisiopatologías cardiovasculares, el daño tisular generado produce respuestas

inflamatorias de carácter local y sistémico, las cuales en ausencia de patógenos microbiales, se denominan inflamación estéril (13, 14). De manera similar a la inflamación inducida por microorganismos, la inflamación estéril se caracteriza por el reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y la producción de citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas, tal como TNF e IL-1 β (15).

Si bien el proceso inflamatorio mencionado es relevante para la reparación del tejido dañado, cualquier desbalance homeostático producido en este sistema estrictamente controlado, desencadena una respuesta que en el tiempo puede llegar a transformarse en un proceso inflamatorio de carácter crónico. De modo que, la producción de especies radicalarias de oxígeno (ROS), proteasas y factores de crecimiento por neutrófilos y macrófagos, se traduce en la destrucción del tejido cardíaco, una excesiva proliferación celular y, por último, la acumulación excesiva de colágeno que conlleva a fibrosis cardíaca (16).

En el sistema inmune innato, los diversos tipos celulares poseen múltiples familias de receptores de reconocimiento de patrones codificados (PRRs, pattern-recognition receptors), que tienen la capacidad de detectar componentes microbianos conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns), así como señales de daño endógeno (DAMPs, danger-associated molecular patterns). Los PRRs pueden ser divididos en 4 familias distintas: receptores los receptores tipo Toll (TLR, Toll-like receptors), los receptores tipo ácido retinoico-gen inducible I (RLRs), los receptores tipo C lectina (CLR) y los receptores tipo NOD (NLR) (14). De este

grupo de receptores, los que han alcanzado mayor notoriedad por las acciones que ellos regulan son los TLR.

1.6 Toll-like receptors (TLRs)

Los Toll-like receptors (TLRs), comprenden una familia de receptores de transmembrana constituida por 10 miembros (TLR1-TLR10), los cuales contienen en su estructura un dominio extracelular de repeticiones ricas en leucina (LRR, leucine-rich repeat) y un dominio intracelular típico de receptores tipo IL-1 (TIR). Esta familia puede ser dividida en TLRs de superficie (TLR4/MD-2, TLR1, TLR2, TLR6) y TLRs intracelulares (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9). Estos receptores, cumplen un rol fundamental en la detección de las infecciones microbiales, inducción de genes anti-microbiales y el control adaptativo de respuestas inmunes (17).

Los TLRs de superficie son capaces de detectar PAMPs, como las membranas microbiales de lipopolisacárido bacteriano (LPS), lipopéptidos bacteriales (diacilados y triacilados), flagelinas bacteriales y RNA viral de hebra simple y doble. Por otra parte, también pueden detectar ligandos endógenos (DAMPs), liberados desde tejidos dañados, entre los cuales destacan la fibronectina ED-A, HSP60, HSP 70, HMGB1, heparan sulfato, ácido hialurónico, entre otros. Los cuales, inducen estados inflamatorios frente a cuadros no infecciosos (18).

En lo que concierne a la interacción entre los ligandos mencionados anteriormente (endógenos y exógenos) con sus respectivos receptores de TLR, es importante señalar que la activación de estos, produce una respuesta a través de vías de señalización intracelulares, que inducen la expresión de citoquinas y otros mediadores pro-inflamatorios (17). En la expresión de citoquinas inflamatorias, destaca la producción de proIL-1 β y la liberación de su forma activa, IL-1 β . La cual, se produce como consecuencia de la formación y posterior activación, de un complejo proteico conocido como el inflamasoma NLRP3.

1.7 Inflamasoma NLRP3

Los inflamasomas corresponden a complejos multiproteicos que conforman receptores de reconocimiento a determinados patrones moleculares. Estos receptores, se caracterizan por reconocer un amplio rango de PAMPs y DAMPs, siendo su principal función el regular y activar el sistema inmune innato, a través de la activación y secreción de IL-1 β e IL-18, las que se producen como consecuencia de la activación de caspasa-1 (14, 16, 19). La mayoría de los inflamasomas contienen comúnmente un receptor NLR, una proteína de andamiaje ASC y procaspasa-1. NLRP3, es el miembro de la familia de receptores NLR más estudiado y puede ser activado tanto por factores exógenos como endógenos. Asimismo, este receptor contiene un dominio de unión a nucleótidos (NBD, nucleotide binding domain), una repetición rica en leucina en el carboxilo-

terminal (LRR, leucine-rich-repeat) y una repetición de un dominio de piridina (PYD, pyrin domain) (20, 21).

La proteína adaptadora ASC contiene ambos dominios: un dominio CARD para interactuar con caspasa-1 y un dominio PYD, que permite unir las proteínas sensoriales con caspasa-1. Este efector proteico del inflamasoma, es relativamente simple; contiene un dominio de caspasa necesario para la actividad de la proteasa y un dominio CARD que permite su oligomerización (7).

1.8 Regulación y Activación del inflamasoma

La activación del inflamasoma necesita ser muy regulada por el hospedero para evitar una excesiva producción de citoquinas y/o muerte celular. La regulación ocurre a múltiples niveles, tanto transcripcionales como post-transcripcionales. En primer lugar, la expresión de los sensores del inflamasoma, en particular el NLRP3, se encuentra regulada a un nivel transcripcional y, por lo tanto, su expresión es relativamente baja en diversos tipos celulares, requiriendo de un primer estímulo para ser inducida. Este estímulo se denomina señal 1 y puede ser provista por ligandos de otros PRRs como citoquinas y especies radicalarias de oxígeno, entre otras (1, 21). Así también, mecanismos post-transcripcionales regulan la señalización del inflamasoma. Por ejemplo, se podrían expresar proteínas que inhiban caspasa-1 o proteínas que secuestren los componentes del inflamasoma en el citosol (22). Del mismo modo, la localización subcelular de

dichos componentes podrían tener un rol regulatorio en su disponibilidad para el ensamblaje del inflamasoma (21).

En general, el primer estímulo puede incluir cualquier ligando que active vías de señalización que resulten en la activación del factor de transcripción NF- κ B, entre ellos, ligandos para los receptores IL-1R1, TLRs, NLRs, TNFR1 y TNFR2. La activación de NF- κ B es crítica para inducir la expresión y transcripción de proIL-1 β y NLRP3. Normalmente, proIL-1 β no está constitutivamente expresada y los niveles basales de NLRP3, son inadecuados para una eficiente formación del inflamasoma. En cambio, no se requiere de una modulación transcripcional para permitir la activación de los siguientes componentes del sistema del inflamasoma: ASC, procaspasa-1 y proIL-18, ya que se encuentran en concentraciones adecuadas en un estado basal. Sin embargo, la activación del inflamasoma es sólo posible si convergen de forma simultánea, tanto las señales gatilladoras como las de activación. La cinética y extensión de la activación del inflamasoma, mejora notoriamente con un incremento de la disponibilidad de NLRP3 y proIL-1 β (23).

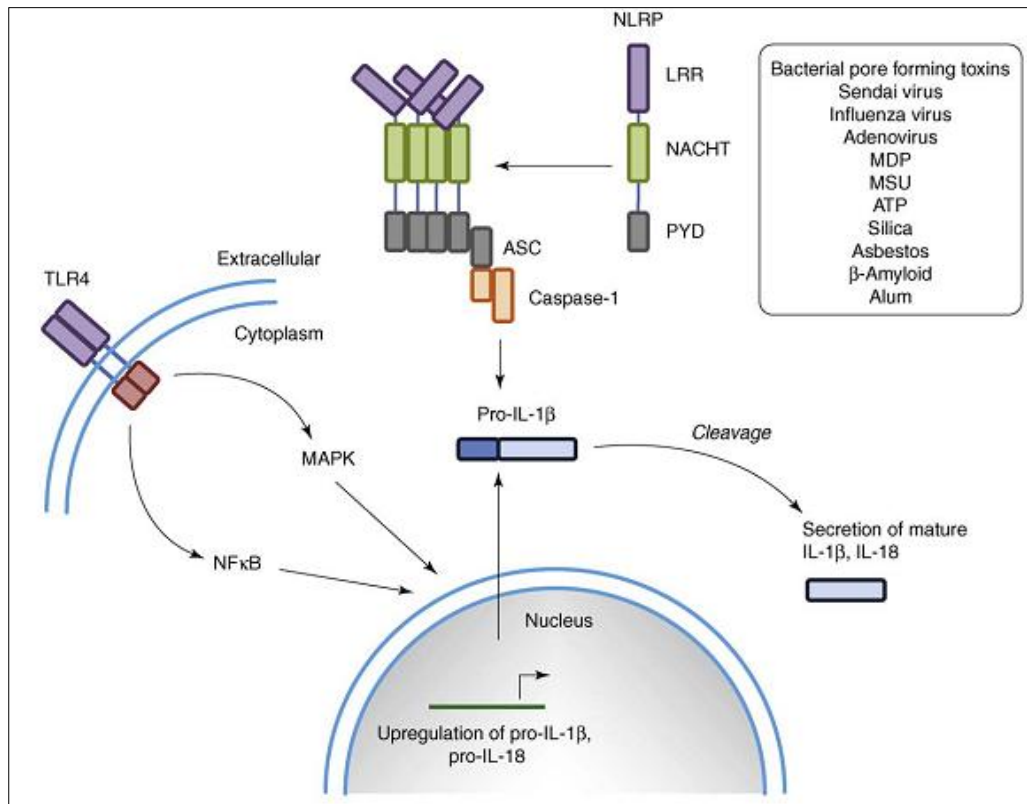
El segundo paso en la activación del inflamasoma NLRP3, es provisto por distintos estimulantes referidos como la señal 2. Estos producen la activación específica de NLRP3 y el ensamblaje del complejo inflamasoma, para culminar finalmente en la activación de caspasa-1 (23). Existe un amplio espectro de estimuladores que inducen la formación del inflamasoma: PAMPs (bacterias, virus, etc.), DAMPs y partículas del medio ambiente (21). Con respecto a los DAMPs, se ha demostrado que el ATP se relaciona con células dañadas en diversas

condiciones de injurias tisulares, como la necrosis (24). Por lo tanto, el ATP es un indicador de la integridad de un tejido y puede instigar una inflamación estéril a través del inflamasoma NLRP3.

En resumen, la activación del inflamasoma consta de dos señales, las cuales desencadenan las siguientes respuestas:

- La primera señal conduce a una sobreexpresión de NLRP3 y la producción de citoquinas como la proIL-1 β , vía activación NF- κ B.
- La segunda señal se traduce en la oligomerización de NLRP3, seguida del reclutamiento de ASC. Posteriormente, ASC recluta a procaspasa-1.

Finalmente, cuando varias procaspasas se encuentran juntas, se cortan entre ellas, formando la caspasa-1 activa. Esta última, es capaz de escindir la pro IL-1 β y proIL-18 en sus formas biológicamente activas, IL-1 β e IL-18, respectivamente (20). Además, de actuar sobre las citoquinas proIL-1 β y proIL-18, la caspasa-1 es requerida para la piroptosis, una forma de muerte celular frecuentemente observada durante una infección microbial, que combina características de apoptosis (fragmentación ADN) y necrosis (liberación de citoquinas e inflamación) (21). Los mecanismos de activación del inflamasoma y la posterior liberación de IL-1 β , señalados con anterioridad pueden ser observados en el esquema 1.



Esquema 1: Mecanismos que regulan la secreción de IL-1β.

Los resultados obtenidos por Kawaguchi *et al.* (25) y Sandanger *et al.* (26), en modelos de isquemia/reperfusión (I/R), el inflamasoma NLRP3, es activado en FC y cumple un rol fundamental en las respuestas inflamatorias y el daño posterior, ocasionado tras una injuria en el tejido cardíaco. Por tal motivo, estos autores sitúan al inflamasoma NLRP3 en el FC, como un potencial blanco terapéutico para disminuir el daño generado luego de un evento cardíaco (I/R). Si bien, el Inflamasoma NLRP3, ha sido ampliamente estudiado en células del tejido cardíaco y, específicamente en FC, hasta el momento no existen estudios comparativos acerca de la expresión de los niveles proteicos y la actividad de dicho inflamasoma entre FC y, su fenotipo activado, los MFC.

La importancia en determinar las posibles disimilitudes con respecto al inflammasoma NLRP3 entre ambos fenotipos celulares, radica en el hecho de generar el conocimiento necesario para comprender de mejor manera, el funcionamiento y la acción de este complejo multiproteico, durante el proceso inflamatorio y reparativo. Puesto que, las etapas tempranas de la inflamación, son mediadas principalmente por los FC; mientras que, las etapas tardías de este proceso, específicamente el proceso reparativo que es de carácter pro-fibrótico, son conducidas por los MFC.

En base a los antecedentes expuestos anteriormente y luego de su análisis exhaustivo, es posible formular la siguiente hipótesis:

2. HIPÓTESIS

"Los miofibroblastos cardíacos tienen mayores niveles de expresión y actividad del inflammasoma NLRP3 que los fibroblastos cardíacos."

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de expresión de los componentes del inflammasoma, su actividad y el procesamiento de la proIL-1 β en FC y MFC.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar la expresión de los componentes del inflammasoma: NLRP3, ASC y procaspasa-1 tanto en FC como en MFC.

- b) Determinar los niveles de proIL-1 β y la consecuente secreción de IL-1 β en respuesta a un estímulo con LPS en FC y MFC.

- c) Determinar el nivel de activación del inflammasoma en respuesta a un estímulo con ATP en FC y MFC.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): anti-GAPDH, anti- α -SMA, anti-rabbit. Todos los medios de cultivo, suero fetal bovino (FBS) y tripsina-EDTA se adquirieron a Gibco BRL (Carlsbad, EEUU). Los anticuerpos: NLRP3, ASC, procaspasa-1 y anti-goat, fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnology (Dallas, EEUU). El anticuerpo de proIL-1 β fue adquirido en Merck Millipore (California, EEUU). Los compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania). LPS fue adquirido en Invivogen (San Diego, EEUU). El material de plástico estéril para la obtención y cultivos celulares se obtuvo en Falcon (Ballerica, Ca, USA).

4.2 Obtención y cultivo de fibroblastos cardíacos

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley neonatas de 2 a 3 días de edad para obtención de cultivo de fibroblastos cardíacos neonatos (FCN). Los animales fueron adquiridos desde el bioterio de la Universidad de Chile, en cumplimiento de las normas éticas referidas a la utilización de animales, contando además con la aprobación del comité de ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Para obtención de FCN, se utilizó el procedimiento descrito por Vivar *et al.* (27), el cual describe la obtención de FCN por medio de la separación de estas células de los cardiomiocitos, mediante la adhesión diferencial de estos últimos en las placas de cultivo. Brevemente, las ratas se decapitaron e inmediatamente se les removió el corazón bajo condiciones de asepsia, luego se retiraron las aurículas, y los ventrículos se cortaron en pequeños fragmentos para aumentar la superficie de contacto con la solución de digestión, formada en base a pancreatina y colagenasa II. El producto de las digestiones se sometió a un pre-plaqueo de 2 h a 37° C en medio de cultivo conteniendo 5 % FBS y 10 % FCS en placas para cultivo de plástico. Por adhesión diferencial a la placa de cultivo se separaron fibroblastos de cardiomiocitos. Transcurridas las 2 h, se cambió el medio por DMEM-F12 + 10 % FBS, y los fibroblastos se dejaron proliferar hasta confluencia. Las placas de cultivo con los fibroblastos se dejaron durante 3 días; luego se removían las impurezas, restos celulares y células no adheridas mediante la utilización de Buffer Fosfato Salino (PBS), para luego agregar un nuevo medio DMEM-F12 + 10% FBS.

4.3 Obtención y cultivo de miofibroblastos cardíacos

Para obtener los miofibroblastos cardíacos, se utilizaron FCN, en pasaje 1, posteriormente, estos fueron estimulados con TGF- β 1 (5ng/mL) e incubados durante 96 horas en medio de mantención (DMEM-F12).

4.4 Pasaje celular

Para la determinación de todos los experimentos realizados. Las células se mantuvieron en pasaje 0 (p0), en medio DMEM-F12 suplementado con 10% FBS, hasta alcanzar confluencia del 100%. Posteriormente, los FC se soltaron con tripsina 0,1% en PBS 1X estéril y fueron contados por el método de exclusión de azul de tripán. Enseguida, se procedió a sembrar los FC en placas plásticas de cultivo celular de acuerdo al número de células deseado. Por lo tanto, en el caso de la obtención de la expresión de los componentes del inflammasoma NLRP3, los niveles proteicos de proIL-1 β y, la consecuente secreción de IL-1 β , se emplearon placas de cultivo celular de 60 mm, a una concentración de 280.000 células/cm³ en medio DMEM F-12, suplementado con FBS 10% (pasaje 1). En cambio, los MFC se mantuvieron en pasaje 1 (p1), en medio DMEM-F12 suplementado con 10% FBS, hasta alcanzar confluencia del 100%. Finalmente, se realizó el mismo procedimiento seguido con los FC.

En la determinación de la actividad de casapasa-1 y el ensayo de citotoxicidad; se sembraron FC y MFC en placas de cultivo celular de 35 mm, a una concentración de 150.000 células/cm³, en medio DMEM F-12, suplementado con FBS 10%.

Luego de que las células se encontraron adheridas al plástico de las placas, fueron lavadas con PBS 1X estéril y mantenidas en medio DMEM F-12, hasta la realización del experimento.

4.5 Western blot (WB)

Los extractos proteicos obtenidos de la lisis celular de los FC y MFC fueron cuantificados empleando el método de Bradford y luego fueron sometidos a electroforesis en geles de acrilamida/bisacrilamida al 8%-10% para la separación y resolución de las proteínas conforme a su masa. El gel concentrador (stacking) fue de 5%. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 100 Volts en tampón de electroforesis 1X hasta migración completa. Luego, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con poro de 0,2 μm manteniendo constante el amperaje (350 mAmpere) durante 90 minutos, en tampón de transferencia. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en TBS-Tween.

Finalmente, las membranas de nitrocelulosa se incubaron con anticuerpos primarios anti proIL-1 β (1:500), anti NLRP3 (1:200), anti ASC (1:200), anti caspasa-1 (1:200), anti α -SMA (1:5.000) y anti β -GAPDH (1:10.000) durante toda la noche, a 4°C con agitación suave. Transcurrido el tiempo fueron lavadas con TBS-Tween e incubadas con anticuerpo secundario (anti rabbit o anti goat). Para la detección de la actividad enzimática, se utilizó un método quimio luminiscente de ECL.

4.6 Ensayo de actividad de caspasa-1

La actividad de caspasa-1 se midió a través de un ensayo fluorométrico, empleando un kit comercial (Casapase 1 Assay Kit, ab39412, abcam).

4.7 Ensayo de secreción de IL-1 β

Los niveles de secreción de IL-1 β se obtuvieron mediante un kit comercial de ELISA (Quantikine ELISA, RLB00, R&D Systems)

4.8 Ensayo citotoxicidad

La citotoxicidad por activación de caspasa-1 fue obtenida a través de la determinación de LDH, de acuerdo a las instrucciones descritas en un kit comercial de LDH (Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit, 88953, Thermo Scientific).

4.9 Expresión de resultados y análisis estadístico

Los resultados mostrados se obtuvieron mediante el promedio \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes ($n \geq 3$). Los datos obtenidos fueron analizados por ANOVA y prueba Tuckey, lo que permitió determinar la significancia estadística de los resultados, considerándose significativa la diferencia entre dos grupos cuando su valor de p fue menor a 0.05.

5. RESULTADOS

5.1 Determinación de la expresión de los componentes del inflammasoma: NLRP3, ASC y procaspasa-1.

Para determinar cada componente del inflammasoma NLRP3, se estimularon FC y MFC con LPS (1 $\mu\text{g/mL}$), durante 8 horas. Este tiempo fue escogido de acuerdo a resultados obtenidos previamente por nuestro laboratorio, los cuales demostraron que a las 8 horas de estímulo con LPS, se lograba la mayor expresión de los niveles proteicos de proIL-1 β en FC. Posteriormente, las células fueron lisadas con tampón de lisis para identificar los componentes del inflammasoma por el método de WB.

Las imágenes enmarcadas en el extremo superior de cada figura, corresponden a una fotografía representativa del WB de las proteínas en estudio y abajo, su respectivo análisis gráfico y cuantificación.

Los resultados logrados señalaron mayores niveles basales de procaspasa-1 en MFC que en FC (0,5 veces mayor, aproximadamente). No obstante, en ambos fenotipos celulares no se apreció un aumento de los niveles proteicos de procaspasa-1, al estimular por 8 horas con LPS (Figura 1). Como control de diferenciación celular, se utilizó α -SMA. El WB de esta proteína, muestra un notorio aumento para el caso de los MFC, lo cual nos permite asegurar la presencia de este fenotipo celular. En cuanto al análisis realizado para las proteínas ASC y NLRP3, los resultados no mostraron diferencias,

estadísticamente significativas, entre ambos tipos celulares. De igual manera, no hubo cambios en sus niveles proteicos frente al estímulo con LPS (Figura 2).

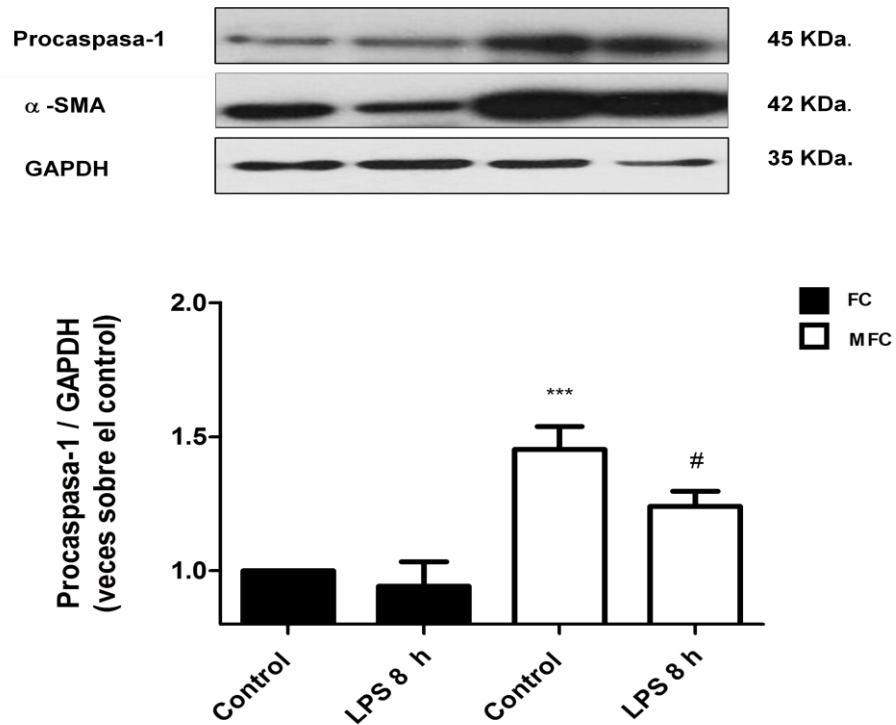


Fig 1. Expresión de niveles proteicos de procaspasa-1 en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos. Se estimularon FC y MFC durante 8 horas con LPS. Los niveles de procaspasa-1 y de α -SMA se midieron por WB. Como control de carga se utilizó GAPDH. *** $p < 0,001$ vs control (FC); # $p < 0,05$ vs LPS 8 h (FC). Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. (n=5).

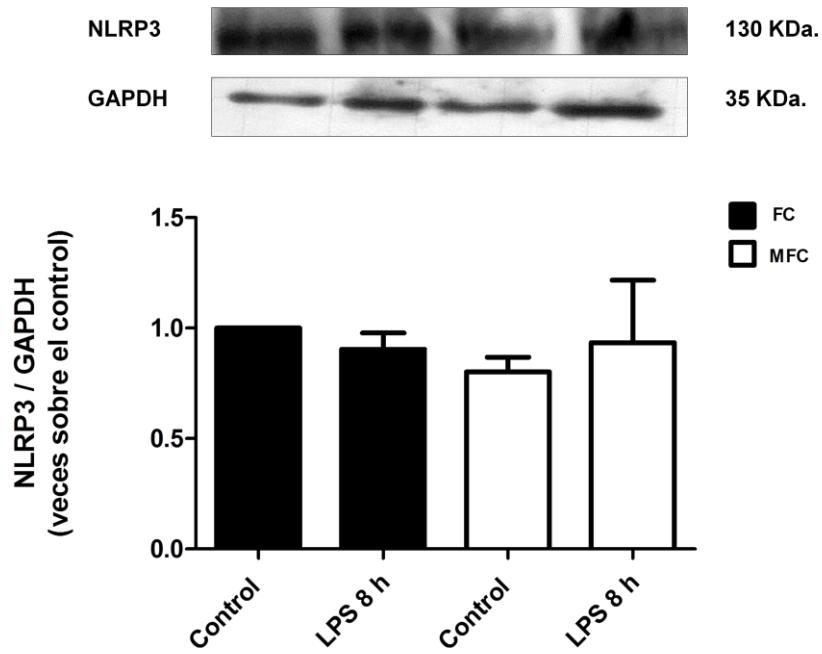


Fig 2. Expresión de niveles proteicos de NLRP3 en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos. Se estimularon FC y MFC durante 8 horas con LPS. Los niveles de NLRP3 se midieron por WB. Como control de carga se utilizó GAPDH. (n=3).

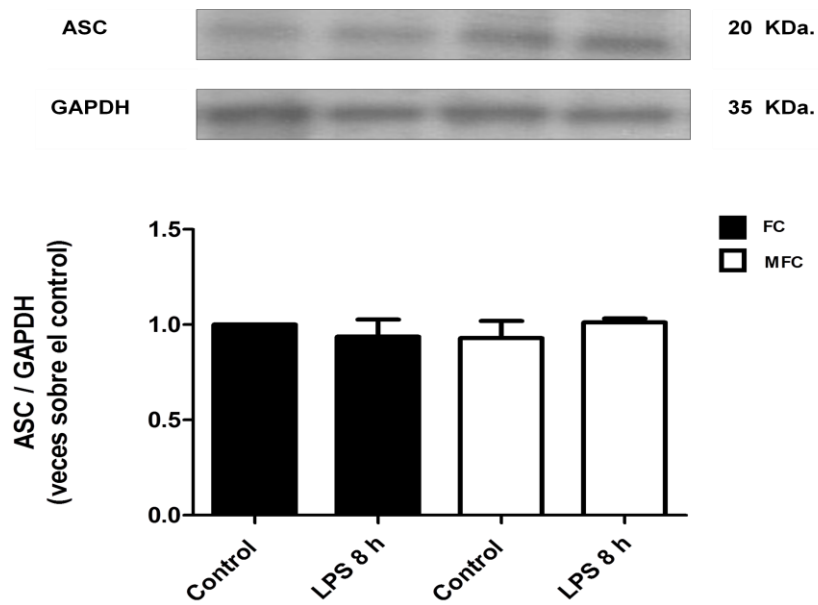


Fig 3. Expresión de niveles proteicos de ASC en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos. Se estimularon FC y MFC durante 8 horas con LPS. Los niveles de ASC se midieron por WB. Como control de carga se utilizó GAPDH. No se obtuvieron resultados estadísticamente significativos. (n=3).

5.2 Determinación de los niveles de proIL-1 β y la consecuente secreción de IL-1 β en respuesta a un estímulo con LPS+ATP.

Con la finalidad de determinar la expresión de los niveles proteicos de proIL-1 β , los FC y MFC fueron estimulados con LPS (1 μ g/mL). Luego, las células se mantuvieron en un medio de DMEM-F12 durante 8 horas y, a continuación, se rasparon las placas que contenían las células con tampón de lisis para identificar la proteína deseada mediante WB.

Una vez realizado el análisis estadístico pertinente, fue posible corroborar que los FC presentaron mayores niveles basales de proIL-1 β en comparación con los MFC (0,8 veces mayor, aproximadamente). Asimismo, frente a un estímulo con LPS, tanto los FC como los MFC, aumentaron al doble sus niveles proteicos de proIL-1 β (Figura 4), aunque los niveles siguen siendo mayores en los FC.

En la figura 5, podemos observar la cuantificación de la secreción de IL-1 β , determinada a través de un kit de ELISA. Para ello, se destinaron placas de ambos fenotipos celulares, para ser incubadas con LPS (1 μ g/mL) por 8 horas. Posteriormente, para activar el inflamasoma, se estimuló con ATP (3mM) por 16 horas (24 horas de estímulo total). El resto corresponde a los controles de LPS y ATP.

Los resultados mostraron secreción de IL-1 β tanto en FC (Figura 5a) como en MFC (Figura 5b), en aquellas células que fueron estimuladas empleando LPS y ATP en conjunto. Por otra parte, el LPS y ATP utilizados individualmente en ambos fenotipos celulares, no indujeron secreción de IL-1 β . Finalmente, cabe

señalar que los niveles basales de IL-1 β secretados entre FC y MFC no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Figura c). Asimismo, se observa un aumento similar de esta citoquina al emplear conjuntamente LPS y ATP (un aumento de 1,0 veces sobre el control).

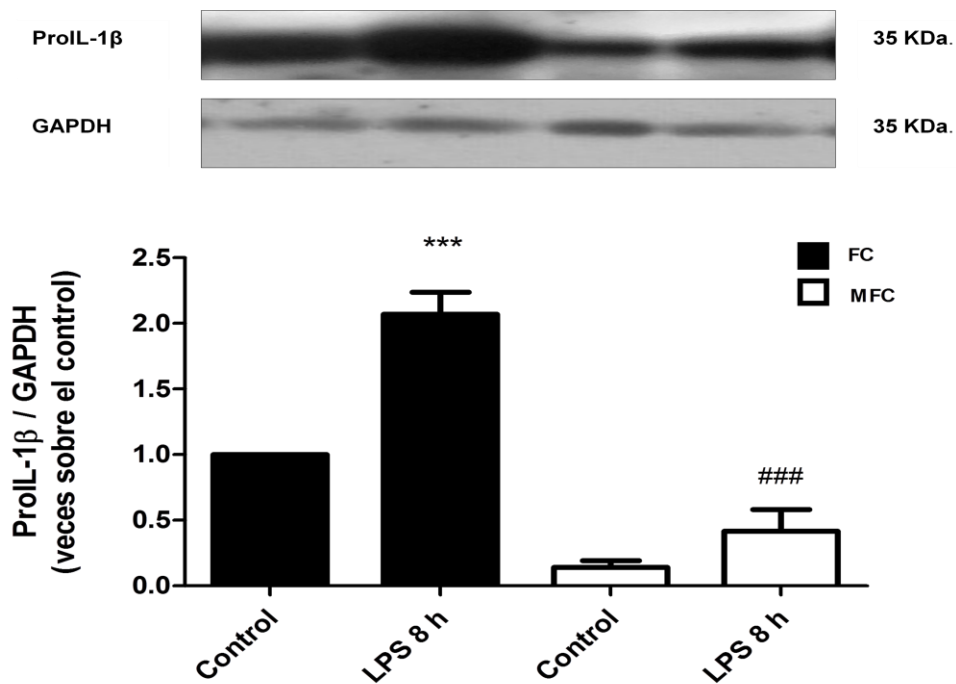


Fig 4. Expresión de niveles proteicos de proIL-1 β en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos. Se estimularon FC y MFC durante 8 horas con LPS. Los niveles de proIL-1 β se midieron por WB. Como control de carga se utilizó GAPDH. *** $p < 0,001$ vs control FC; ### $p < 0,001$ vs control MFC. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. (n=5).

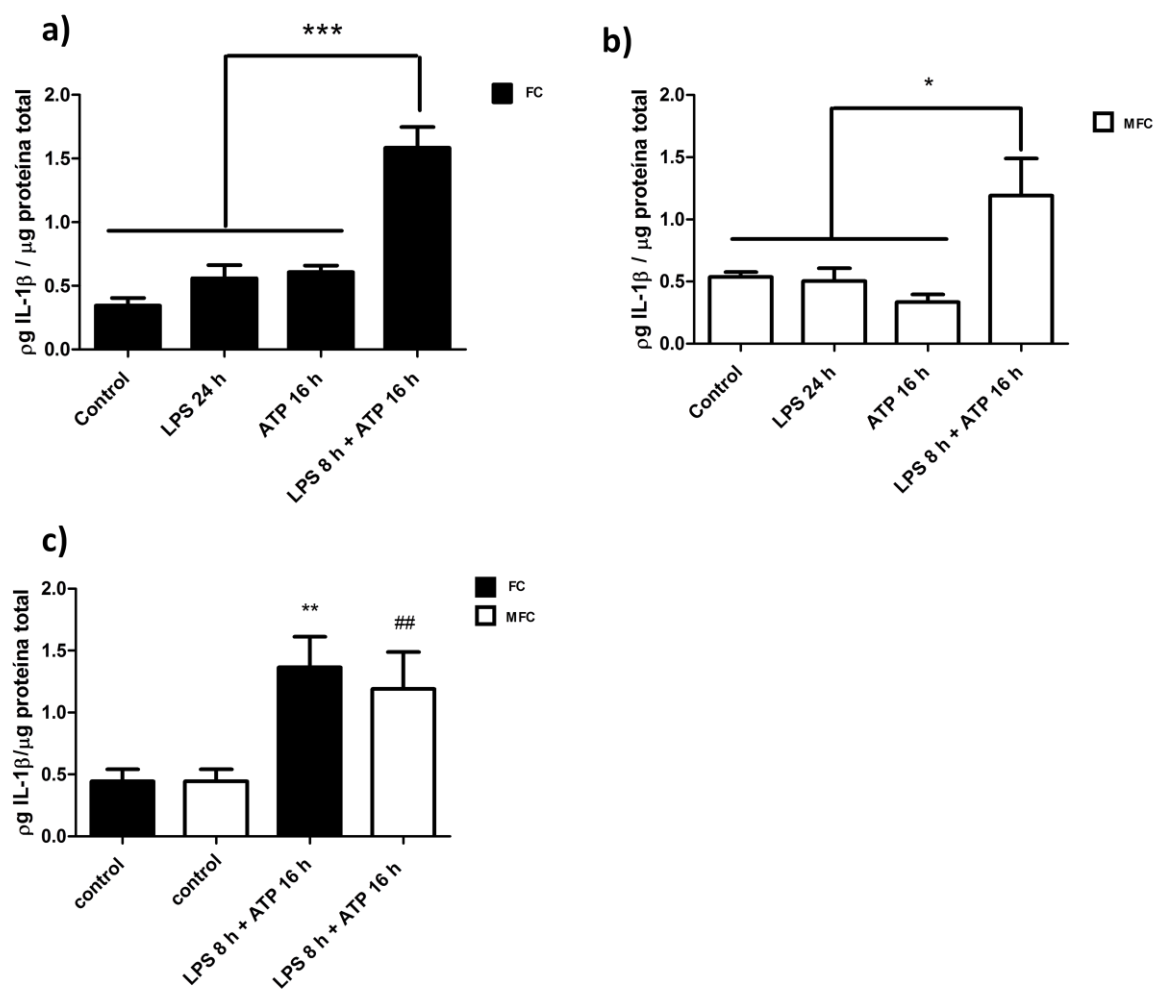


Fig 5. Secreción de IL-1 β en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos. Se estimularon FC y MFC durante 24 horas con LPS; 16 horas con ATP; 8 horas con LPS + 16 horas con ATP. Los niveles de IL-1 β se midieron por un kit de ELISA. Los resultados se expresan como promedio \pm D.S **a) Secreción de IL-1 β en fibroblastos cardíacos.***** p<0,001 vs LPS 8 h + ATP 16 h. (n=5) **b) Secreción de IL-1 β en miofibroblastos cardíacos.** *p<0,05 vs LPS 8 h + ATP 16 h (n=5). **c) Comparación de la secreción de IL-1 β entre fibroblastos y miofibroblastos cardíacos.** * p<0,05 vs LPS 24 h (FC); # p<0,05 vs LPS 24 h (MFC). (n=5).

5.3 Determinación del nivel de activación del inflamasoma en respuesta a un estímulo con LPS+ATP.

La activación del inflamasoma NLRP3 fue determinado en base a la actividad de caspasa-1. Siguiendo la metodología para medir la secreción de IL-1 β , se estimularon los FC y MFC con LPS por 8 horas y sobre estas mismas placas, se realizó un estímulo con ATP por 16 horas; alcanzándose un tiempo total de 24 horas. La actividad de caspasa-1 se cuantificó a través de un ensayo fluorimétrico.

Los resultados de la Figura 6, mostraron mayores niveles de fluorescencia en los MFC que en FC, los cuales se condicen con una mayor actividad de caspasa-1. No obstante, es importante especificar que estas diferencias sólo fueron observadas en el caso de las células estimuladas con LPS y ATP en conjunto, ya que en los respectivos controles con LPS por 24 horas, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos fenotipos celulares.

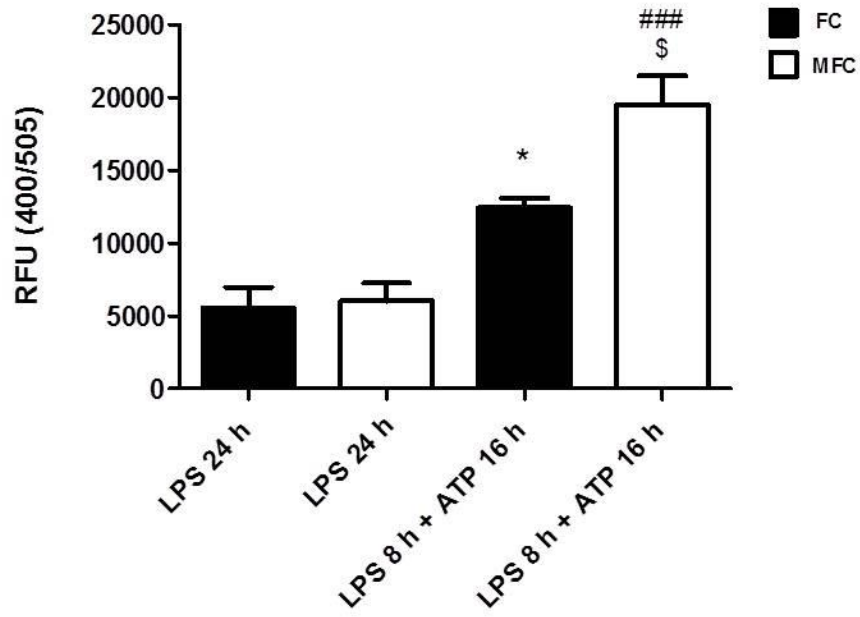


Fig 6. Actividad de caspasa-1 en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos: Se estimularon FC y MFC durante 24 horas con LPS; 8 horas con LPS + 16 horas con ATP. La actividad de caspasa-1 se midió por fluorimetría, utilizando un kit de caspasa-1. ### $p < 0,001$ vs control (MFC); * $p < 0,05$ vs control (FC); \$ $p < 0,05$ vs LPS 8 h + ATP 16 h. Los resultados se expresan como promedio \pm D.S. (n=5).

5.4 Citotoxicidad mediada por caspasa-1 debida a la activación por LPS y ATP

El nivel de citotoxicidad producido sobre las células por los estímulos empleados en cada experimento, fue medido a través de un kit para cuantificar la LDH liberada al medio de cultivo, debido a que esta enzima citosólica es liberada al medio extracelular cuando las membranas celulares se encuentran dañadas. Es un buen método para medir la disrupción de la membrana plasmática.

Se utilizó el régimen de estímulos realizados anteriormente para la determinación de la secreción de IL-1 β y la actividad de caspasa-1.

El análisis estadístico mostró porcentajes muy bajos de citotoxicidad por parte de los agentes empleados (LPS y ATP), a las concentraciones utilizadas tanto en FC como en MFC respecto de la condición control (Figura 7). Como control positivo se empleó la cuantificación de LDH, en una condición de liberación total de LDH por un estímulo de lisis celular señalada en un comienzo. Por otra parte, los resultados mostraron un aumento no significativo en el caso de los MFC.

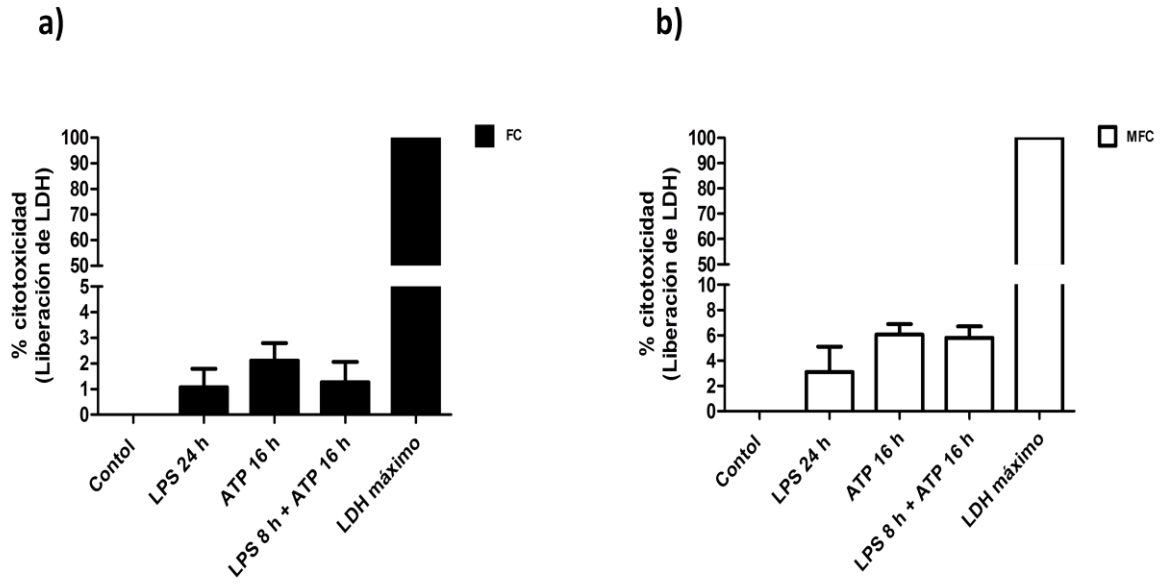


Fig 7. Citotoxicidad en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos, inducida por LPS y ATP: Se estimularon FC (Figura a) y MFC (Figura b), durante 24 horas con LPS; 16 horas con ATP; 8 horas con LPS + 16 horas con ATP. Ambos gráficos presentan como control positivo una condición de liberación total de LDH (LDH máximo). El porcentaje de citotoxicidad se obtuvo a partir de un kit de LDH. (n=4).

6. DISCUSIÓN

Los principales hallazgos de esta investigación dan cuenta que el fenotipo celular FC presenta mayores niveles intracelulares de proIL-1 β , mientras que el MFC tiene mayores niveles proteicos de procaspasa-1 y al mismo tiempo, mayor actividad de la caspasa-1, respecto del FC; lo anterior es consecuente con una mayor actividad del complejo inflammasoma NLRP3 en MFC. Estos resultados son consistentes al comparar la secreción de IL-1 β en ambos fenotipos celulares; entre los cuales no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, a pesar de que los FC mostraran elevados niveles de proL-1 β .

6.1 Señales de activación del inflammasoma

Según lo mencionado en la introducción de esta tesis, para que el inflammasoma sea activado y se ensamble, es necesaria la participación de dos señales. La primera de ellas, incluye la activación de la vía NF- κ B que se traduce posteriormente, en la sobreexpresión del receptor NLRP3 y de la citoquina pro-inflamatoria proIL-1 β (23). Por otra parte, la segunda señal se encuentra relacionada con la activación propiamente tal del receptor NLRP3, la formación del inflammasoma y el consecuente procesamiento, de la proIL-1 β a su forma activa, IL-1 β (28).

Por tales motivos, se tomó la decisión de emplear un componente molecular asociado a patógenos, LPS, para activar los receptores de tipo TLR4 (efecto

descrito en trabajos previos de nuestro laboratorio), actuando de esta forma como la primera señal de activación del inflamasoma NLRP3 (29). Asimismo, se utilizó ATP como segunda señal, capaz de iniciar de manera indirecta la activación del inflamasoma (30).

6.2 Componentes proteicos del inflamasoma NLRP3

Los hallazgos encontrados al estudiar los niveles proteicos de los componentes del inflamasoma NLRP3, no reflejan cambios frente a un estímulo con LPS. Con respecto a las otras proteínas que conforman el inflamasoma, la proteína adaptadora ASC no mostró cambios en sus niveles basales, ni tampoco al ser estimulada con LPS. Esto da cuenta de que ambas proteínas se encuentran expresadas de manera constitutiva en ambos fenotipos celulares y no necesitan de un primer estímulo que induzca su transcripción para formar el complejo del inflamasoma (28). Los niveles basales de NLRP3 no expresan diferencias estadísticamente significativas entre FC y MFC. Así también, no se observaron cambios en los niveles proteicos del receptor al estimular ambos fenotipos celulares con LPS. Este último resultado, se contrapone a la información encontrada en la literatura, la cual señala que el receptor NLRP3, requiere de una primera señal que induzca su transcripción en el núcleo. Puesto que, de esta manera ocurre una sobreexpresión del receptor en el citosol y disminuye el umbral de activación del inflamasoma NLRP3. Luego, una segunda señal, permite la activación y posterior formación del inflamasoma (22, 31). De acuerdo a lo

mencionado anteriormente, es importante mencionar que el tiempo de estímulo escogido (8 horas con LPS) se adecuó a la evidencia encontrada en trabajos previos de nuestro laboratorio y, también, según lo apreciado en otras publicaciones (32, 33). Por ejemplo, Zhang et al. (32), determinaron que a partir de las 4 horas de estímulo con LPS en FC de ratón, es posible observar un aumento en los niveles intracelulares de NLRP3 con respecto a su control. Igualmente, Sandanger et al. (26), demostraron a través de la cuantificación de los niveles de mRNA de NLRP3 en FC de ratón, que a las dos horas de estímulo con LPS es posible inducir la expresión de este receptor. Por lo tanto, será necesario estudiar si otros estímulos que han demostrado inducir un aumento en la expresión de NLRP3, en otros tipos celulares, podrían también conducir a un aumento en los FC. De igual forma, se deberá analizar la posibilidad de aumentar los tiempos de estímulos y, de esta manera, determinar si la inducción de la expresión del receptor NLRP3 se observa a tiempos más tardíos.

En base a los análisis de los resultados planteados, es posible afirmar que la proteína adaptadora ASC se encuentra de manera constitutiva en las células y, por consiguiente, no varían sus niveles de expresión proteica frente a un estímulo con LPS. Así también, la expresión del receptor NLRP3 no mostró cambio alguno.

Finalmente, se determinó que los MFC presentan mayores niveles basales de procaspasa-1, lo cual da pie para suponer que el inflamasoma NLRP3 tendría una mayor actividad en este fenotipo celular. Además, solo fue posible determinar mayores niveles basales de procaspasa-1 en MFC respecto de FC.

El hecho de que los MFC mostraran mayores niveles basales de procaspasa-1, va de acuerdo a lo que sería propio de una célula fenotípicamente activa. De esta forma, los mayores niveles proteicos de procaspasa-1, se condicen con una capacidad superior de escindir la proIL-1 β y, con ello, mantener la respuesta inflamatoria en el tiempo (11, 19, 34). Teniendo presente que los niveles proteicos de proIL-1 β son menores en los MFC respecto de los FC, tanto en condiciones basales como frente al estímulo con LPS y, que la secreción de IL-1 β , es prácticamente la misma entre ambos tipos celulares, es posible sugerir que la mayor actividad del inflamasoma NLRP3 en los MFC, podría conducir a una fragmentación total de proIL-1 β . A su vez, la menor actividad del inflamasoma en los FC reflejada en una menor actividad de la caspasa-1, podría sugerir una menor secreción de IL-1 β . Sin embargo, en los FC al haber mayor sustrato (mayores niveles intracelulares de proIL-1 β), la fragmentación y secreción podrían ser más altos y con ello ser similares entre ambos tipos celulares. No obstante, es necesario realizar otros experimentos para corroborar esta hipótesis, debido a que el FC podría presentar una cinética aumentada en cuanto a la degradación de la proIL-1 β , en comparación con los MFC. Situación que justificaría el hecho de que ambos fenotipos celulares, presenten un perfil de secreción de IL-1 β similar.

6.3 Niveles proteicos de proIL-1 β y secreción de IL-1 β .

De acuerdo a los resultados logrados por WB para evaluar los niveles proteicos de proIL-1 β en FC y MFC, es posible determinar que los FC presentan mayores niveles basales de proIL-1 β , en comparación con los MFC. De igual manera, esta diferencia se aprecia en mayor medida al comparar ambos tipos celulares frente a un estímulo con LPS.

Los FC son células que juegan un rol fundamental en los procesos inflamatorios, luego de ocurrida una injuria en el tejido cardiaco. Principalmente debido a que presentan la capacidad de actuar como "centinelas" y detectar una gran variedad de señales de daño, produciendo como respuesta la liberación y regulación de citoquinas pro-inflamatorias (35). Por ello, es de esperar que este fenotipo celular presente mayores niveles proteicos en un estado basal y más aún, frente a un estímulo con LPS. Por otra parte, la diferenciación de los FC a MFC, va acompañada de un aumento en la expresión del TLR4, de esta forma uno podría esperar que consecuencia de la activación de este receptor se produjeran mayores niveles de proIL-1 β , lo que guarda relación con etapas más tardías del proceso inflamatorio que se caracterizan por la liberación de citoquinas, migración de FC al sitio dañado y, en consecuencia, una prolongación del estado inflamatorio (5). También, cabe mencionar que la diferenciación de un fenotipo celular a otro, trae como consecuencia cambios proteicos estructurales importantes, así como también, una mayor expresión de ciertas citoquinas como el TGF- β (5). Por lo tanto, la menor expresión de proIL-1 β en MFC, se podría explicar por un aumento

en la expresión de TGF- β , puesto que se ha demostrado el efecto antagónico de esta citoquina sobre la expresión de los niveles proteicos de proIL-1 β (36).

Si bien los FC mostraron mayores niveles proteicos de proIL-1 β , tanto en condiciones basales, como frente a un estímulo con LPS, es interesante mencionar que, tanto los FC como los MFC no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sus niveles secretados de IL-1 β , tanto en condición basal como en aquella inducida por LPS+ATP. Por otro lado, los resultados a su vez señalan que LPS y ATP por sí mismos, no son capaces de inducir un aumento en la secreción de IL-1 β . En este sentido, existen estudios que comparten estos resultados, Satoh *et al.* (19), señala la necesidad de ambas señales para inducir la secreción de IL-1 β .

En lo que respecta la secreción de IL-1 β , luego de un estímulo empleando LPS y ATP en conjunto por 24 horas. Los niveles de IL-1 β secretada, mostraron una igualdad entre FC y MFC. Esto podría implicar que los MFC presentan un proceso mejor orquestado de secreción de IL-1 β . Sin embargo, como ya fue referido, no es posible realizar una afirmación sin antes tener en cuenta otros factores; como la cinética de degradación de proIL-1 β en ambos fenotipos celulares.

6.4 Actividad del inflamasoma NLRP3

La etapa final de la activación del inflamasoma NLRP3 conlleva al auto-corte de la procaspasa-1, en su forma activa, caspasa-1. Seguidamente, esta proteína, que se encuentra en niveles elevados tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, escinde la proIL-1 β a IL-1 β (37). Por tal motivo, la actividad del inflamasoma es medida a través de la proteína efectora de su complejo, la caspasa-1. Por consiguiente, esta actividad se determinó a través de ensayos fluorimétricos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los MFC presentaron una mayor actividad de casapasa-1 en comparación con los FC. Esta diferencia fue observada en el caso del estímulo en conjunto de LPS y ATP, ya que el LPS por sí sólo no fue capaz de inducir el aumento de la actividad de caspasa-1. Lo cual podría sugerir, al igual que lo planteado para la secreción de IL-1 β , la necesidad de ambas señales de activación, para provocar un aumento de la actividad del inflamasoma NLRP3.

Por último, cabe mencionar que la mayor actividad de caspasa-1, se condice con los elevados niveles de procaspasa-1 encontrados en MFC.

6.5 Citotoxicidad mediada por caspasa-1 debida a la activación de LPS y ATP

Al realizar un estímulo es importante tener en consideración que el compuesto utilizado para dicha acción, no debe producir citotoxicidad. Al mismo tiempo, es importante evaluar si producto del aumento de la actividad de la caspasa-1 (inducida por LPS + ATP), se produce muerte celular por piroptosis. Puesto que las expresiones de las proteínas medidas por las diferentes metodologías empleadas, podrían estar influenciadas por diversos factores que son característicos de una muerte celular y, por consiguiente, provocar un sesgo en los análisis estadísticos de los resultados observados. Por tal motivo, se estudió la citotoxicidad de los compuestos utilizados experimentalmente por medio de un kit comercial que mide la liberación de LDH. Esta enzima citosólica está presente en diferentes tipos celulares y cuando la membrana plasmática es dañada, se libera al medio extracelular. Por lo tanto, la determinación del LDH extracelular, es un indicativo de citotoxicidad y de muerte celular por ruptura de membrana. Además, de esta manera también es posible demostrar que al estimular con LPS+ATP, la salida de IL-1 β , es por secreción y no por ruptura de la membrana. Esta conclusión fue respaldada, de manera cualitativa, al observar luego de cada estímulo las células al microscopio.

Si bien los resultados de citotoxicidad obtenidos no señalan muerte celular, cabe preguntarse si la mayor actividad de caspasa-1 en MFC, acompañado con los altos niveles de TGF- β 1 presentes en este fenotipo celular; se correlacionan de alguna manera con un efecto cito-protector mediado por esta enzima. Esto, debido

a que durante el proceso de diferenciación de FC a MFC, nosotros observamos un aumento en la expresión de los niveles proteicos de procaspasa-1 y, por lo tanto, una mayor actividad de caspasa-1. Por otro lado, tanto TGF- β 1 como caspasa-1, han demostrado participar en procesos que conllevan a la sobrevida celular (38-40).

Con respecto a TGF- β 1, Vivar *et al.* (39), demostraron in vitro que esta citoquina es capaz de activar vías de señalización canónica y no canónica, provocando un efecto cito-protector en ratas de FC neonatos y adultos, tras un evento de I/R. Además, en trabajos previos de nuestro laboratorio, fue posible determinar que los MFC tienen una mayor capacidad de sobrevida en comparación con los FC. Por consiguiente, los mayores niveles de TGF- β 1 en MFC, podrían estar relacionados con la propiedad mencionada anteriormente.

Durante el proceso de diferenciación de FC a MFC, cambia el perfil proteico de estas células, aumentando la secreción de TGF- β 1 y de otras proteínas como colágeno y fibronectina. Esto, podría sugerir que a través de algún mecanismo desconocido, la expresión de los niveles proteicos de procaspasa-1 también aumenta.

Por otra parte, una sobreexpresión de caspasa-1 en FC podría desencadenar un proceso de muerte celular conocido como piroptosis (38, 41). Sin embargo, nosotros no observamos muerte celular tanto en FC como en MFC. Lo cual, podría ser un indicio de que caspasa-1, estaría cumpliendo un rol cito-protector al igual que TGF- β 1. Además, se ha demostrado en células del sistema

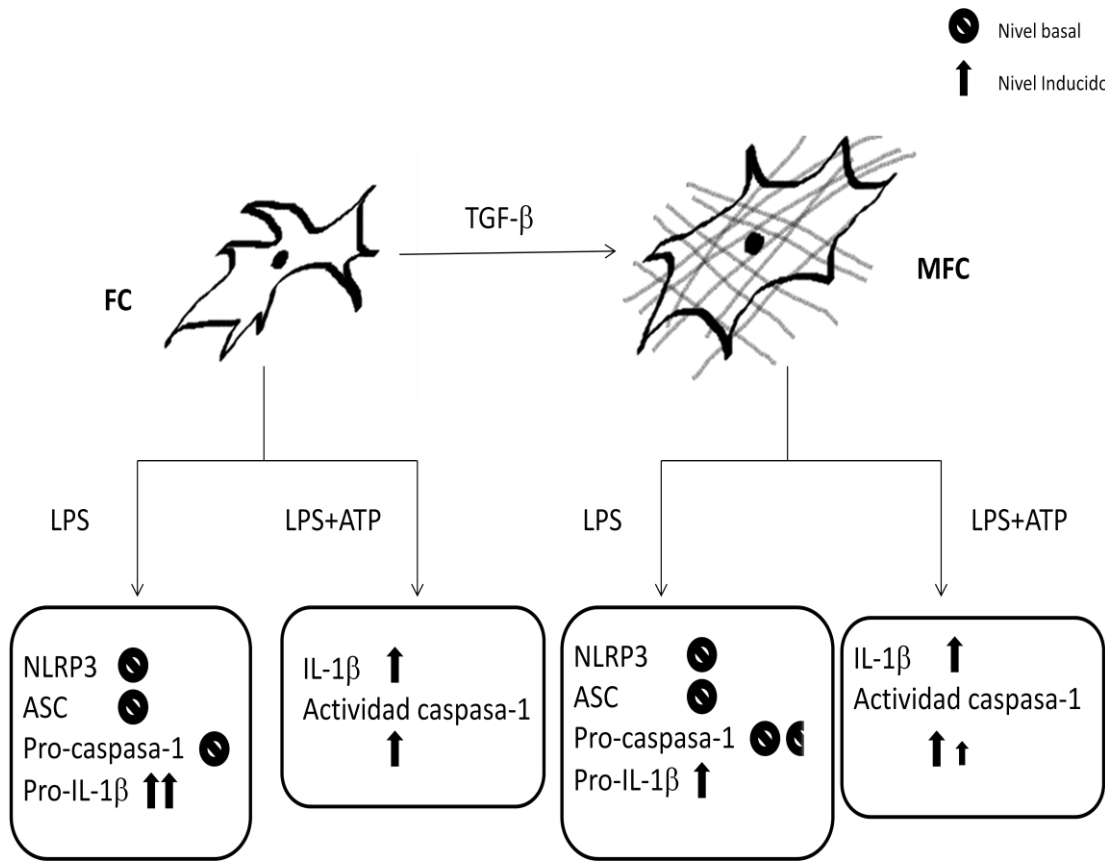
inmune y epitelial, que esta enzima tiene otros sustratos aparte de la proIL-1 β y proIL-18 (proIL-37, RIP2, SREBP2), cuya activación trae como consecuencias acciones anti-inflamatorias y, por lo tanto, podrían verse involucrados en procesos de sobrevida celular.

Por último, es posible concluir en base a los análisis planteados; que los FC tienen un rol pro-inflamatorio en estados agudos en comparación con los MFC. Esto puede ser evaluado, a través de los elevados niveles de proIL-1 β encontrados. En cambio, los MFC, al presentar una mayor actividad del inflammasoma NLRP3, podrían relacionarse con la mantención de este proceso inflamatorio, con la finalidad de restablecer la homeostasis perdida luego de una injuria en el tejido cardíaco. Asimismo, queda por dilucidar si la mayor actividad de caspasa-1 y secreción de TGF- β 1 en MFC, cumplen un rol cito-protector en este fenotipo.

Finalmente, en el esquema 2, se muestra un resumen gráfico de los principales hallazgos de este trabajo de investigación.

CONCLUSIONES

- Los MFC presentan mayores niveles basales de procaspasa-1 y sus niveles no aumentan al estimular con LPS.
- ASC y NLRP3 presentan expresión constitutiva y no hay inducción de estos, al estimular con LPS, tanto en FC como en MFC.
- Los FC presentan mayores niveles basales e inducidos de proIL-1 β , en comparación con los MFC.
- Ambos fenotipos celulares secretan IL-1 β , sin embargo, no hay diferencias entre ellos.
- Los MFC presentan una mayor actividad de caspasa-1.
- Por lo tanto, los MFC presentan una mayor actividad del inflamasoma NLRP3.



Esquema 2. Resumen inflammasoma NLRP3 en FC y MFC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Henao-Mejia J, Elinav E, Thaiss CA, Flavell RA. Inflammasomes and metabolic disease. *Annu Rev Physiol.* 2014;76:57-78.
2. Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacology & therapeutics.* 2009;123(2):255-78.
3. Souders CA, Bowers SL, Baudino TA. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res.* 2009;105(12):1164-76.
4. Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS. The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:657-87.
5. Baum J, Duffy HS. Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011;57(4):376-9.
6. Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a novel player in myocardial infarction. *Int Heart J.* 2014;55(2):101-5.
7. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999;79(1):215-62.
8. Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension.* 2002;39(2):258-63.
9. Rohr S. Myofibroblasts in diseased hearts: new players in cardiac arrhythmias? *Heart Rhythm.* 2009;6(6):848-56.
10. Santiago JJ, Dangerfield AL, Rattan SG, Bathe KL, Cunnington RH, Raizman JE, et al. Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts. *Dev Dyn.* 2010;239(6):1573-84.
11. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol.* 2007;170(6):1807-16.
12. Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012;5(1):15.
13. Abbate A. The heart on fire: inflammasome and cardiomyopathy. *Experimental Physiology.* 2013;98(2):385-.

14. Takahashi M. Role of the inflammasome in myocardial infarction. *Trends Cardiovasc Med*. 2011;21(2):37-41.
15. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(12):826-37.
16. Keyel PA. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. *Cytokine*. 2014;69(1):136-45.
17. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews Immunology*. 2001;1(2):135-45.
18. Beg AA. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends in immunology*. 2002;23(11):509-12.
19. Satoh T, Kambe N, Matsue H. NLRP3 activation induces ASC-dependent programmed necrotic cell death, which leads to neutrophilic inflammation. *Cell Death Dis*. 2013;4:e644.
20. Rathinam VA, Vanaja SK, Fitzgerald KA. Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol*. 2012;13(4):333-42.
21. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature*. 2012;481(7381):278-86.
22. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(6):397-411.
23. Jin C, Flavell RA. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *J Clin Immunol*. 2010;30(5):628-31.
24. Iyer SS, Pulsikens WP, Sadler JJ, Butter LM, Teske GJ, Ulland TK, et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(48):20388-93.
25. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2011;123(6):594-604.
26. Sandanger O, Ranheim T, Vinge LE, Bliksoen M, Alfsnes K, Finsen AV, et al. The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovascular research*. 2013;99(1):164-74.
27. Vivar R. TGF-beta1 protege a los fibroblastos cardiacos de la apoptosis inducida por isquemia/reperfusion simulada, a traves de la activacion de erk1/2, akt y smad2/3. tesis doctoral. 2012
28. Bryant C, Fitzgerald KA. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends Cell Biol*. 2009;19(9):455-64.

29. Vanaja SK, Rathinam VA, Fitzgerald KA. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends Cell Biol.* 2015;25(5):308-15.
30. Cassel SL, Joly S, Sutterwala FS. The NLRP3 inflammasome: a sensor of immune danger signals. *Semin Immunol.* 2009;21(4):194-8.
31. Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J. The inflammasome: an integrated view. *Immunological reviews.* 2011;243(1):136-51.
32. Zhang W, Xu X, Kao R, Mele T, Kvietys P, Martin CM, et al. Cardiac fibroblasts contribute to myocardial dysfunction in mice with sepsis: the role of NLRP3 inflammasome activation. *PLoS One.* 2014;9(9):e107639.
33. Jiang W, Lv H, Wang H, Wang D, Sun S, Jia Q, et al. Activation of the NLRP3/caspase-1 inflammasome in human dental pulp tissue and human dental pulp fibroblasts. *Cell Tissue Res.* 2015;361(2):541-55.
34. Hinz B. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *J Biomech.* 2010;43(1):146-55.
35. Diaz-Araya G, Vivar R, Humeres C, Boza P, Bolivar S, Munoz C. Cardiac fibroblasts as sentinel cells in cardiac tissue: Receptors, signaling pathways and cellular functions. *Pharmacol Res.* 2015.
36. Shephard P, Martin G, Smola-Hess S, Brunner G, Krieg T, Smola H. Myofibroblast differentiation is induced in keratinocyte-fibroblast co-cultures and is antagonistically regulated by endogenous transforming growth factor-beta and interleukin-1. *Am J Pathol.* 2004;164(6):2055-66.
37. Lee DJ, Du F, Chen SW, Nakasaki M, Rana I, Shih VF, et al. Regulation and Function of the Caspase-1 in an Inflammatory Microenvironment. *J Invest Dermatol.* 2015;135(8):2012-20.
38. Sollberger G, Strittmatter GE, Garstkiewicz M, Sand J, Beer HD. Caspase-1: the inflammasome and beyond. *Innate immunity.* 2014;20(2):115-25.
39. Vivar R, Humeres C, Ayala P, Olmedo I, Catalan M, Garcia L, et al. TGF-beta1 prevents simulated ischemia/reperfusion-induced cardiac fibroblast apoptosis by activation of both canonical and non-canonical signaling pathways. *Biochimica et biophysica acta.* 2013;1832(6):754-62.
40. Lefer AM, Tsao P, Aoki N, Palladino MA, Jr. Mediation of cardioprotection by transforming growth factor-beta. *Science.* 1990;249(4964):61-4.
41. Winkler S, Rosen-Wolff A. Caspase-1: an integral regulator of innate immunity. *Seminars in immunopathology.* 2015;37(4):419-27.