

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**“Angiotensina II activa el inflammasoma en fibroblastos
cardiacos”**

**Tesis Presentada a la Universidad de Chile
para optar al Grado de Doctor en Farmacología**

Por:

Pía de los Ángeles Boza Fuentes

Directores de tesis

Dr. Guillermo Díaz Araya

Dra. Lorena García Nannig

Universidad de Chile

Santiago- Chile

2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por la candidata:

Pía de los Ángeles Boza Fuentes

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día _____

Directores de Tesis:

Dr. Guillermo Díaz Araya _____

Dra. Lorena García Nannig _____

Comisión Informante:

Dr. Sergio Lavandero (Presidente) _____

Dra. María Angélica Hidalgo _____

Dra. Paulina Donoso _____

Dr. Arturo Ferreira _____

Publicaciones

Boza P, Ayala P, Vivar R, Humeres C, Tapia F, Muñoz C, García L, Hermoso MA, Díaz-Araya G. **Expression and function of toll-like receptor 4 and inflammasomes in cardiac fibroblasts and myofibroblasts: IL-1 β synthesis, secretion, and degradation.** Mol Immunol. 74:96-105, 2015

Vivar R, Humeres C, Muñoz C, Boza P, Bolivar S, Tapia F, Lavandero S, Chiong M, Diaz-Araya G. **FoxO1 mediates TGF-beta1-dependent cardiac myofibroblast differentiation.** Biochim Biophys Acta. 1863:128-38, 2016

Díaz-Araya G, Vivar R, Humeres C, Boza P, Bolivar S, Muñoz C. **Cardiac fibroblasts as sentinel cells in cardiac tissue: Receptors, signaling pathways and cellular functions.** Pharmacol Res. 101:30-40,2015

Presentaciones en Congresos

2015

Boza P, Tapia F, Vivar R, Humeres C, Díaz G. **NLRP3 inflammasome in cardiac fibroblast**. XXXVII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. Septiembre, Coquimbo, Chile.

Boza P, Tapia F, Humeres C, Vivar R, Díaz G. **NLRP3 inflammasome in cardiac fibroblast**. Convención Internacional IMMUNOFARMACOLOGY-VACCIPHARMA 2015. Junio, Varadero, Cuba.

2014

Boza P, Vivar R, Humeres C, García L, Díaz-Araya G. **Angiotensina II induce la liberación de pro-IL-1 β en fibroblastos cardíacos**. XXXVI Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. Noviembre. Chillán, Chile.

2013

Boza P, Ayala P, García L, Díaz-Araya G. **Activación del inflammasoma en fibroblastos cardíacos**. XXXVII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. Noviembre, Valdivia, Chile

Financiamiento

Este trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Farmacología Molecular Cardiovascular del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, a cargo del Dr. Guillermo Díaz Araya.

Para su realización, este trabajo fue apoyado y financiado por los siguientes proyectos:

- Beca CONICYT Doctorado Nacional y Gastos Operacionales 21120407 (Pía Boza)
- Proyecto FONDECYT 1130300 (Guillermo Díaz, investigador responsable; Lorena García, co-investigadora)
- Proyecto FONDAP 15130011 (Guillermo Díaz y Lorena García, investigadores asociados)

Agradecimientos

Índice

Resumen	18
Summary	20
1. Introducción	22
1.1 Fibroblastos cardiacos	22
1.2 IL-1 β	22
1.3 Inflamasoma NLRP3	23
1.4 Angiotensina II (Ang II)	28
2. Hipótesis	30
3. Objetivo	30
4. Objetivos específicos	30
5. Materiales y métodos	31

5.1 Materiales	31
5.2 Cultivo celular	31
5.3 Estímulos	32
5.4 Western blot (WB)	32
5.5 Inmunocitoquímica	33
5.6 ELISA IL-1 β	33
5.7 Actividad de Caspasa-1	34
5.8 Citotoxicidad	34
5.9 Silenciamiento de NLRP3	34
5.10 Inmunoprecipitación (IPP)	34
5.11 Análisis estadístico	35
6. Resultados	36

6.1 Expresión de los componentes de inflammasoma NLRP3 en FC	36
6.1.1 Expresión de pro-IL-1 β en los FC	36
6.1.2 Expresión de NLRP3, ASC y pro-caspasa-1 en FC	38
6.2 Activación del inflammasoma en FC: ATP como señal 2	40
6.2.1 Activación de caspasa-1 inducida por ATP	40
6.2.2 Secreción de IL-1 β inducida por ATP	41
6.3 Ang II: activador del inflammasoma en los FC	43
6.3.1 Ang II induce la colocalización de NLRP3 y ASC	43
6.3.2 Ang II induce la actividad de caspasa-1	49
6.3.3 Ang II induce la secreción de IL-1 β	50
6.3.4 Citotoxicidad de Ang II	52

6.4 Señalización de Ang II que induce la activación del inflamasoma	53
6.4.1 Losartán previene la activación del inflamasoma mediada por Ang II	53
6.4.2 Participación de PLC y de IP3R en la activación del inflamasoma mediada por Ang II	55
6.4.3 BAPTA-AM previene la activación de caspasa-1 inducida por Ang II.	57
6.5 Ang II induce la activación de NLRP3 y caspasa-1	59
6.6 Ang II induce la secreción de IL-1 β por un mecanismo vesicular no clásico	64
7. Discusión	67
8. Conclusiones	78
9. Anexo	79
10. Referencias	91

Índice de figuras

Fig.1 Activación del inflamasoma NLRP3	27
Fig. 2 Expresión de pro-IL-1 inducida por LPS	37
Fig. 3 Expresión de NLRP3, ASC y caspasa-1 inducidos por LPS	39
Fig. 4 Actividad de caspasa-1 mediada por ATP	41
Fig. 5 Secreción de IL-1 β mediada por ATP	42
Fig. 6 Ang II induce la colocalización de NLRP3 y ASC	45
Fig. 7 Actividad de caspasa-1 mediada por Ang II	50
Fig. 8 Secreción de IL-1 β mediada por Ang II	51
Fig. 9 Citotoxicidad inducida por Ang II	52
Fig. 10 Losartán previene la activación del inflamasoma inducida por Ang II	54
Fig. 11 PLC e IP3R participan de la activación del inflamasoma inducida por Ang II	56

Fig. 12 BAPTA-AM previene la activación de caspasa-1 inducida por Ang II	58
Fig. 13 El Silenciamiento de NLRP3 impide la activación del inflamasoma en FC tratados con Ang II	61
Fig. 14 La inhibición de caspasa-1 impide la activación del inflamasoma en FC tratados con Ang II.	63
Fig. 15 Ang II induce la secreción de IL-1 β por un mecanismo no-clásico de secreción de proteínas.	66
Fig. 16 Modelo propuesto	77
Fig. anexa 1. Expresión de pro-IL-1 inducida por LPS	79
Fig. anexa 2. Expresión de pro-IL-1 β inducida por LPS a tiempos largos	81
Fig. anexa 3. Expresión de pro-IL-1 β inducida por LPS a tiempos largos	82
Fig. anexa 4. MG-132 disminuye la expresión de pro-IL-1 β .	83
Fig. anexa 5. MG-132 disminuye la expresión de pro-IL-1 β .	85
Fig. anexa 6. Precipitación conjunta de Ubiquitina y pro-IL-1 β	86

Fig. anexa 7. Pro-IL-1 β es degradada por inducción de autofagia	87
Fig. anexa 8. Pro-IL-1 β es degradada por inducción de autofagia	88
Fig. anexa 9: Modelo propuesto	90

Abreviaturas

2-APB:	2-aminoetoxidifenil borato
ABA:	Acrilamida/bis-acrilamida
ac-YVAD-cmk:	acetil - tyrosil-valil-alanil-aspartil – clorometilcetona
ALR:	Receptor tipo-AIM2
Ang II:	Angiotensina II
ASC:	“Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD”. También conocida como PYCARD
AT1:	Receptor de angiotensina II tipo 1
ATP:	Adenosin trifosfato
AMPc:	Adenosín monofosfato cíclico
Caspasa-1:	“Cysteine-dependent ASPartyl-specific proteASE -1”

DAMP:	Patrones moleculares asociados a daño
DMEM:	“Dulbecco's Modified Eagle Medium”
DMSO:	Dimetil sulfóxido
EGFR1:	Receptor del factor de crecimiento epidermal
ELISA:	“Enzyme-linked immunosorbent assay”
FAK:	Quinasas de adhesión focal
FC:	Fibroblasto cardíaco
FBS:	Suero fetal bovino
IL-1 β :	Interleuquina 1-beta
I/R:	Isquemia/reperfusión
IP3R:	Receptor de inositol trifosfato
IPP:	Inmunoprecipitación

LDH:	Lactato deshidrogenasa
LPS:	Lipopolisacárido
MI:	Infarto del miocardio
MEC:	Matriz extracelular
MMP-9:	Metaloproteinasa-9
MSU:	Monourato de sodio
mTor:	“Mammalian target of rapamycin”
NLR:	Receptor tipo-Nod
NLRP3:	“NLR family, pyrin domain containing 3.” También conocida como NALP3.
PAMP:	Patrones moleculares asociados a patógenos
PLC:	Fosfolipasa C

PRR: Receptores de reconocimientos de patrones moleculares

PR3: Proteinasa 3

RFU: Unidad relativa de fluorescencia

ROS: Especies reactivas del oxígeno

siRNA: ARN pequeño de interferencia

SEM: error estándar medio

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

V-ATPasa: ATPasa vacuolar- tipo H⁺

WB: Western blot

Resumen

El inflamasoma NLRP3 es un complejo multiproteico ampliamente estudiado en el sistema inmune. Las investigaciones realizadas se han centrado, especialmente en estos últimos años, en su participación en el inicio y desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles.

Este complejo se compone de tres proteínas diferentes: NLRP3 (receptor intracelular), ASC (proteína adaptadora) y caspasa-1 (enzima), y posee la peculiaridad de que su activación está comandada por dos diferentes señales. La primera señal corresponde a patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) o a patógenos (PAMPs) que generan la activación de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) ubicados en la membrana plasmática, como los receptores de tipo Toll (TLR). La activación de estos receptores, induce la síntesis de la citoquina blanco de caspasa-1: pro-IL-1 β . La segunda señal son moléculas muy específicas que generan, indirectamente, la activación de NLRP3, lo que conlleva el reclutamiento de ASC y pro-caspasa-1 y la activación de caspasa-1, quedando esta enzima lista para escindir su blanco: pro-IL-1 β a IL-1 β . Una vez activada IL-1 β , es secretada hacia el medio extracelular.

La activación del inflamasoma a nivel cardiaco es un hecho poco comprendido. Se ha establecido que los fibroblastos cardíacos (FC) serían las células que activarían su propio inflamasoma NLRP3 y secretarían IL-1 β hacia el medio extracelular en modelos de daño cardiaco. No obstante, se desconocen señales propias del corazón que generen la activación del inflamasoma.

En este trabajo se plantea que Angiotensina II (Ang II) sería una señal 2 de activación del inflamasoma en FC. Este planteamiento surgió debido a que los FC presentan receptores de Ang II, los que activados llevan a un aumento citosólico de la concentración de Ca²⁺ (proveniente desde el retículo), evento que ha sido relacionado con la activación de NLRP3 en células inmunes. La hipótesis de este trabajo de tesis establece que Angiotensina II a través de la vía transduccional AT1R/PLC/IP3R/Ca⁺² activa el inflamasoma NLRP3 en fibroblastos cardíacos, conduciendo a la escisión y secreción de IL-1 β . Mientras que los objetivos se resumen en, investigar si las proteínas del inflamasoma NLRP3 y pro-IL-1 β son expresadas en FC, estudiar si Ang II activa al inflamasoma NLRP3, a través de la cascada transduccional AT1R/PLC/IP3R/Ca⁺² y evaluar si Ang II induce la escisión y secreción de IL-1 β hacia el medio extracelular.

A partir de cultivos primarios de FC de rata neonata, se estableció que los FC expresan los componentes del inflamasoma, y que éstos no son inducidos por lipopolisacárido (LPS) 1 µg/mL (señal 1). Asimismo, se determinó que pro-IL-1β presenta niveles basales muy bajos y que su expresión es inducida por LPS de manera tiempo dependiente.

Se realizaron tres metodologías distintas para demostrar que Ang II 1 µM activa el inflamasoma: 1) Por inmunocitoquímica se demostró que existe colocalización de NLRP3 y ASC al estimular los FC con Ang II; 2) Por cuantificación de la actividad de caspasa-1, se demostró que Ang II estimula la actividad de caspasa-1 respecto de los controles y 3) Por cuantificación de la secreción de IL-1β por ELISA, se demostró que Ang II estimula la secreción de IL-1β hacia el medio extracelular.

Para dilucidar la cascada de señalización responsable de activar el inflamasoma, se intervino utilizando los inhibidores Losartán, U73122 y 2-APB, y el quelante de Ca²⁺ BAPTA-AM. A partir los resultados obtenidos se demostró que Ang II induce la activación de inflamasoma a través de la señalización comprendida por el receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1), fosfolipasa C (PLC), receptor de inositol trifosfato (IP3R) y Ca²⁺.

Adicionalmente, se demostró por silenciamiento génico de NLRP3 con siRNA y por el uso de un bloqueador irreversible de caspasa-1, YVAD, que el inflamasoma activado por Ang II sería el conformado por NLRP3 y caspasa-1.

Finalmente, se pudo demostrar que la secreción de IL-1β inducida por Ang II, sería a través de un mecanismo no clásico de secreción de proteínas, donde estaría involucrado el transporte vesicular.

Se concluyó que Ang II a través de la vía transduccional AT1R/PLC/IP3R/Ca²⁺ activaría el inflamasoma NLRP3 en FC, conduciendo a la secreción, por transporte vesicular, de IL-1β hacia el medio extracelular.

Summary

The NLRP3 inflammasome is a multiprotein complex studied extensively in the immune system. The research has been carried out, especially in recent years, in its participation in the initiation and development of chronic non-communicable diseases.

The NLRP3 inflammasome consists of three different proteins: NLRP3 (intracellular receptor), ASC (adapter protein) and caspase-1 (enzyme), and has the peculiarity that its activation is commanded by two different signals. The first signal corresponds to damage associated molecular patterns (DAMPs) or pathogen (PAMPs) that generates the activation of pattern recognition receptor (PRR) located on the plasma membrane as Toll-like receptor (TLR). Activation of these receptors induces the synthesis of the target cytokine of caspase-1: pro-IL-1 β . The second signals are very specific molecules that indirectly activate NLRP3, leading to the recruitment of ASC and pro-caspase-1 and activation of caspase-1, being this enzyme ready to cleave its target: pro-IL-1 β to IL-1 β . Once activated IL-1 β is secreted into the extracellular medium.

Inflammasome activation at cardiac level is a little understood fact. It has been established that cardiac fibroblasts (CF) would activate its NLRP3 inflammasome and secrete IL-1 β into the extracellular environment in models of heart damage. However, own heart signals that generate activation inflammasome are unknown.

This study suggested that Ang II would be a signal 2 for the activation of the inflammasome in FC. This approach emerged because the CF express Ang II receptors, which lead to increase cytosolic Ca²⁺ concentration (coming from the reticle), a phenomenon that has been linked to the activation of NLRP3 in immune cells. The hypothesis of this thesis establishes that Angiotensin II through the signal transduction pathway AT1R/PLC/IP3R/Ca²⁺ activates the inflammasome NLRP3 in cardiac fibroblasts, leading to cleavage and secretion of IL-1 β . While the objectives are summarized in, to investigate whether proteins inflammasome NLRP3 and pro-IL-1 β are expressed in FC, to study whether Ang II activates the inflammasome NLRP3, through the signal transduction cascade AT1R/PLC/IP3R/Ca²⁺ and to evaluate whether Ang II induces excision and secretion of IL-1 β into the extracellular environment.

Previously, from primary cultures of neonatal rat CF, it was established that the CF express inflammasome components and that they are not induced by LPS (signal 1). It was also

determined that pro-IL-1 β has very low basal levels and that its expression is induced by LPS in a time-dependent manner.

Three different methodologies to demonstrate that Ang II activates the inflammasome were performed. 1) Immunocytochemistry showed that NLRP3 and ASC colocalize after stimulating CF with Ang II. 2) Quantitation of caspase-1 activity was demonstrated that Ang II induces an increase in caspase-1 activity compared to controls. 3) Finally, the secretion of IL-1 β was quantified by ELISA, demonstrating that Ang II induced IL-1 β secretion to the extracellular medium.

To elucidate the signaling pathway triggered by Ang II, the signaling was intervened using inhibitors: Losartan, U73122 and 2-APB; and the Ca²⁺ chelator BAPTA-AM. The results obtained demonstrated that Ang II induce the activation of the inflammasome through signaling conformed by the angiotensin II receptor type 1 (AT1), phospholipase C (PLC), inositol triphosphate receptor (IP 3 R) and Ca²⁺.

Additionally, silencing NLRP3 with siRNA and using an irreversible inhibitor of caspase-1 YVAD, the inflammasome activated by Ang II is the conformed by NLRP3 and caspase-1.

Finally, was demonstrated that the IL-1 β secretion induced by Ang II, would be through a non-classical protein secretion mechanism, which would be involved the vesicular transport.

We conclude that Ang II through the signal transduction pathway AT1R / PLC / IP3R / Ca²⁺ activates the NLRP3 inflammasome in CF, leading to the secretion of IL-1 β by vesicular transport to the extracellular medium.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Fibroblastos cardiacos

Los fibroblastos cardíacos (FC) se han caracterizado tradicionalmente como células sostén del tejido cardíaco. En el corazón adulto, los FC son vistos como células quiescentes que contribuyen a la homeostasis cardíaca, principalmente debido a su rol en el mantenimiento de la matriz extracelular (MEC) (1). Los FC desempeñan un papel clave en el mantenimiento de forma y función cardíaca normal, así como en el proceso de remodelamiento cardíaco en condiciones patológicas, tales como infarto e hipertensión. Independientemente del estado normal o patológico del corazón, los FC tienen múltiples funciones, tales como la síntesis y deposición de la matriz extracelular y la comunicación célula-célula con otras células cardíacas, incluyendo miocitos y células endoteliales (2). Sin embargo, estos últimos años, estudios han demostrado que este fenotipo celular detecta señales externas y genera una respuesta, por lo que se les ha denominado células centinelas (3-5).

Diversos autores han descrito distintos mediadores que pueden ser detectados por los FC (6-10), entre ellos se destacan las señales de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o a daño (DAMPs). Estas señales son reconocidas por los receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRR), dando inicio al proceso inflamatorio. Se ha descrito que la activación de estos receptores en FC se acopla a la alteración de la función celular incluyendo cambios en la proliferación, migración, transdiferenciación a miofibroblastos, recambio de la MEC y a la producción de factores paracrinos fibróticos e inflamatorios, que tienen un impacto directo en la capacidad del corazón para responder a las lesiones (5).

Otros estudios han demostrado que durante eventos de daño cardíaco hay secreción de IL-1 β , citoquina pro-inflamatoria, que es sintetizada por las células residentes del corazón, de las cuales el mayor porcentaje serían los FC (11, 12).

1.2 IL-1 β

IL-1 β es una citoquina de tipo inflamatoria “multifuncional” (13), que afecta a variados tipos celulares sola o en combinación con otras citoquinas, y que a partir de su descubrimiento a finales de los años 80, ha aumentado el entendimiento de la patogénesis de variadas enfermedades.

IL-1 β es sintetizada como una pro-forma denominada “pro-IL-1 β ”, la cual es inactiva y requiere de procesamiento enzimático para formar la citoquina activa. Esta activación está dada, principalmente, por caspasa-1 y para que esta proteasa se auto-active, se requiere del ensamblaje del inflamasoma (14).

A nivel celular cardiaco, se ha descrito que las acciones pro-inflamatorias de IL-1 β tendrían un rol esencial en la respuesta inflamatoria post infarto. IL-1 exhibe una regulación de crecimiento diferencial en las células del corazón, específicamente, induce hipertrofia y síntesis de ADN en los cardiomiocitos, mientras que reprime la proliferación de los FC (15). Asimismo, también se ha descrito que IL-1 β sola o en combinación con IFN- γ y TNF- α , induce la apoptosis del cardiomiocito(16). Siendo también capaz de modular el comportamiento y la expresión génica de todos los tipos celulares envueltos en la cicatrización de la zona infartada: induciendo la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, fomentando la migración transendotelial de neutrófilos y células mononucleares, favoreciendo las síntesis de quimioquinas por células endoteliales y mononucleares para favorecer la quimiotaxis de leucocitos a los sitios dañados y modificando el fenotipo y actividad del fibroblasto. Se ha descrito que IL-1 favorecería la degradación de la MEC, a través de un aumento de la síntesis de metaloproteinasas (MMP), mientras que reduciría la deposición de colágeno (16).

Por otra parte, diferentes estudios han propuesto que la función de IL-1 β a nivel cardiaco sería propagar una reacción inflamatoria local, aumentando el remodelado y dilatamiento cardiaco, conduciendo a disfunción cardíaca post MI (infarto del miocardio) (17).

1.3 Inflamasoma NLRP3

A nivel molecular, el inflamasoma es un complejo multiproteico formado por tres distintas proteínas: NLRP3 (receptor de tipo PRR intracelular), ASC (proteína adaptadora) y caspasa-1 (enzima que tiene como blanco a las citoquinas pro-IL-1 β y pro-IL-18, generando los productos IL-1 β e IL-18). No obstante, para que este complejo se ensamble y pueda escindir pro-IL-1 β y pro-IL-18, se requiere de dos señales denominadas señal 1 y señal 2 (10).

En la actualidad se conoce que existen varios tipos de inflamasoma, los cuales se activarían diferencialmente dependiendo del PAMP o DAMP detectado por las células y se diferenciarían por estar conformados por distintos PRR, que actúan como sensores

intracelulares y que pertenecen a la familia NLR (Receptor tipo-Nod) o ALR (Receptor tipo-AIM2) (18, 19).

A nivel del corazón, varios estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el inflamasoma tendría un rol primordial durante el daño cardíaco sería el denominado NLRP3. Un modelo de corazón aislado de ratón deficiente en NLRP3 sometido a un evento de isquemia/reperfusión (I/R), demostró una mejoría en la función cardíaca y una disminución del daño hipóxico en comparación con el corazón wild-type (12). Asimismo, ratones deficientes en ASC o caspasa-1 demostraron tener una menor reacción de tipo inflamatoria durante la oclusión de la arteria anterior descendente por 30 minutos, seguido de reperfusión por 48h, experimentando una menor fibrosis y disfunción cardíaca(11). Finalmente un modelo de disfunción cardíaca por sepsis en ratón, determinó que la inhibición de NLRP3 atenuó la disfunción miocárdica y aumentó la supervivencia (20).

Para que pro-IL-1 β , sea previamente sintetizada a la activación del inflamasoma, se requiere de la acción de la señal 1. La señal 1 corresponde a PAMPs o DAMPs que activan PRR, desencadenando la activación de NF- κ B y la transcripción y traducción de pro-IL-1 β , citoquina inactiva que se acumula en el citosol. A nivel del corazón, estas moléculas corresponden a sustancias de origen bacteriano, viral o parasitarias, o a moléculas intracelulares que son vertidas al medio extracelular, debido al daño celular, o también a proteínas de la MEC que son fragmentadas o mal plegadas durante el daño tisular (7, 21, 22).

La señal 2 corresponde a moléculas muy específicas que indirectamente activan al receptor intracelular NLRP3. Pocas de estas moléculas se han descrito, entre ellas se encuentran adenosin trifosfato (ATP), colesterol, monourato de sodio (MSU) y asbesto, entre otras (22-24). A nivel del corazón se conoce muy poco acerca de estas moléculas, sin embargo, en condiciones de daño tisular se plantea que el origen de los altos niveles de ATP que se necesitarían para activar a NLRP3 provendría de la muerte de las células musculares cardíacas, que verterían su contenido al medio extracelular. Asimismo, se desconoce la cascada transduccional por la cual se activa NLRP3 y tampoco se conoce un ligando directo de este receptor (25). Sin embargo, se ha podido establecer ciertos eventos que se requieren para su activación, entre los cuales se encuentran: aumento de la concentración de Ca²⁺ en el citosol, proveniente desde el retículo; aumento intracelular de las especies reactivas del oxígeno (ROS); desestabilización lisosomal; eflujo de K⁺; disminución de los niveles intracelulares de adenosin monofosfato cíclico (AMPc), entre otros (23-25).

Finalmente, trabajos han propuesto que la activación del receptor NLRP3 sería inducida por la perturbación de la homeostasis intracelular de iones, especialmente a una disminución de los niveles citosólicos de K^+ y a un aumento la concentración citosólica de Ca^{2+} , los que aportan en distinta medida e inclusive podrían ser independientes el uno del otro, en la activación del receptor NLRP3 y posterior ensamblaje del inflamasoma NLRP3 (26, 27).

Una vez que la señal 2 activa indirectamente a NLRP3, éste se polimeriza, recluta al adaptador ASC y a su vez, este último recluta a pro-caspasa-1 que se auto-escinda y se ensambla para formar la caspasa-1 activa (28). Caspasa-1 escinde a pro-IL-1 β e IL-18 (**Figura 1**).

En resumen, para que IL-1 β sea secretada por las células, es necesario que ocurra esta secuencia de eventos, que incluye la síntesis de pro-IL-1 β mediada por la primera señal y luego su clivaje por la segunda señal (28).

Se han propuesto muchos mecanismos para explicar la inducción de la activación del inflamasoma NLRP3, en respuesta a numerosos estímulos pro-inflamatorios que incluyen las moléculas derivadas de patógenos, los inductores endógenos de inflamación y las toxinas microbianas no patógenas formadoras de poro como la nigericina y la maitoxina (29, 30). El inflamasoma NLRP3 también puede ser activado en respuesta a una diversidad de factores derivado del hospedador, indicativos de estrés e injuria como el ATP extracelular y el hialuronato, las fibrillas de β -amiloide, una elevada concentración de glucosa plasmática y los cristales de MSU, de pirofosfato de calcio y de colesterol, así como un número importante de sustancias ambientales como la sílica, los asbestos y el adyuvante hidróxido de aluminio, asimismo se ha encontrado que la exposición a la radiación UVB o a sustancias químicas irritantes que causan hipersensibilidad por contacto también inducen la respuesta dependiente del inflamasoma (31). Como se aprecia no existe un patrón común en las señales del inflamasoma que indiquen cuáles serían los requisitos que debiesen cumplir las moléculas candidatas a ser señales de activación. No obstante, se sabe que la señal 2 debe regular positivamente a NLRP3 a través de:

- a) Variaciones de osmolaridad del medio celular
- b) Aumento de ROS
- c) Alteraciones de la membrana lisosomal (31)

En particular, se ha descrito que MSU (activador que media alteraciones de la membrana lisosomal) no es capaz de activar el inflamasoma en FC, lo que se explicaría por la incapacidad de éstas células de fagocitar cristales (12). Por consiguiente la activación del inflamasoma en FC estaría dada solamente por agentes que generen variaciones de osmolaridad de los iones intra y extracelulares y por aumentos de ROS.

Adicionalmente a la activación del inflamasoma, también existen reguladores de estos complejos multiproteicos. La ubiquitinización (32), el óxido nítrico (NO), el monóxido de carbono (CO), la autofagia, los microARN, entre otros, serían agentes que modularían negativamente y de diversas formas la activación del inflamasoma NLRP3 (23).

Asimismo, también es importante aclarar que en la literatura se han descrito alternativas a caspasa-1, que pueden escindir a pro-IL-1 β , activándola o inactivándola. Por ejemplo, MMP podrían cortar tanto intracelular como extracelularmente a pro-IL-1 β (33). Otras enzimas que podrían cortar a pro-IL-1 β que han sido descritas son: proteinasa-3 (PR3), elastasa, catepsina G, entre otras (34).

Finalmente, para que IL-1 β se secrete, se ha planteado que debiese ser por mecanismos alternativos de secreción de proteínas, debido principalmente, a que esta citoquina carece de la secuencia necesaria para poder transitar por el sistema clásico de secreción de proteínas, que incluye el paso por el retículo endoplásmico (RE) y por el aparato de Golgi (35, 36).

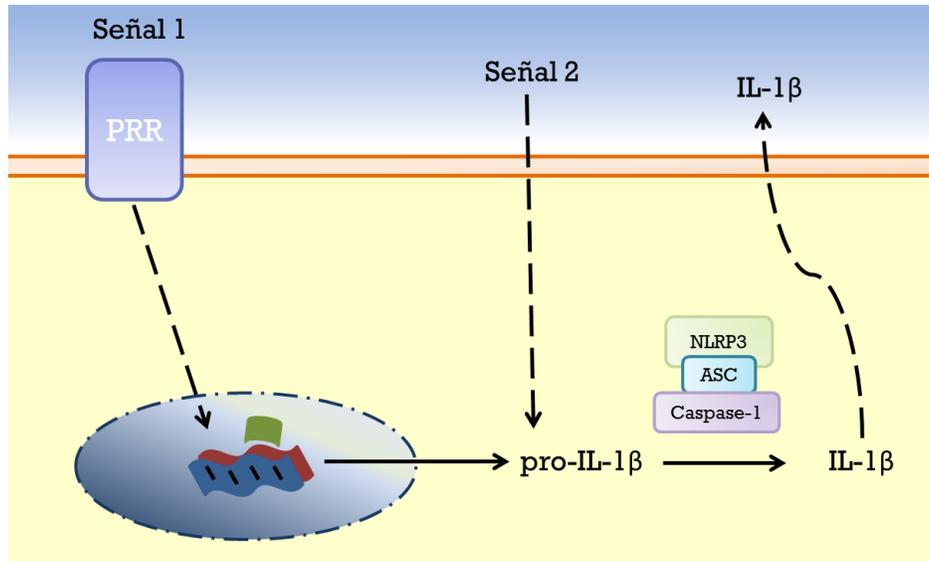


Figura 1. Activación del inflammasoma NLRP3. La señal 1 es detectada por los PRR, lo que lleva a la síntesis de pro-IL-1 β . La señal 2 induce, indirectamente, la activación del receptor NLRP3 y su polimerización, se recluta a ASC y pro-caspasa-1, lo que lleva a su activación como caspasa-1. Esta enzima tiene como blanco a pro-IL-1 β e IL-18, cortándola para producir IL-1 β e IL-18, la cual es secretada hacia el medio extracelular por mecanismos no clásicos de secreción de proteínas.

Como se mencionó anteriormente, poco se conoce sobre las señales que generan la activación del inflammasoma NLRP3 en el corazón y la posterior secreción del IL-1 β hacia el medio extracelular.

En este trabajo de tesis doctoral se planteó que angiotensina II (Ang II) sería una segunda señal de activación del inflammasoma NLRP3 en los FC y que esta activación estaría mediada por el aumento de la concentración de Ca²⁺ en el citosol, proveniente del retículo.

1.4 Angiotensina II

Ang II es una hormona hipertensiva, pro-fibrótica y pro-inflamatoria ampliamente estudiada. Corresponde a un péptido multifuncional con actividad pleiotrópica, que participa en el tono vascular, senescencia, crecimiento celular, apoptosis, migración y deposición de la MEC (37). Es conocido que su principal y clásica función ha sido el controlar la homeostasis del sistema circulatorio. Sin embargo, durante los últimos años, estudios han documentado nuevos roles para Ang II, especialmente como molécula pro-inflamatoria y como agente pro-fibrótico (38).

Existe un concepto tradicional que indica que el sistema renina-angiotensina es un sistema endocrino cuyos componentes son secretados por diferentes órganos y que Ang II actuaría sobre receptores específicos ubicados en diferentes órganos. Sin embargo, se ha confirmado que Ang II sería producida localmente en varios tejidos. Lo que indicaría que los niveles locales de Ang II serían mayores que los encontrados en el plasma (39). Los niveles de Ang II en el plasma de sujetos normales rodea los 18 pM (40) y se ha reportado que los niveles de Ang II sería de 2 a 3 veces mayor en el tejido cardiaco que en el plasma (41). Un aumento en la actividad en la enzima convertidora de angiotensina y en la concentración de Ang II genera inflamación (37).

Se ha descrito que Ang II sería un agente pro-inflamatorio a nivel cardiaco debido a que induce la expresión de proteínas de adhesión y quimioquinas, infiltración de células inmunes hacia el miocardio, desbalance de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias versus anti-inflamatorias y activación de cascadas transduccionales pro-inflamatorias, entre otras (37).

Estudios la han relacionado con la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en diversos tipos celulares (42, 43). Estudios previos han mostrado que Ang II, producida por el tejido vascular, aumenta la generación de ROS e induce la síntesis de varios factores, a través de la inducción del AT1R, lo que lleva a la acumulación de mediadores inflamatorios e inducción de la proliferación y migración de las células vasculares (44). En el sistema cardiovascular, Ang II provoca estrés oxidativo mediante la inducción de la producción de ROS a través de la inducción de la NADPH oxidasa. Estas especies oxidantes comienzan la reacción de oxidación de los lípidos presentes en las membranas de los vasos sanguíneos que conducen a la inflamación y la generación de citoquinas inflamatorias (TNF- α) a través de la activación de NF-kB (44). En particular se ha descrito que la

inflamación impulsada por Ang II implica la activación del endotelio de los vasos sanguíneos y la expresión de diversas selectinas de células endoteliales, que conllevan a la extravasación de poblaciones de leucocitos hacia el sitio de la lesión. Del mismo modo se ha establecido que Ang II induce un aumento de la permeabilidad vascular mediante la promoción de la expresión y secreción de VEGF, además de inducir la expresión de moléculas de adhesión endotelial, incluyendo selectinas (P y L-selectina), proteínas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 y sus ligandos, las integrinas. Ang II también promueve la disfunción endotelial a través de la activación de la COX-2, que genera prostaglandinas vasoactivas y ROS. Por otra parte, Ang II favorece el reclutamiento de la infiltración de células inflamatorias en los tejidos, mediante la estimulación de la producción de citoquinas / quimioquinas específicas. Por ejemplo, Ang II induce la producción de MCP-1 en monocitos cultivados in vitro (38).

Ang II también es un factor profibrótico. La infusión crónica de Ang II en ratones ha mostrado un aumento de la presión arterial, la infiltración de células inflamatorias en el miocardio y fibrosis cardíaca. En cardiomiocitos de rata, Ang II induce señales de Ca^{2+} y estrés oxidativo, ambas inducen cooperativamente la hipertrofia de los cardiomiocitos (45). Asimismo, FC de rata tratados con Ang II mostraron una mayor expresión de las quinetas de adhesión focal (FAK) e integrinas, mientras que los miocitos cardiacos expresaron altos niveles de c-fos, EGFR1 (Receptor del factor de crecimiento epidermal), TGF y proteínas de la MEC (45). Adicionalmente, se ha descrito que en FC de rata adulta, Ang II induce secreción de colágeno a través del ROS, dado principalmente por la actividad de NADPH oxidasa (46)

En nuestro laboratorio se ha determinado que los FC expresan receptores de angiotensina II de tipo 1 (AT1) y se conoce que la activación de éstos desencadena la cascada AT1R- $G_{\alpha q}$ -PLC-IP3R, que lleva a un aumento citosólico de Ca^{2+} y la activación de NADPH, generando aumento de ROS (47).

Con todo estos antecedentes se plantea que Ang II es buen candidato para señal activadora del inflamasoma NLRP3 porque cumple con dos requisitos básicos necesarios para activar aquel complejo en los FC: genera variaciones de osmolaridad de los iones intra y extracelulares e induce aumentos de ROS (31). Es importante destacar que al comienzo de esta tesis solo existían dos trabajos sobre inflamasoma NLRP3 y FC (11, 12). Además, no había estudios que demostraran la activación del inflamasoma NLRP3 mediada por Ang II en ningún modelo de estudio. No obstante, durante el transcurso de realización de esta

tesis aparecieron trabajos que relacionaban Ang II e inflammasoma NLRP3. Sin embargo, ninguno de ellos mostró que la activación del inflammasoma NLRP3 por Ang II era dependiente de la señalización que conduce a un aumento de Ca^{2+} .

2. HIPÓTESIS

Angiotensina II a través de la vía transduccional AT1R/PLC/IP3R/ Ca^{+2} activa el inflammasoma NLRP3 en fibroblastos cardiacos, conduciendo a la escisión y secreción de IL-1 β .

3. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que Ang II es capaz de favorecer la activación del inflammasoma en FC.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar si las proteínas del inflammasoma NLRP3 y pro-IL-1 β son expresadas en FC.

Estudiar si Ang II activa al inflammasoma NLRP3, a través de la cascada transduccional AT1R/PLC/IP3R/ Ca^{+2} .

Evaluar si Ang II induce la escisión y secreción de IL-1 β hacia el medio extracelular.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

Los materiales utilizados se adquieren a las siguientes compañías.

- Costar® (NJ, USA): material de plástico estéril para cultivo celular.
- Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA): azul de Tripán, tripsina/EDTA y estándar de masa molecular para proteínas.
- GIBCO BRL (Carlsbad, CA, USA): suero fetal bovino (FBS)
- Merck (Darmstadt, Germany): Todos los compuestos orgánicos e inorgánicos (glicina, tween-20, tris base, SDS).
- Perkin Elmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA, USA): reactivo de aumento de quimioluminiscencia (ECL).
- Santa Cruz Biotechnology (CA, USA): anticuerpos primarios para NLRP3, ASC, Caspasa-1 y el anticuerpo secundario anti-goat. Rapamicina y el péptido bloqueador de NLRP3.
- Merck Millipore (MA, USA): anticuerpo de IL-1 β .
- Calbiochem (Darmstadt, Germany): anticuerpos secundarios anti-rabbit y anti-mouse, además del anticuerpo primario para tubulina.
- R&D Systems (MN, USA): kit de ELISA para IL-1 β de rata.
- Sigma Aldrich (MO, USA): LPS ultrapuro, Angiotensina II, 2-APB, AC-YVAD-CMK y Bafilomicina A1.
- ABCAM (Cambridge, UK): ATP, Losartán, U73122 y el kit actividad de caspasa-1 (fluorométrico).
- ThermoFisher Scientific (MA, USA): kit de citotoxicidad de LDH Pierce™, NLRP3 Select Silencer® y Brefeldina A.
- Cayman Chemical (MI, USA): BAPTA-AM y 3-metiladenina.

5.2 Cultivo celular

Las células utilizadas corresponden a cultivos primarios de FC neonatos llevados a confluencia. Los FC se aislaron de corazones de ratas neonatas a partir del protocolo descrito por Foncea y cols (48). Las células se sembraron en placas de cultivo con DMEM-F12+ (FBS) 10%, luego de 4h fueron lavadas y privadas con F-12 hasta el día siguiente. El manejo y cuidado de los animales de laboratorio fue aprobado por el Comité de Bioética de

la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile con el código CBE2012-20.

5.3 Estímulos

El estímulo de primera señal del inflamasoma se realizó con lipopolisacárido (LPS) ultrapuro, disuelto en agua para inyectables, en una concentración en placa de 1 µg/mL. El tiempo de estímulo, fue desde 0 hasta 72 h dependiendo del experimento.

Los estímulos de segunda señal de activación del inflamasoma correspondieron a ATP (3 mM) y Ang II (1 µM). Estas sustancias se adicionaron a las 8 h de estímulo con lipopolisacárido (LPS), sin lavado de por medio y las muestras fueron obtenidas entre 1 y 16 h de iniciado este segundo estímulo.

Los antagonistas o inhibidores: Losartán (10 µM), U73122 (1 µM), 2-APB (10 µM), ac-YVAD-cmk (10 µM) Brefeldin A (100 nM) y Bafilomicina A1 (1 nM) se utilizaron 7 h después de LPS y 1 h antes del estímulo de Ang II 16h. MG-132 (100 µM) se usó por 24 h (en conjunto con LPS) o por 16 h (8 h después de LPS). BAPTA-AM (10 µM) se adicionó 1h antes de estimular con Ang II 4h. Rapamicina (10 µM) y 3-metiladenina (1 mM) se utilizaron 40 h después de estimular con LPS 8 h.

Todos estímulos, antagonistas e inhibidores hidrosolubles se disolvieron en agua para inyectables y el resto se disolvieron en DMSO, alcanzado una concentración máxima de 1% de DMSO en el medio de cultivo celular.

5.4 Western blot (WB)

Los WB se realizaron a partir del lisado celular o de la precipitación de las proteínas del sobrenadante de las células tratadas (49). La concentración de acrilamida/bis-acrilamida (ABA) varió desde un 5 a un 11%, dependiendo de la proteína de interés. Para la electroforesis se cargaron entre 10 y 30 µg de extracto proteico según la proteína a detectar. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 70V los primeros 30 min y luego a 100 V en tampón de electroforesis 1X (Tris base 30,25 g, Glicina 144 g, SDS 10 g, agua 1.000 mL para tampón de electroforesis 10X). Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 350 mA durante 90 min en tampón de transferencia 1X (tris base y glicina disuelto en agua destilada). Finalmente, las membranas se bloquearon por 1h con una solución de leche sin grasa al 10% en TBS, se

lavaron tres veces con TBS y luego se les agregaron los siguientes anticuerpos: IL-1 β (1:1000 para lisado celular) NLRP3 (1:200), ASC (1:200) y caspasa-1 (1:200).

5.5 Inmunocitoquímica

Las imágenes obtenidas por inmunocitoquímica se lograron con microscopía confocal. Los FC se sembraron sobre vidrios cubreobjetos. Una vez terminados los estímulos correspondientes las células se lavaron con PBS 10% y fijadas por 20 min con paraformaldehído 4%. A continuación se lavaron y permeabilizaron con Tritón x-100 0,1% por 10 min. Una vez terminado el tiempo se lavaron con PBS 10% y se bloquearon con BSA al 3% por 1 h. Luego se volvieron a lavar y se incubaron con anticuerpos primarios para NLRP3 (1:50) y ASC (1:50) en BSA durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron las células y se colocaron por 2 h los anticuerpos secundarios Alexa Fluor® anti-goat y anti-rabbit (1:400), además de Hoescht (1:100) para marcación nuclear. Finalmente, se volvieron a lavar y los cubreobjetos se colocaron sobre un portaobjetos con DAKO hasta que estuviera seco. Las imágenes fueron capturadas por microscopía confocal en aumentos 10x y 40x. Se realizaron 14 cortes transversales desde la base hasta el ápice de la célula para realizar los z-stack y posteriormente la reconstrucción en 3D.

5.6 Cuantificación de IL-1 β por ELISA

La cuantificación de IL-1 β se realizó por kit de ELISA a partir del medio de cultivo celular. Posterior a cada tratamiento, el medio se centrifugó a 2000 rpm (centrífuga Hermle Z 306) por 5 min posterior a su recolección. Se siguió la metodología de las instrucciones del kit (50), sin diluir las muestras. Los experimentos se realizaron con el medio de cultivo fresco del mismo día o del recolectado el día anterior al término de cada estímulo. El ELISA corresponde a un tipo sándwich, que utiliza dos anticuerpos para la detección de IL-1 β en medio de cultivo celular. Los resultados se expresaron en pg IL-1 β /mL y se normalizaron con respecto a las proteínas celulares totales, quedando expresado en pg IL-1 β / μ g de proteínas. Las proteínas totales del lisado se cuantificaron por el método de Bradford. Es importante destacar que la normalización de los gráficos con respecto a las proteínas totales, se debe a que los estímulos utilizados pueden generar cambios en la síntesis y secreción proteica en el FC.

5.7 Actividad de caspasa-1

Para determinar la actividad de la caspasa-1 se utilizó un kit comercial (Abcam) (51). Para ello se estimularon las células con LPS 8h + ATP 16h o LPS 8h + Ang II 16h y sus respectivos controles. Una vez finalizado el estímulo se realizó el kit según las instrucciones del fabricante. Éste experimento se basa en el hecho de que caspasa-1 activa (intracelular) reconoce y escinde una secuencia específica de aminoácidos y es posible cuantificar su actividad, a través del uso del sustrato que fluoresce al ser escindido por esta proteasa cuando está activa. El sustrato corresponde a YVAD-AFC: tetrapéptido unido a una cumarina (AFC) que al ser cortada emite fluorescencia a 505 nm.

5.8 Citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo utilizando un kit comercial para lactato deshidrogenasa (LDH) (Thermo) (52). El kit utilizó como control de liberación de LDH máximo, la actividad de LDH al inducir la lisis celular de los FC con buffer de lisis. A partir de los resultados obtenidos se calculó el % de citotoxicidad de los compuestos utilizados.

5.9 Silenciamiento de NLRP3

NLRP3 se silenció utilizando NLRP3 Select Silencer® (Thermo) (53). El protocolo de transfección se realizó según las instrucciones del fabricante. El siRNA y el scramble se utilizaron en concentración final de 5 nM y 3 µM respectivamente. El péptido bloqueador fue co-incubado con el anticuerpo de NLRP3 en una concentración final de (1:40).

5.10 Inmunoprecipitación (IPP)

La IPP se realizó con agarosa unida a un anticuerpo anti-ubiquitina. La formación de este complejo se realizó por agitación suave por 2 h a temperatura ambiente. Una vez formado ese complejo se agregaron las muestras. Estas muestras se obtuvieron de la lisis celular de las células tratadas con LPS entre 0 y 24 h. El complejo más las muestras se co-incubaron toda la noche en agitación suave a 4°C. Al día siguiente, se lavaron con buffer de lisis los complejos formados y se realizó un gel. Finalmente se reveló contra pro-IL-1β y se realizaron los controles INPUT y OUTPUT de la técnica.

5.11 Análisis estadístico

Los datos se analizaron por ANOVA de una vía, con post-test de Dunnett. Los valores graficados corresponden a los promedios \pm error estándar medio (SEM). Los datos presentados corresponden al menos a tres experimentos independientes. Se consideró diferencia estadísticamente significativa $p < 0,05$.

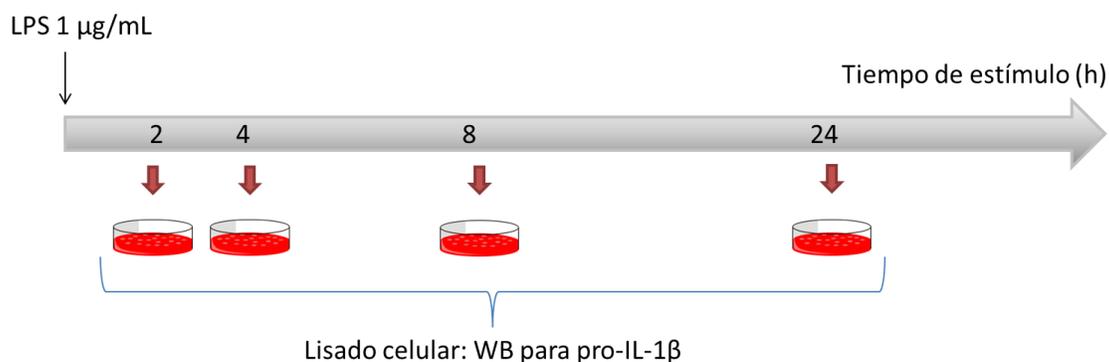
6. RESULTADOS

6.1 Expresión de los componentes de inflammasoma NLRP3 en FC

Se validó el modelo celular utilizado, primero se detectó la expresión de los componentes del sistema del inflammasoma. Para ello se determinó la expresión basal e inducida por LPS (señal 1), de los niveles de las proteínas: pro-IL-1 β , NLRP3, ASC y pro-caspasa-1 por WB.

6.1.1 Expresión de pro-IL-1 β en los FC

Se determinó la expresión de la citoquina pro-IL-1 β inducida por LPS 1 μ g/mL entre 0 y 24 h a través de WB (**Esquema 1**).



Esquema 1

Los resultados muestran que los niveles basales de pro-IL-1 β en los FC son muy bajos. Sin embargo, al estimular con LPS aumentaron los niveles de esta citoquina, logrando un máximo significativo a las 8 h y luego un decaimiento de la señal a las 24 h (**Fig. 2**). El tiempo de plaqueo de 24 h (24c, placa control sin estímulo incubada por 24 h) no indujo por sí solo cambios en la expresión de pro-IL-1 β . Se anexan imágenes representativas de la expresión de pro-IL-1 β por WB con mayor y menor exposición (ver **Figura anexa 1**).

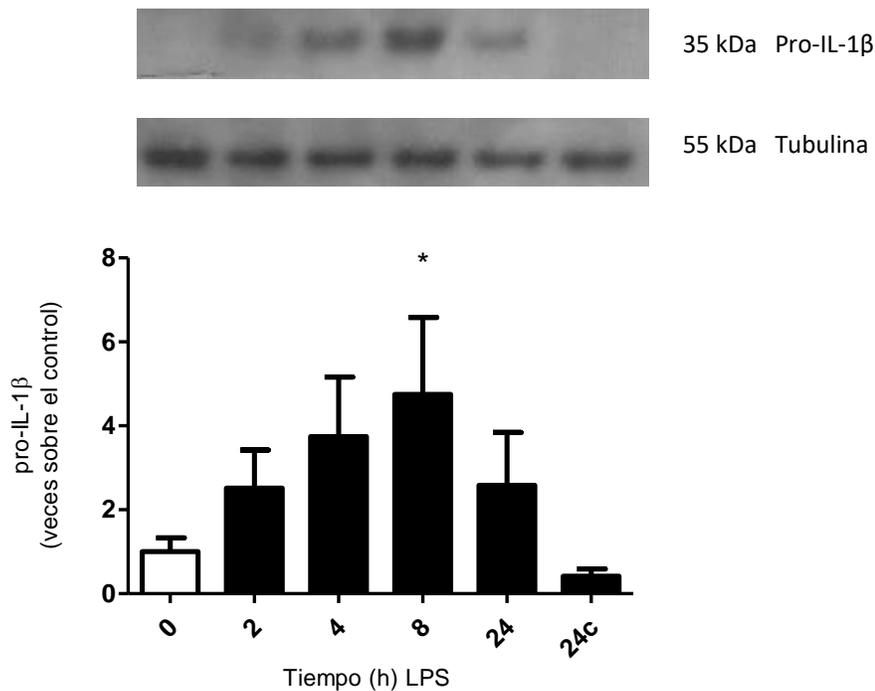


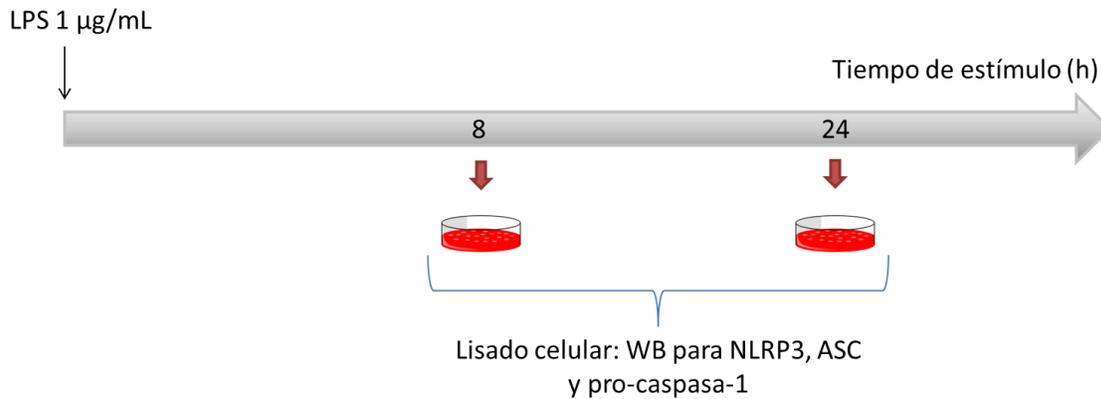
Figura 2. Nivel de pro-IL-1 inducida por LPS. FC se estimularon con LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ entre 0 y 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de estímulo se rescató el lisado celular y se realizaron WB para pro-IL-1 β . * $p < 0,05$ vs control 0 h. $n = 4$ experimentos independientes. Valores promedios \pm SEM.

Con respecto al decaimiento de la expresión de pro-IL-1 β evidenciado a las 24 h, se realizaron experimentos adicionales para determinar que ocurría con la pro-IL-1 β que se acumulaba en el citosol y no se activaba. Se propuso que esta debía decaer producto de los mecanismos de degradación de proteínas: vía proteosomal o por autofagia (ver **Anexo 2**).

A partir de estos resultados se fijó 8h de tratamiento con LPS (tiempo de máxima expresión de pro-IL-1 β) como el tiempo de estímulo con el cual se realizarían los siguientes experimentos.

6.1.2 Expresión de NLRP3, ASC y pro-caspasa-1 en FC

Para determinar la expresión de las proteínas que conforman el inflamasoma NLRP3, los FC se estimularon con LPS 1µg/mL entre 0 y 24 h (**Esquema 2**).



Esquema 2

Los resultados muestran que los FC presentan niveles basales de las tres proteínas: NLRP3, ASC y pro-caspasa-1. Sin embargo, el estímulo con LPS no generó cambios estadísticamente significativos en los niveles de ninguna de las tres proteínas (**Fig. 3**).

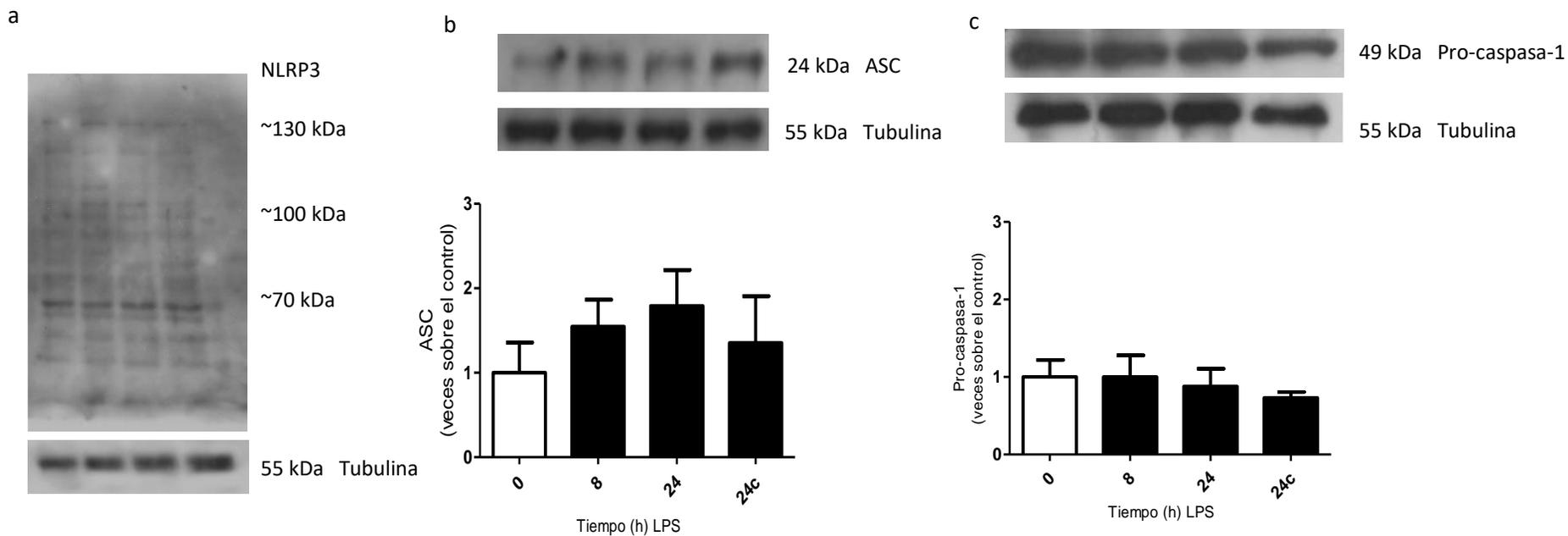


Figura 3. Expresión de NLRP3, ASC y caspasa-1 inducidos por LPS. FC se estimularon con LPS 1 μ g/mL entre 0 y 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de estímulo se rescató el lisado celular y se realizaron WB para a) NLRP3, b) ASC y c) pro-caspasa-1. b) $p=0,6210$ y c) $p=0,8273$ vs control 0h. $n=3$ experimentos independientes. Valores promedios \pm SEM.

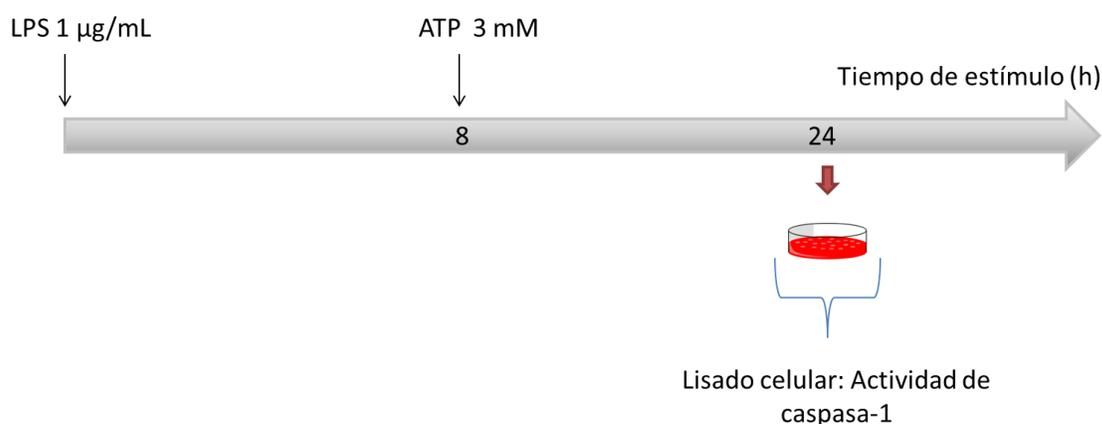
Los resultados de esta sección muestran que basalmente hay expresión de NLRP3, ASC y pro-caspasa-1. No obstante, pro-IL-1 β , el principal blanco del inflamasoma, debe ser inducido por una señal 1 en los FC.

6.2 Activación del inflamasoma en FC: ATP como señal 2

Una vez establecido que los FC sintetizan pro-IL-1 β y expresan las proteínas que componen el inflamasoma, se determinó si este fenotipo celular era capaz de activar intracelularmente a la enzima caspasa-1 y de secretar IL-1 β .

6.2.1 Activación de caspasa-1 inducida por ATP

Los FC se estimularon por 8 h con LPS 1 μ g/mL y sin cambiar el medio, se adicionó ATP 3 mM por 16 h (**Esquema 3**).



Esquema 3

Una vez transcurrido el tiempo de estímulo total de 24h, se obtuvo el lisado celular y se cuantificó la actividad de caspasa-1, utilizando el compuesto fluorescente YVAD-AFC.

Los resultados demuestran que ATP 16h y que LPS 8h + ATP 16h aumentan significativamente la actividad de caspasa-1 con respecto a los controles (**Fig. 4**).

Sin embargo, LPS 24 h no aumentó la activación de caspasa-1 con respecto al control.

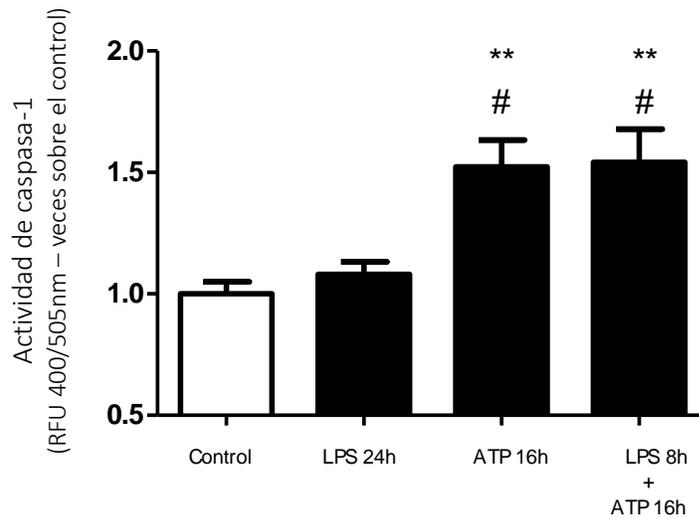
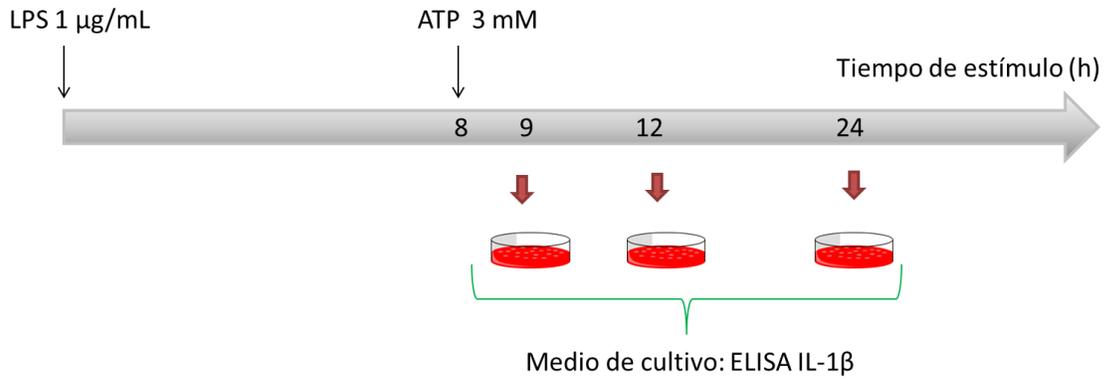


Figura 4. Actividad de caspasa-1 mediada por ATP. FC se estimularon con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 8 h y luego con ATP (3 mM) por 16 h. La actividad de caspasa-1, en células vivas, se determinó por un método fluorométrico. ** $p < 0,01$ vs control, # $p < 0,05$ vs LPS. $n = 6$ experimentos independientes. Valores promedios \pm SEM.

6.2.2 Secreción de IL-1 β inducida por ATP

Una vez comprobado que la clásica señal 2 de activación del inflamasoma, ATP, inducía una mayor actividad de caspasa-1, se determinó si también inducía la secreción de IL-1 β , principal diana y producto de la activación de caspasa-1, hacia el medio de cultivo celular. Los FC se estimularon con LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 8 h y luego se les adicionó ATP 3 mM por 16 h (**Esquema 4**). Terminado el estímulo se recolectó el medio del cultivo y se realizó la cuantificación de IL-1 β por medio de ELISA. Para normalizar los experimentos, se recolectó el lisado celular y se cuantificaron las proteínas por Bradford.



Esquema 4

Los estímulos LPS 8h + ATP 1h y LPS 8h + ATP 4h no generaron un aumento significativo en la secreción de IL-1 β en los FC. Sin embargo, el tiempo de LPS 8h + ATP 16h generó un aumento significativo en la secreción de IL-1 β con respecto a los controles (**Fig. 5a-b**). Por su parte, los estímulos LPS 24h y ATP 16h no indujeron aumentos en la secreción de IL-1 β hacia el medio de cultivo con respecto al control.

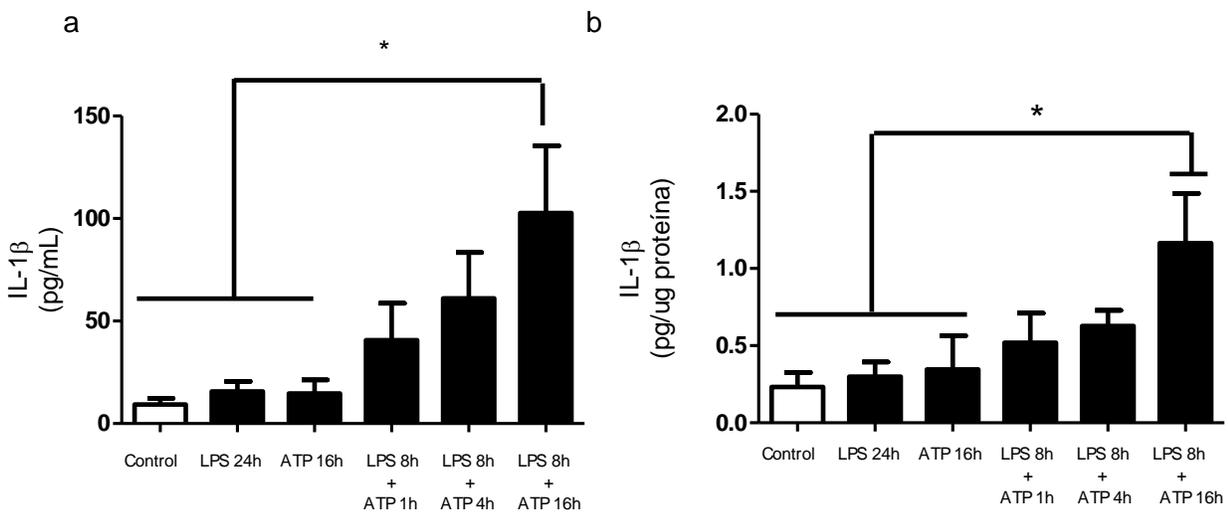


Figura 5. Secreción de IL-1 β mediada por ATP. FC se estimularon con LPS (1 µg/mL) 8 h y luego con ATP (3 mM) por 1, 4 o 16 h. A partir del sobrenadante se realizó un ELISA para IL-1 β . (a) ELISA expresado en pg IL-1 β /mL. (b) ELISA expresado en pg IL-1 β /µg proteína. * $p < 0,05$ vs. controles. $n = 5$ experimentos independientes. Valores promedios \pm SEM.

Los resultados de esta sección corroboran que los FC son capaces de generar la activación de caspasa-1 intracelularmente y secreción de IL-1 β hacia el medio extracelular, al utilizar una clásica segunda señal del inflammasoma: ATP. Es importante destacar que ATP 16 h por sí solo puede aumentar la actividad de caspasa-1 pero, no induce la secreción de IL-1 β . Esta diferencia sería debido a que ATP activa a caspasa-1, pero no induce la síntesis de pro-IL-1 β . Al no expresarse la diana pro-IL-1 β , caspasa-1 activa no podría escindir su blanco ni generar su producto IL-1 β .

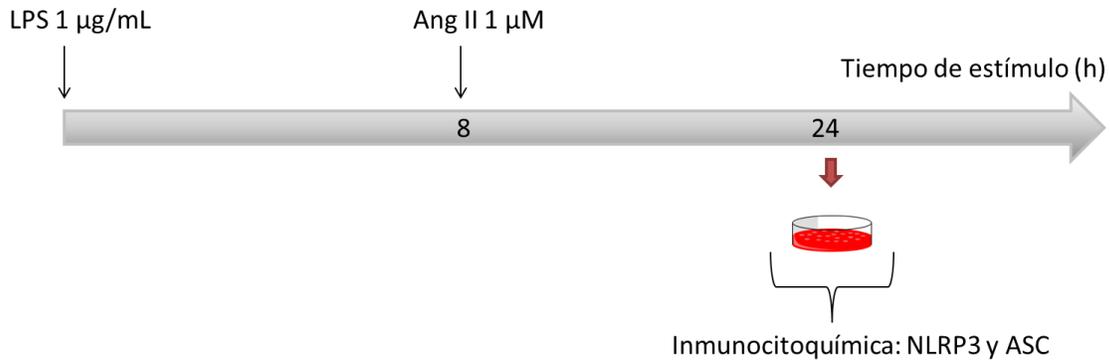
6.3 Angiotensina II: activador del inflammasoma en los FC

Una vez corroborado que los FC de ratas expresan las proteínas que conforman el inflammasoma y que al utilizar una conocida señal 2, hay activación de caspasa-1 y secreción de IL-1 β al medio de cultivo celular, se procedió a demostrar la hipótesis de este trabajo. Para dar respuesta a esta interrogante, se demostrará que Ang II activa al inflammasoma a través de tres diferentes metodologías: colocalización de NLRP3 y ASC en el sector perinuclear, actividad de caspasa-1 y secreción de IL-1 β .

6.3.1 Ang II induce la colocalización de NLRP3 y ASC

Es conocido que al activarse NLRP3 (receptor intracelular), éste se moviliza y se colocaliza con ASC en el sector perinuclear para generar su ensamblaje y así conformar el inflammasoma NLRP3 activo (23).

Los FC se estimularon con LPS 1 μ g/mL durante 8 h y luego con Ang II 1 μ M por 16 h (**Esquema 5**). Terminado el estímulo, las células se fijaron, permeabilizaron y se les incubó con los anticuerpos primarios y secundarios respectivos. Finalmente se capturaron imágenes por microscopía confocal para cada condición y se realizaron cortes para hacer una reconstrucción en 3D.



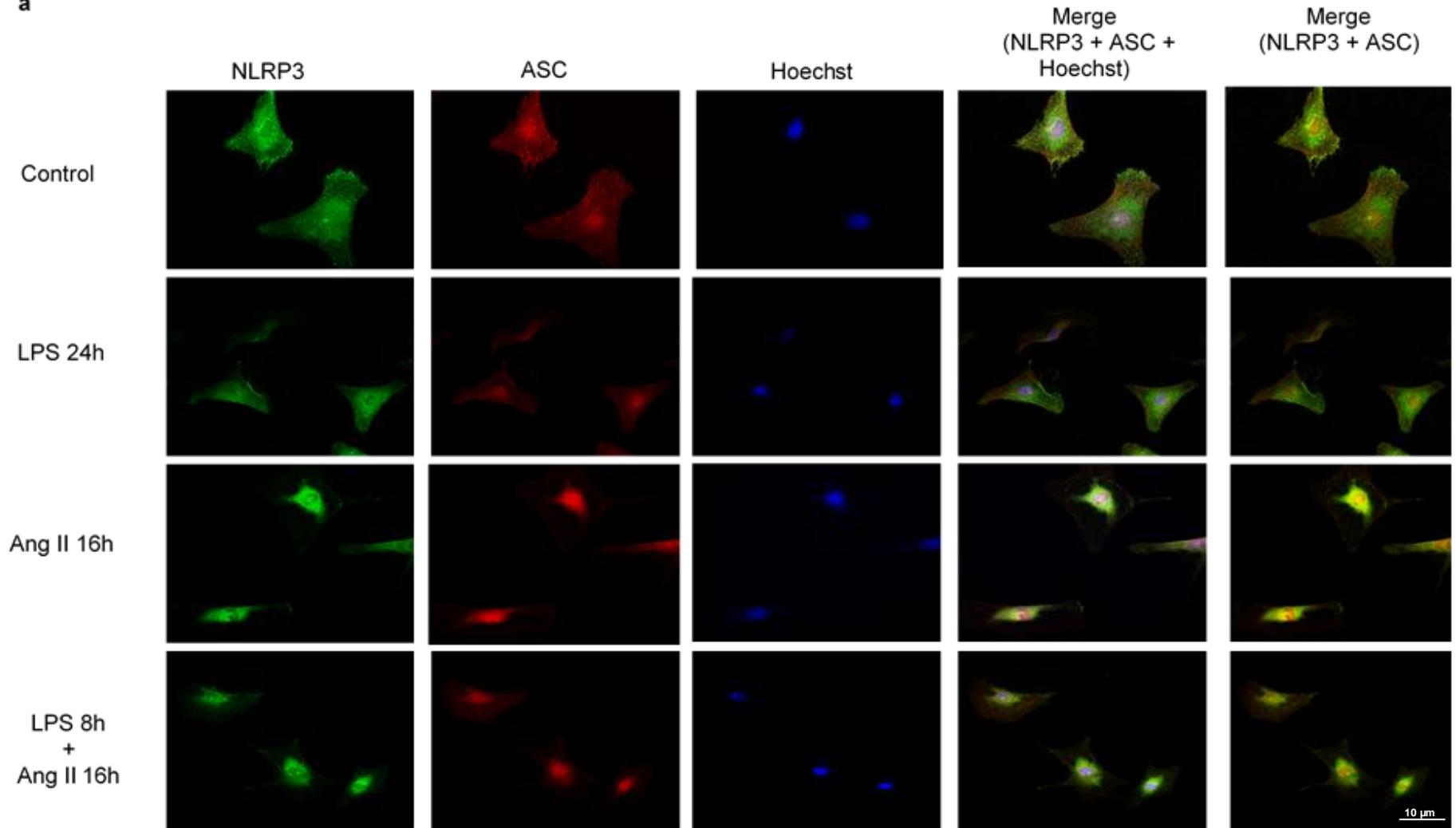
Esquema 5

Las imágenes obtenidas en aumento 40X, muestran que en la situación control las proteínas NLRP3 (verde) y ASC (rojo) se ubican homogéneamente en la célula. Sin embargo, al estimular con Ang II 16h o LPS 8h + Ang II 16h ocurre una redistribución y concentración de ambas proteínas en el sector cercano al núcleo (azul) (**Fig. 6a**), lo que es corroborado en la combinación de las imágenes, donde se observa colocalización de NLRP3 y ASC en el sector perinuclear (**Fig. 6b**).

Para cuantificar el porcentaje de células que mostraban colocalización, se capturaron imágenes en aumento 10x y se contabilizó las células que presentaban la colocalización de NLRP3 y ASC. Esta cuantificación revela que Ang II 16h y LPS 8h + Ang II 16h inducen la colocalización de ambas proteínas de manera significativa con respecto al control (**Fig. 6c**).

Finalmente, para corroborar que Ang II promovía la movilización de NLRP3 y ASC hacia el mismo sector intracelular, se realizó una reconstrucción en 3D utilizando las imágenes obtenidas de 14 cortes (z-stack), que abarcaban desde la base de la célula hasta el ápice de ésta. Consistente con lo anterior, se observa en la reconstrucción en 3D de una célula estimulada con LPS 8h + Ang II 16h (condición Merge de NLRP3, ASC y núcleo), la localización de NLRP3 y ASC en el sector donde se ubica el núcleo (**Fig. 6d-e**). Se incluye la reconstrucción en 3D y el merge de la condición control (**Fig. 6f**).

a



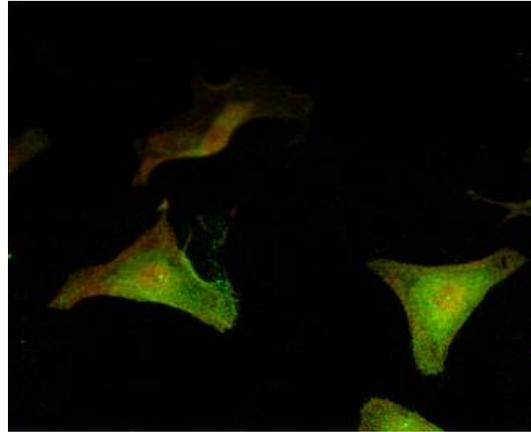
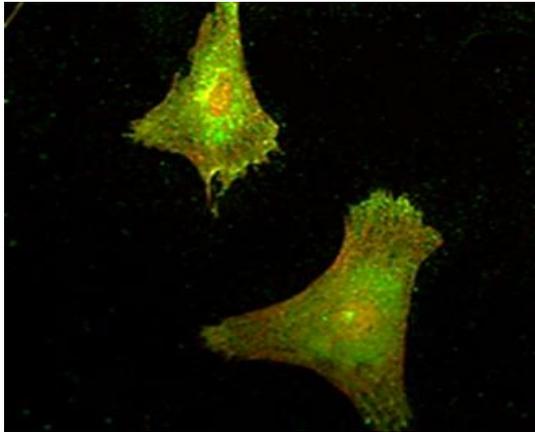
b

Imagen ampliada de Merge: NLRP3 + ASC

+20% brillo
-20% contraste

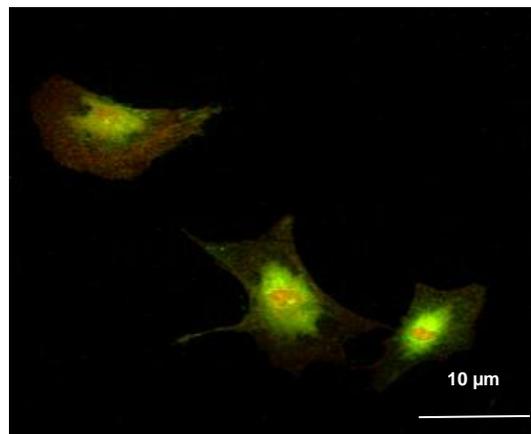
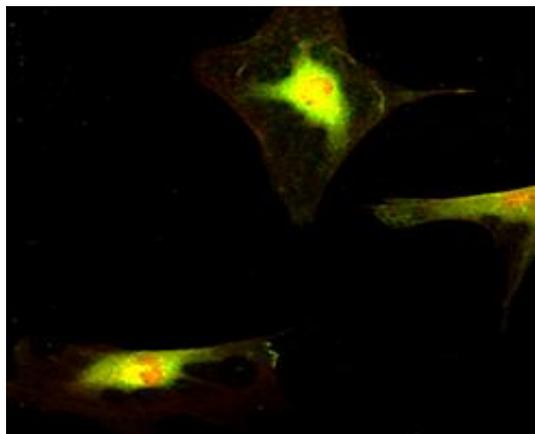
Control

LPS 24h

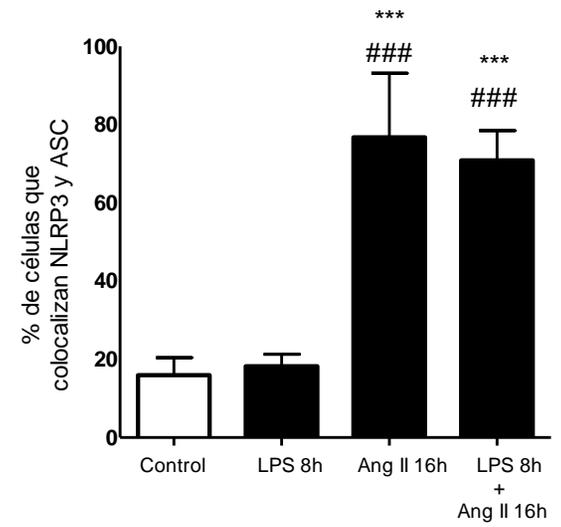


Ang II 16h

LPS 8h + Ang II 16h

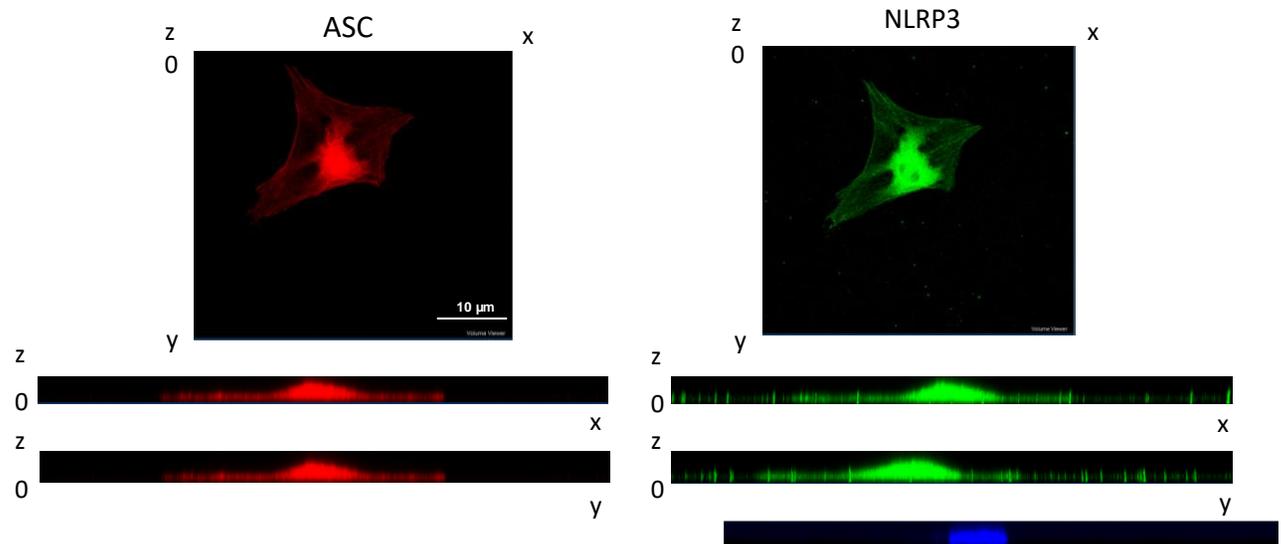


c

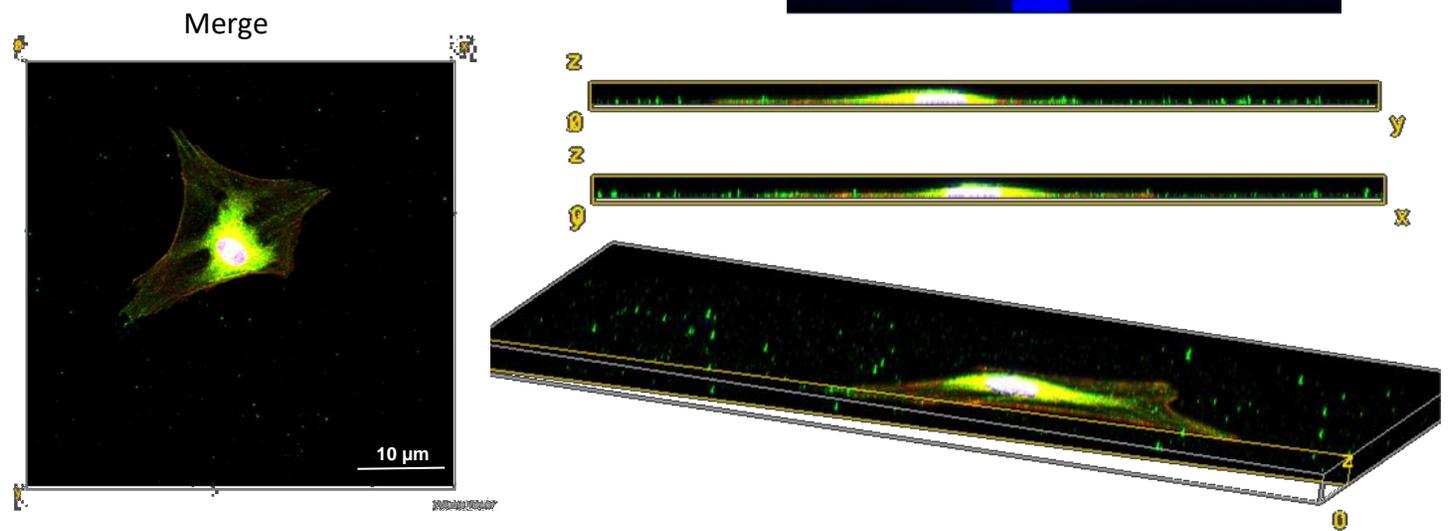


d

Reconstrucción 3D: Z-stack
LPS 8h +Ang II 16h



e



f

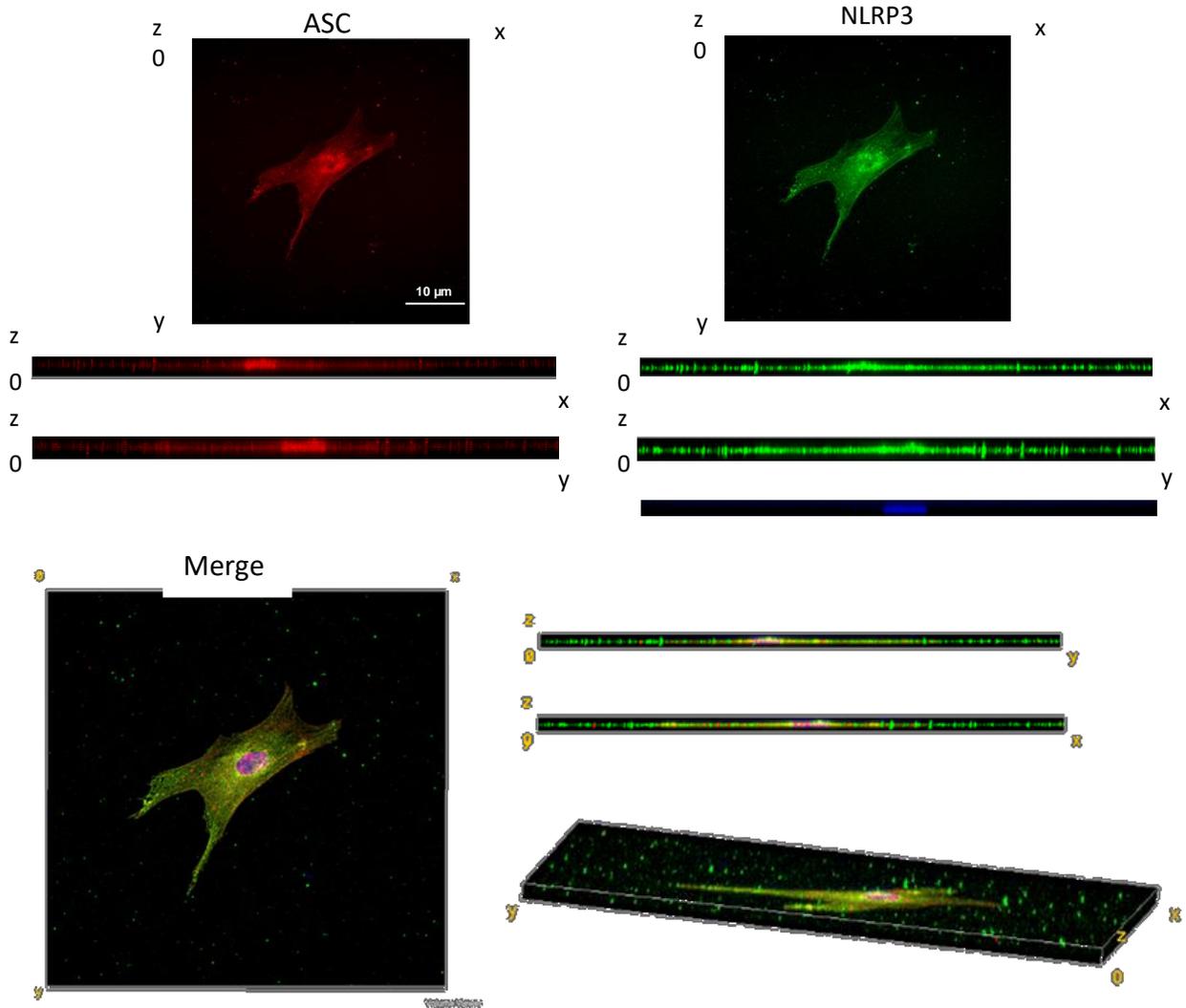
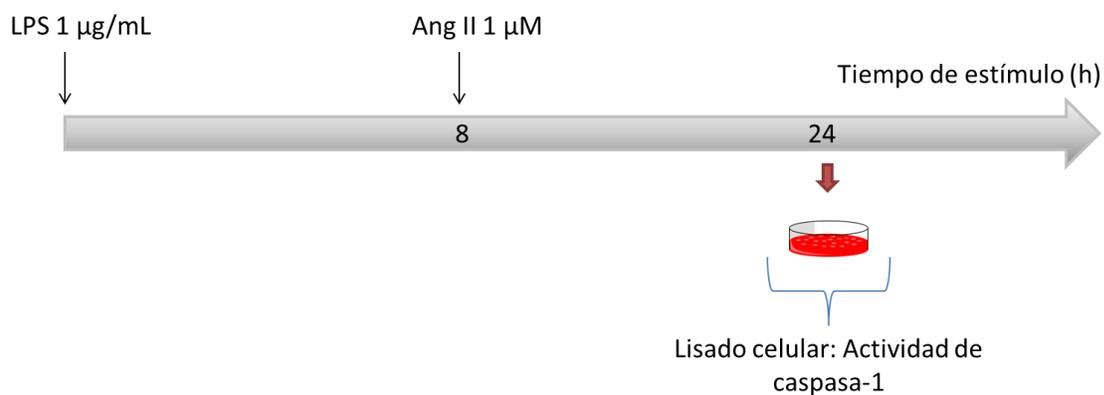
Reconstrucción 3D: Z-stack
Control

Figura 6. Ang II induce la colocalización de NLRP3 y ASC. FC se estimularon con LPS (1 μg/mL) 8 h y luego con Ang II (1 μM). Se fijaron las células y se realizaron inmunocitoquímicas. a) Inmunocitoquímica NLRP3 (verde), ASC (verde) y núcleo (azul). b) Imágenes ampliadas con +20% de brillo y -20% de contraste de la condición Merge de LPS 8h + Ang II 16h. c) cuantificación del porcentaje de células que colocalizan NLRP3 y ASC. d) Reconstrucción en 3D de imagen obtenida con estímulo de LPS 8h + Ang II 16h ASC y NLRP3 por separado. e) Reconstrucción en 3D de la condición Merge de LPS 8h + Ang II 16h. f) Reconstrucción en 3D de la condición Control *** p<0,001 vs. Control, ### p<0,001 vs. LPS 8h. n=4 experimentos independientes. Valores promedios ± SEM.

6.3.2 Ang II induce la actividad de caspasa-1

Para establecer si Ang II producía un aumento en la actividad de caspasa-1, se estimularon FC con LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 8h, seguido de Ang II 1 μM por 16 h (**Esquema 6**). Concluido el tiempo, se obtuvo el lisado celular y se cuantificó la actividad de caspasa-1 usando un sustrato fluorescente.



Esquema 6

Tanto Ang II 16h como LPS 8h + Ang II 16h generaron un aumento significativo en la actividad de caspasa-1 con respecto al control (**Fig. 7**). Sin embargo, LPS 24h no provocó cambios en la actividad de caspasa-1.

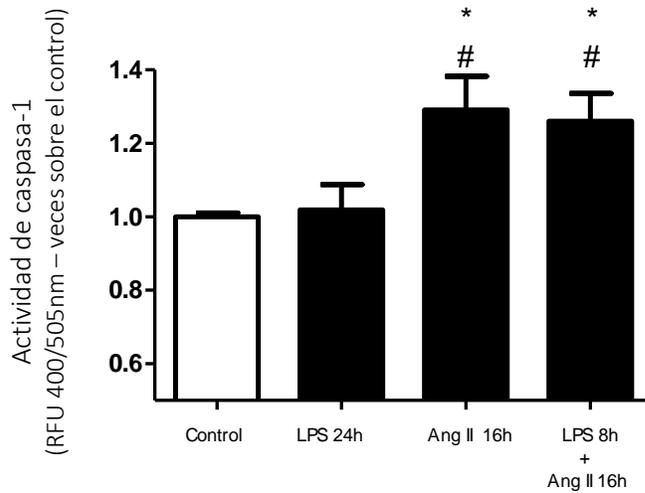
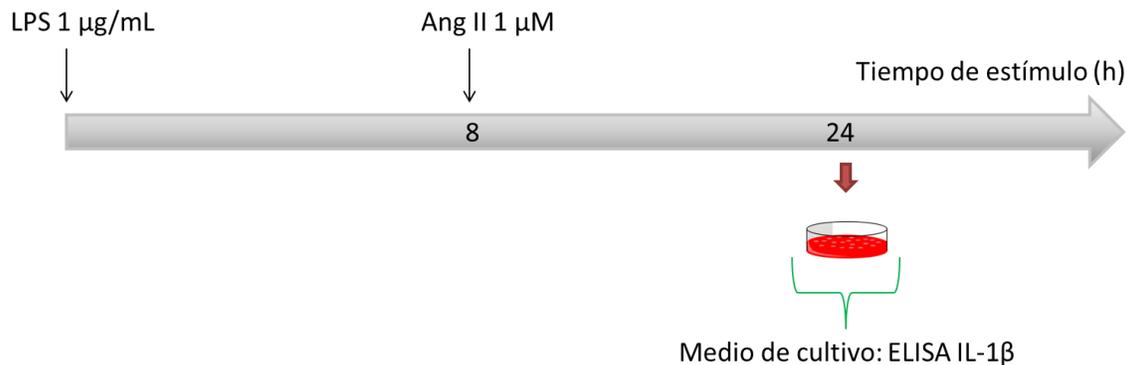


Figura 7. Actividad de caspasa-1 mediada por Ang II. FC se estimularon con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 8h y luego con Ang II (1 μM) por 16h. A partir de las células vivas, se realizó un ensayo de actividad de caspasa-1 fluorométrico. * $p < 0,05$ vs control, # $p < 0,05$ vs LPS. $n = 6$ experimentos independientes. Valores promedios \pm SEM.

6.3.3 Ang II induce la secreción de IL-1 β

Como es sabido, la secreción de IL-1 β es el evento final que demuestra la activación del inflammasoma. Para establecer si IL-1 β era secretada hacia el medio extracelular, se estimularon los FC con LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 8 h y luego con Ang II 1 μM por 16 h (**Esquema 7**). Se recolectó el medio de cultivo y se cuantificó la citoquina por medio de ELISA.



Esquema 7

Los resultados demuestran que sólo el estímulo conjunto de LPS 8h + Ang II 16h induce la secreción de IL-1 β al medio de cultivo celular de manera significativa con respecto al control (Fig. 8a y 7b). Es importante destacar que tanto LPS 24h como Ang II 16h, no indujeron por si solos la secreción de la citoquina.

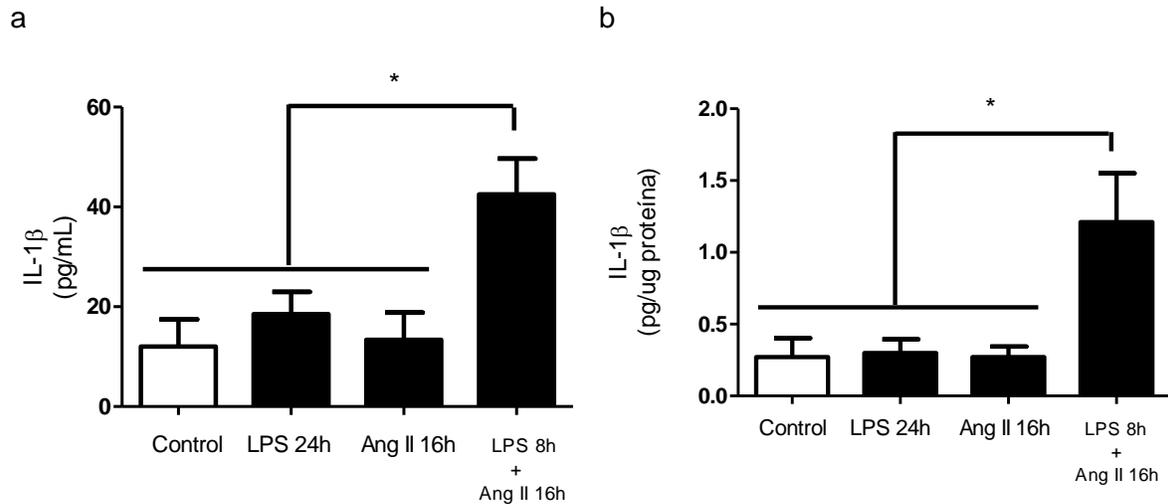


Figura 8. Secreción de IL-1 β mediada por Ang II. FC se estimularon con LPS (1 μ g/mL) 8 h y luego con Ang (1 μ M) por 16 h. A partir del sobrenadante se realizó un ELISA para IL-1 β . a) ELISA expresado en pg IL-1 β /mL. b) ELISA expresado en pg IL-1 β / μ g proteína. * p<0,05 vs. Controles. n=7 experimentos independientes. Valores promedios \pm SEM.

Las tres metodologías utilizadas muestran que Ang II es un activador del inflamasoma en los FC. Ang II por si sola induce la colocalización de NLRP3 y ASC y la actividad de caspasa-1. Sin embargo, no puede inducir por sí sola la secreción de IL-1 β , se requiere de la acción de la señal 1 para la síntesis de pro-IL-1 β . Por lo tanto, Ang II sería una señal 2 de activación del inflamasoma.

Finalmente, es importante destacar que LPS sólo genera la síntesis de pro-IL-1 β y no genera colocalización de NLRP3 y ASC, activación de la caspasa-1, ni secreción de IL-1 β .

6.3.4 Citotoxicidad de Ang II

De manera adicional a las tres metodologías mencionadas, se comprobó que el esquema de estimulación utilizado no causara piroptosis. Este tipo de muerte celular se caracteriza por hinchazón y ruptura de la membrana plasmática, causando el derramamiento del contenido intracelular al medio extracelular. La piroptosis es inducida por la activación del inflamasoma y de caspasa-1 (54). Por consiguiente, es importante determinar si los FC experimentan este fenómeno al igual que las células de tipo inmune o si la activación del inflamasoma no genera la muerte celular, perdurando la viabilidad celular. El ensayo más utilizado, para comprobar si ocurre este tipo de muerte, es la cuantificación de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH).

Utilizando el mismo esquema de estimulación, se determinó el porcentaje de sobrevivencia para las diferentes condiciones de estímulos utilizados. Los resultados demuestran que ninguno de los estímulos utilizados anteriormente generaría citotoxicidad y por consiguiente, las células no experimentarían piroptosis (**Fig. 9**).

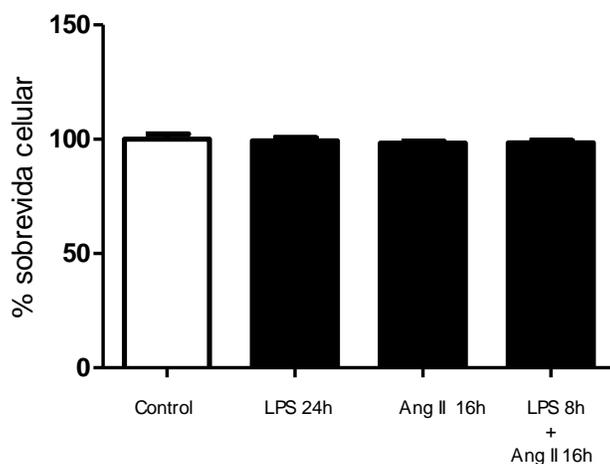


Figura 9. Citotoxicidad inducida por Ang II. FC se estimularon con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 8h y luego con Ang II (1 μM) por 16 h. A partir de las células vivas, se realizó un ensayo de citotoxicidad por secreción de LDH al medio de cultivo, el resultado se expresa en % de sobrevivencia celular. $p=0,8375$ vs control. $n=3$ experimentos independientes. Valores promedios \pm SEM.

6.4 Señalización de Ang II que induce la activación del inflamasoma.

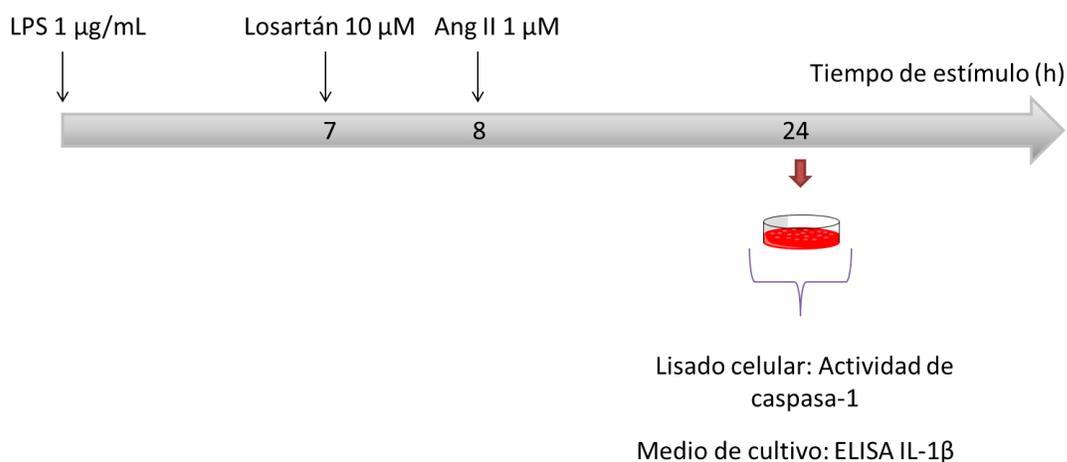
Como se planteó originalmente en este trabajo, Ang II desencadena una cascada transduccional que lleva al aumento de Ca^{2+} en el citosol, proveniente desde el retículo, la que activaría al inflamasoma en los FC.

Para demostrar que este evento era clave en la activación del inflamasoma y para determinar la señalización intracelular, que provocaba la salida de Ca^{2+} desde el retículo hacia el citosol, se utilizaron distintos antagonistas e inhibidores: Losartán, U73122, 2-APB y BAPTA-AM.

6.4.1 Losartán previene la activación del inflamasoma mediada por Ang II

Para establecer si Ang II inducía la activación del inflamasoma al interaccionar con el receptor de angiotensina II de tipo 1 (AT1), se utilizó el antagonista de AT1: Losartán.

FC se estimularon 7 h con LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y sin cambiar medio, se agregó Losartán 10 μM durante 1 h. Transcurrido ese tiempo se estimuló con Ang II 1 μM por 16 h. A partir del lisado celular se midió la actividad de caspasa-1 y a partir del medio de cultivo se cuantificó la secreción de IL-1 β por ELISA (**Esquema 8**).



Esquema 8

Los resultados definen que Losartán previene el aumento de actividad de caspasa-1 (**Fig. 10a**) y la secreción de IL-1 β hacia el medio de cultivo (**Fig. 10b-c**) inducidos por Ang II.

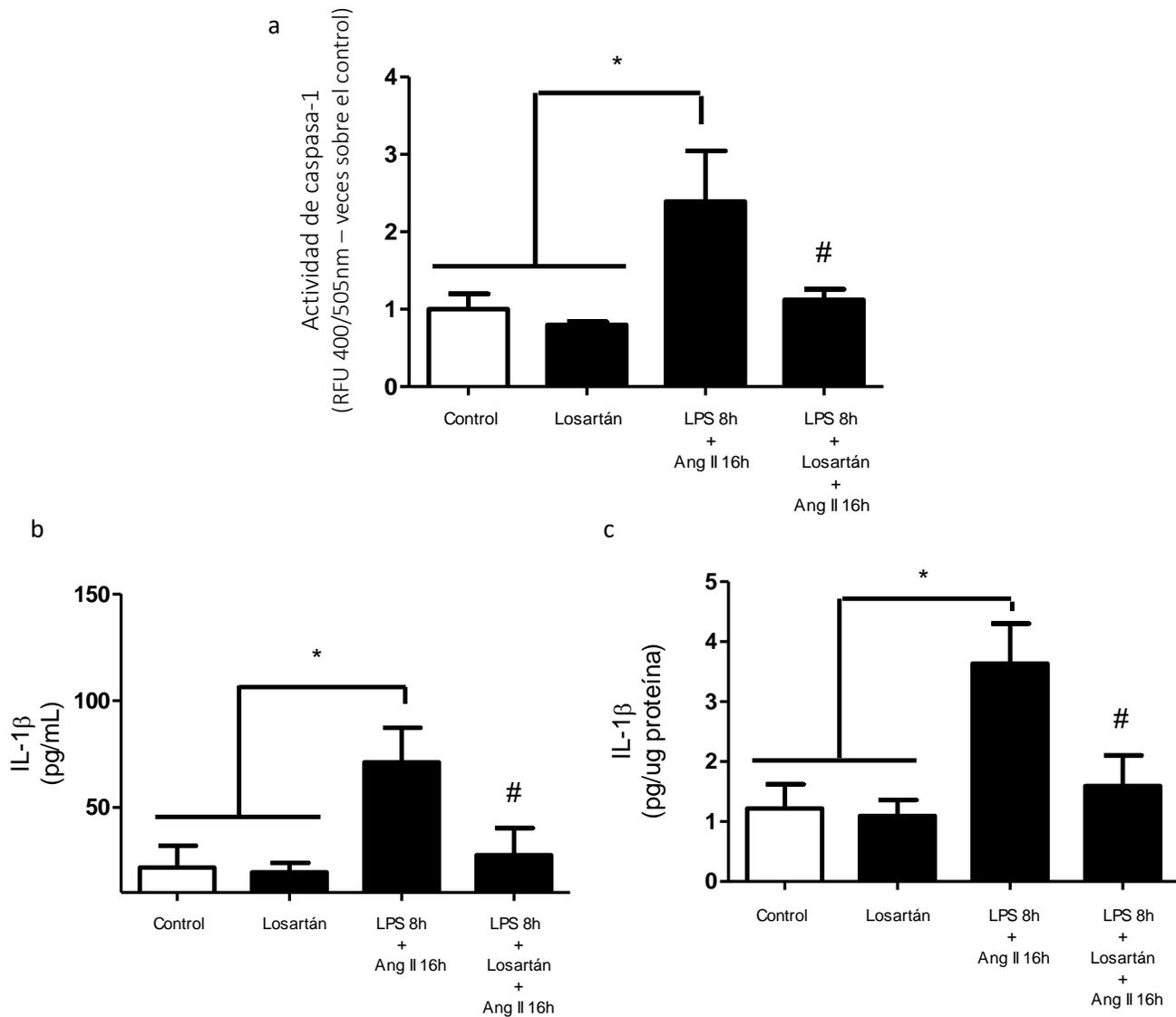


Figura 10. Losartán previene la activación del inflammasoma inducida por LPS + Ang II. FC se estimularon con LPS (1 μ g/mL) 7h y se preincubaron con Losartán (10 μ M) 1h antes de estimular con Ang (1 μ M) por 16 h. A partir de las células se cuantificó la actividad de caspasa-1 y del sobrenadante se realizó ELISA para IL-1 β . a) Actividad de caspasa-1. b) ELISA expresado en pg IL-1 β /mL. c) ELISA expresado en pg IL-1 β / μ g proteína. * $p < 0,05$ vs. controles, # $p < 0,05$ vs. LPS 8h + Ang II 16h. a) $n = 6$; b) $n = 5$ experimentos independientes. Valores promedios \pm SEM.

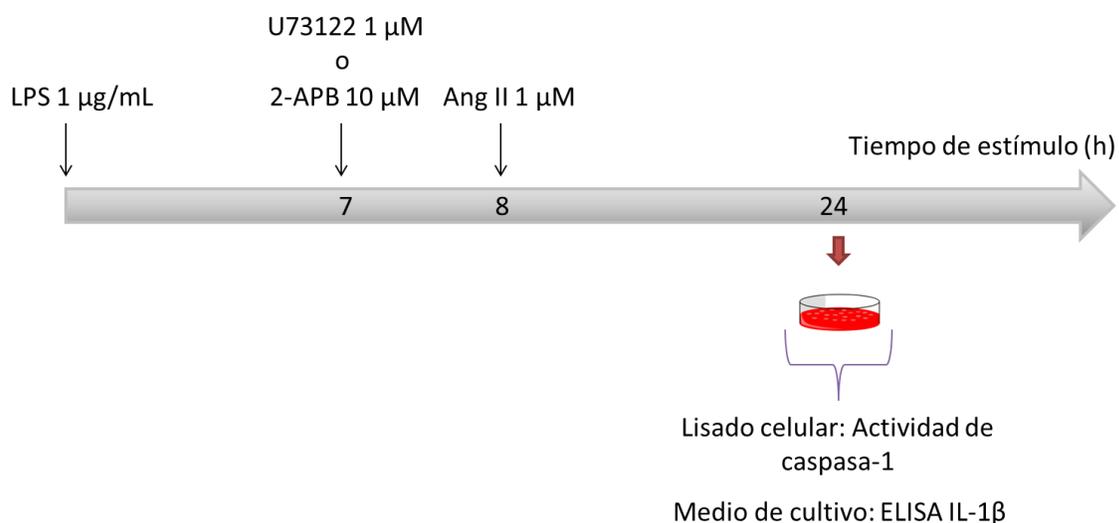
6.4.2 Participación de PLC y de IP3R en la activación del inflamasoma mediada por Ang II

Una vez establecido que Ang II interactúa con AT1 para inducir la activación del inflamasoma, se continuó con la intervención de la cascada transduccional que desencadenaría la activación de este receptor.

Es conocido que el inflamasoma puede activarse al haber un aumento en la concentración de Ca^{2+} en el citosol y también se sabe que este ión provendría desde el retículo y no desde el medio extracelular para activar al inflamasoma(55).

El receptor AT1 al activarse puede acoplar a la proteína G α q y desencadenar la cascada de señalización: G α q – PLC – IP3 + DAG – IP3R – Ca^{2+} . Para intervenir esta señalización se propuso impedir la activación de la fosfolipasa C (PLC) e inhibir los procesos dependientes de IP3 utilizando U73122 y 2-APB respectivamente.

Los FC se estimularon por 7 h con LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se pre-estimuló por 1 h con U73122 (1 μM) o 2-APB (10 μM), para finalizar con Ang II 1 μM por 16 h. A partir del lisado celular se midió la actividad de caspasa-1 y al recolectar el medio de cultivo se cuantificó IL-1 β por ELISA (**Esquema 9**).



Esquema 9

Ambos agentes previnieron tanto la actividad de caspasa-1 (**Fig. 11a**) como la secreción de IL-1 β (**Fig. 11b-c**) inducidas por Ang II.

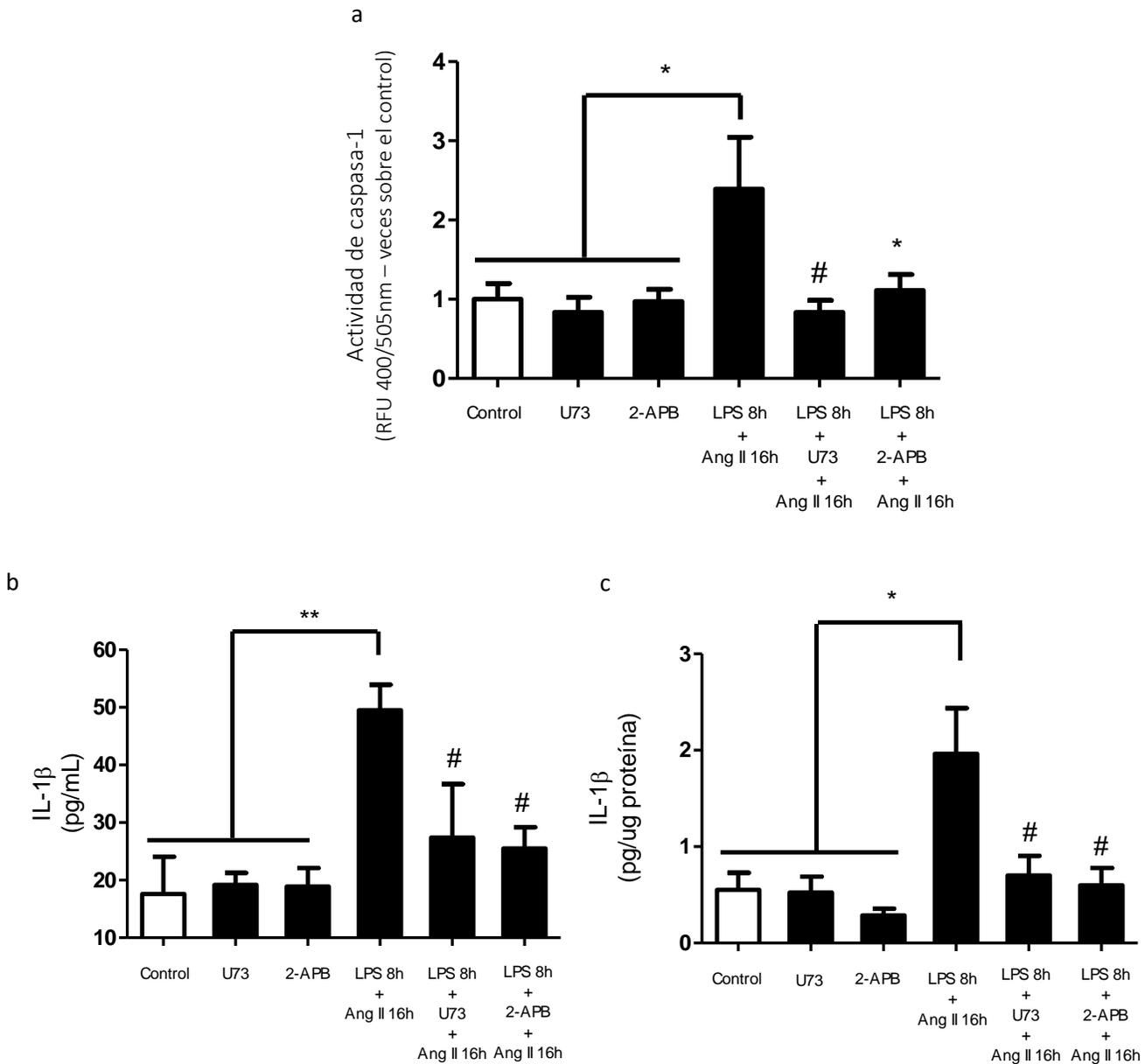
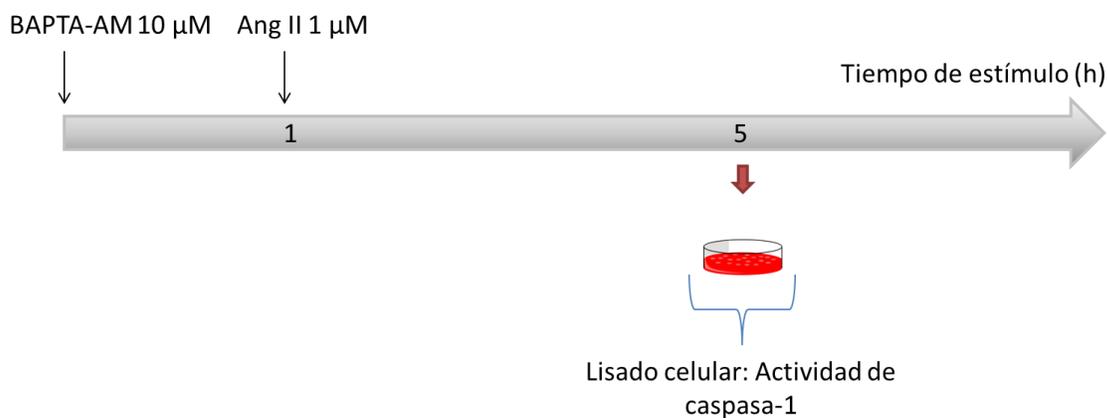


Figura 11. PLC e IP3R participan de la activación del inflamasoma inducida por Ang II. FC se estimularon con LPS (1 μ g/mL) 8 h y se preincubaron con U731222 (1 μ M) o 2-APB (10 μ M) 1 h antes de estimular con Ang (1 μ M) por 16 h. A partir de las células se cuantificó la actividad de caspasa-1 y del sobrenadante se realizó ELISA para IL-1 β . a) Actividad de caspasa-1. b) ELISA expresado en

pg IL-1 β /mL. c) ELISA expresado en pg IL-1 β / μ g proteína. * p<0,05 vs. Controles, ** p<0,01 vs controles, # p<0,05 vs LPS 8h + Ang II 16h. n=6 experimentos independientes. Valores promedios \pm SEM.

6.4.3 BAPTA-AM previene la activación de caspasa-1 inducida por Ang II.

Finalmente, continuando con la intervención de la señalización y para determinar si era exactamente el Ca²⁺, que provenía desde el retículo el agente clave en la activación del inflamasoma, se utilizó el quelante permeable a la célula BAPTA-AM. Los FC se pre-estimularon con BAPTA-AM 10 μ M por 1 h y luego se agregó Ang II 1 μ M por 4 h. Se debe considerar que este experimento se realizó en presencia de medio de cultivo con Ca²⁺. Al completar el tiempo de estímulo se obtuvo el lisado celular y se cuantificó la actividad de caspasa-1 (**Esquema 10**). Es importante aclarar que se cambió el esquema y tiempo de estímulo utilizado debido a que BAPTA-AM provocó la muerte de las células en cultivo a partir de las 6-8 h. Se ajustó el esquema pensando en hacer un tiempo máximo de exposición a BAPTA-AM de 5 h, por lo que sólo se realizó en ensayo de actividad de caspasa-1 y no de secreción de IL-1 β debido a que este último requiere de mayor tiempo de incubación.



Esquema 10

Se observó que BAPTA-AM previene la activación de caspasa-1 inducida por Ang II (**Fig. 12**).

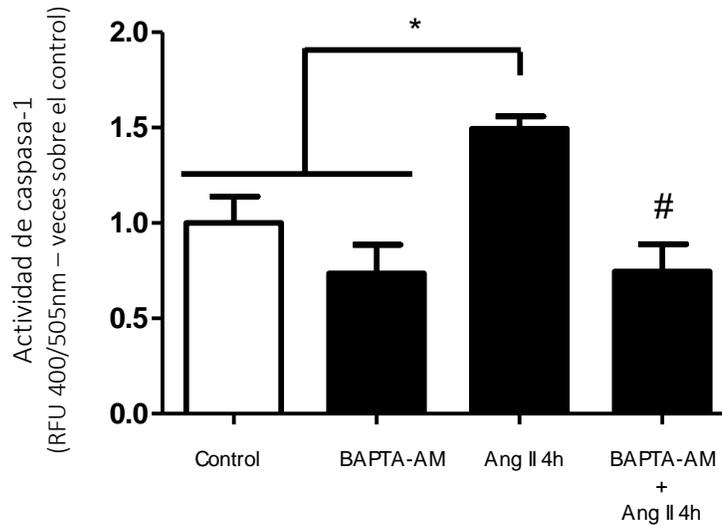


Figura 12. BAPTA-AM previene la activación de caspasa-1 inducida por Ang II. FC se preincubaron con BAPTA-AM (10 μ M) por 1 h, luego se estimuló con Ang (1 μ M) por 4 h. A partir de las células se cuantificó la actividad de caspasa-1. * $p < 0,05$ vs. Controles, # $p < 0,01$ vs Ang II 4h. $n = 5$ experimentos independientes. Valores promedios \pm SEM.

El conjunto de experimentos que se realizaron para intervenir y dilucidar la señalización que desencadena Ang II para inducir la activación del inflamasoma, plantean una secuencia lógica de hechos, que es acorde con lo planteado originalmente en este trabajo de tesis. La señalización propuesta se resume como sigue: Ang II activaría al receptor AT1 expresado en los FC, éste acoplaría a G α q, provocando la activación de PLC. Una vez activo PLC, escindiría a su blanco PIP2 formando IP3 y DAG. Finalmente, IP3 interaccionaría con el IP3R presente en el retículo, induciendo la liberación de Ca²⁺ desde el retículo. El aumento de Ca²⁺ proveniente desde el retículo sería uno de los factores determinantes en la activación del inflamasoma.

6.5 Ang II induce la activación de NLRP3 y caspasa-1

En la literatura se ha demostrado que durante eventos de daño cardiaco, sería NLRP3 el inflammasoma de mayor relevancia activado en los FC y que caspasa-1 sería activado por el ensamblaje de este complejo multiprotéico. Sin embargo, en otros modelos de estudio, se ha descrito la activación y participación de otros receptores intracelulares en la activación inflammasoma, distintos a NLRP3. Asimismo otras enzimas, distintas a caspasa-1, podrían cortar pro-IL-1 β a IL-1 β .

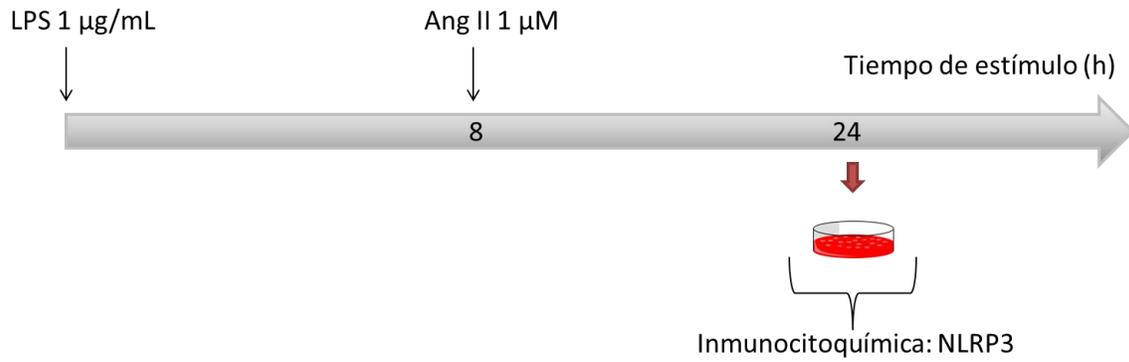
Para definir la participación de NLRP3 y caspasa-1 en los efectos que genera Ang II en el modelo de estudio, se silenció NLRP3 utilizando un siRNA y se inhibió irreversiblemente la caspasa-1 con ac-YVAD-cmk.

Para verificar si el siRNA disminuía la expresión de NLRP3 en nuestro modelo de trabajo, se cuantificó ese silenciamiento calculando la fluorescencia celular total corregida a partir de imágenes capturadas utilizando microscopía confocal.

El siRNA efectivamente disminuye la expresión de NLRP3 en los FC (**Fig. 13^a**), lo que se cuantificó arrojando una disminución significativa de la fluorescencia con respecto al control y al scramble (**Fig. 13^b**). Adicionalmente, se utilizó un control negativo de la técnica: el péptido bloqueador de NLRP3. Este péptido, específico para el anticuerpo utilizado, logró disminuir la fluorescencia con respecto a ambos controles. Asimismo, no se aprecian diferencias estadísticas entre el uso del siRNA y el péptido bloqueador de NLRP3.

Una vez establecida la funcionalidad del siRNA, se cuantificó la secreción de IL-1 β que se producía al estimular los FC, con NLRP3 silenciado, con LPS 8h + Ang II 16h (**Esquema 11**).

Transfección siRNA NLRP3: Lipofectamina → Inmunocitoquímica para NLRP3



Esquema 11

Se pudo observar que, los FC que fueron silenciados con el siRNA para NLRP3, no secretaron IL-1 β al nivel del control (**Fig. 13c-d**).

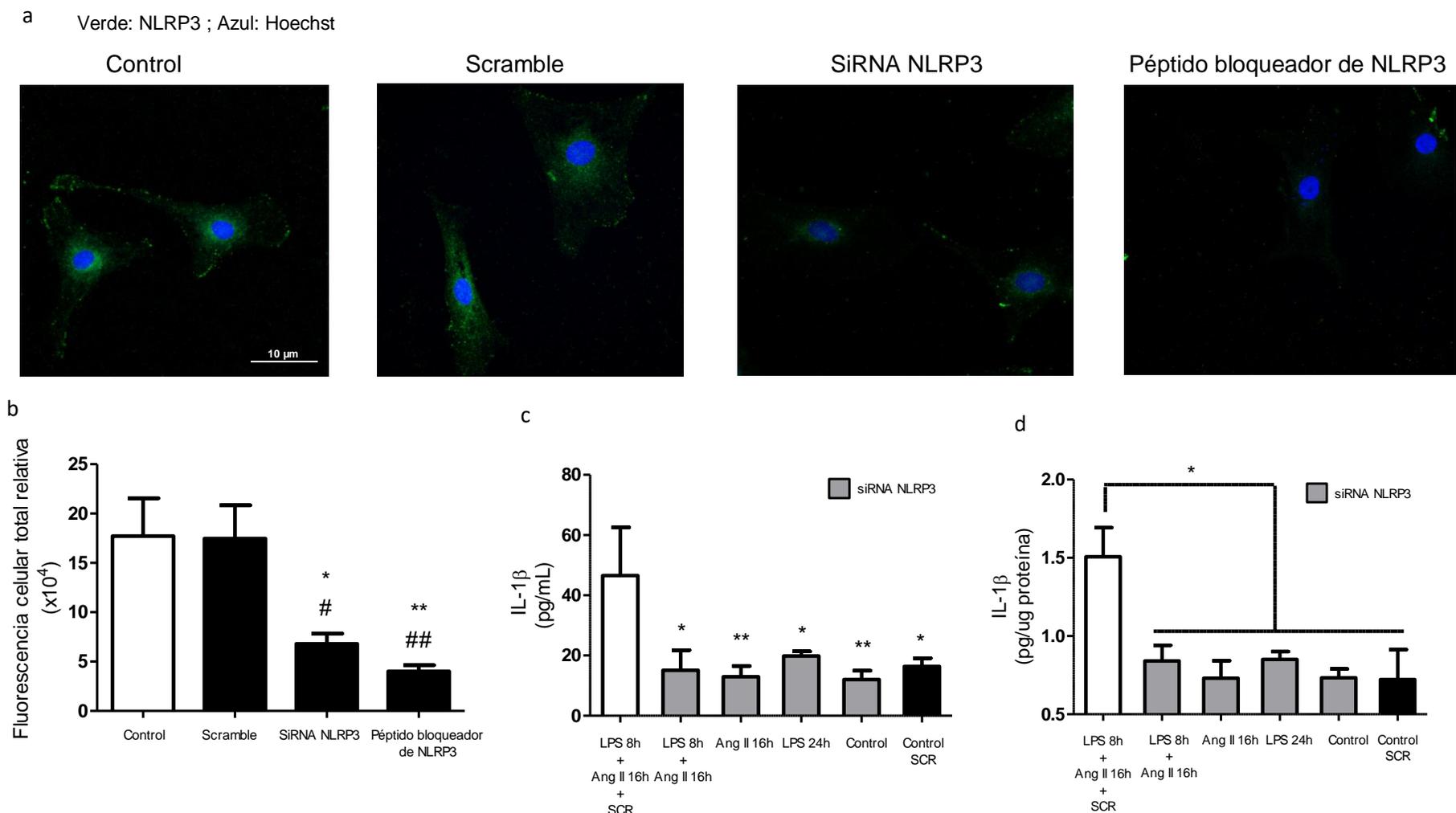
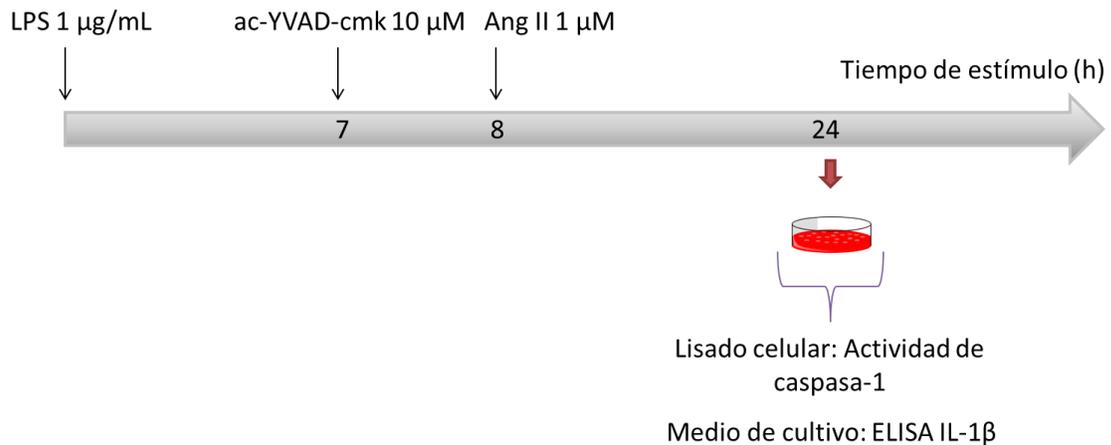


Figura 13. El Silenciamiento de NLRP3 impide la activación del inflamasoma en FC tratados con Ang II. NLRP3 de FC fue silenciado por siRNA. A) Inmunocitoquímica representativa del silenciamiento logrado con el interferente de NLRP3. Péptido bloqueador de NLRP3 corresponde al control negativo de la técnica. Aumento 40X. b) Cuantificación de la fluorescencia total relativa de las imágenes obtenidas por microscopia confocal. C) ELISA de IL-1 β de células tratadas con el interferente para NLRP3, expresado en pg IL-1 β /mL. D) ELISA expresado en pg IL-1 β / μ g proteína. B) * p<0,05 vs control, **p<0,01 vs control, #p<0,05 vs scramble y ##p<0,05 vs scramble. C y d) *p<0,05 vs LPS 8h + Ang II 16h, p<0,01 vs LPS 8h + Ang II 16h. n= 3 experimentos independientes. Valores promedios \pm SEM.

Una vez determinado que era NLRP3 el inflamasoma que era activado por Ang II, se comprobó la participación de caspasa-1. Los FC fueron tratados con LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 7 h y pre-tratados, 1 h antes de la estimulación con Ang II 1 μM por 16 h, con ac-YVAD-cmk 10 μM , inhibidor irreversible selectivo para caspasa-1 (**Esquema 12**).



Esquema 12

El uso de YVAD previno tanto el aumento en la actividad de caspasa-1 (**Fig. 14^a**) como la secreción de IL-1 β (**Fig. 14b-c**) inducidas por LPS 8h + Ang II 16h.

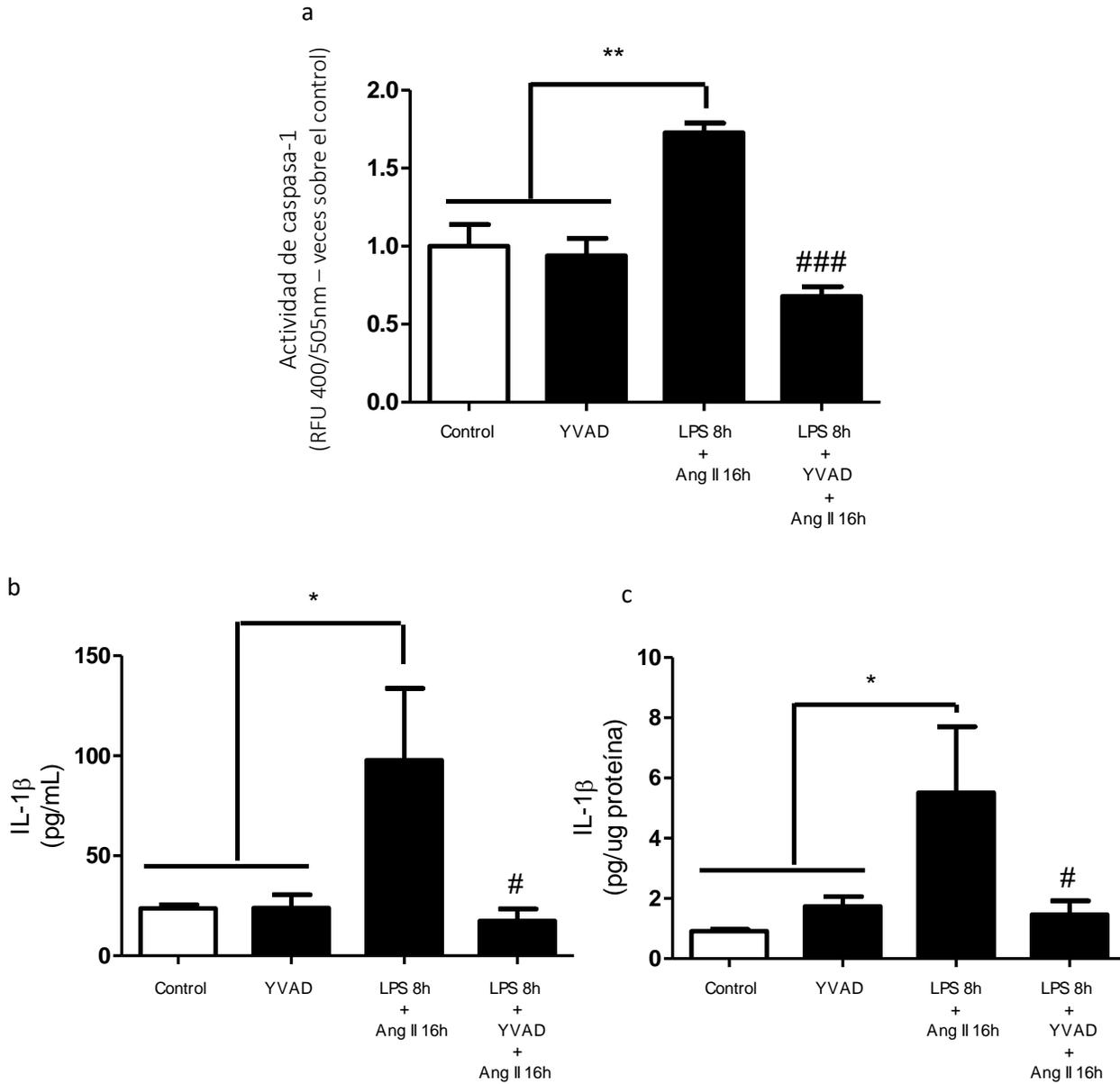


Figura 14. La inhibición de caspasa-1 impide la activación del inflamasoma en FC tratados con Ang II. Caspasa-1 fue inhibida selectiva e irreversiblemente con ac-YVAD-cmk (10 μ M). FC se trataron con LPS 1 μ g/mL por 7 h, se añadió por 1 h YVAD y finalmente se estimuló con Ang II 1 μ M por 16 h. a) Actividad de caspasa-1. B) ELISA IL-1 β expresado en pg IL-1 β /mL. C) ELISA expresado

en pg IL-1 β / μ g proteína. * p<0,05 vs controles, **p<0,01 vs controles, ## p<0,01 vs LPS 8h + ATP 16h n= 4 experimentos independientes. Valores promedios \pm SEM.

Los resultados en esta sección muestran que el inflamasoma que se activa por Ang II sería NLRP3 y que éste tendría un rol principal en la activación de caspasa-1 y de la secreción de IL-1 β hacia el medio de cultivo celular. Asimismo, también se demostró que la enzima encargada de la escisión de pro-IL-1 β , inducida por Ang II, sería preferentemente caspasa-1.

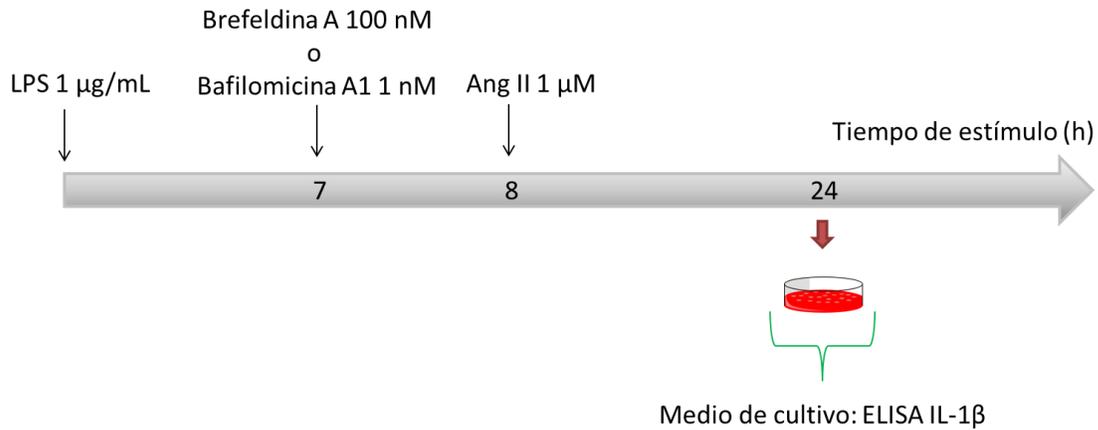
Finalmente, tanto el silenciamiento de NLRP3 como la inhibición de caspasa-1 demostrarían que sería NLRP3 el inflamasoma que se ensambla y que tendría el rol principal en generar los efectos que produce Ang II.

6.6 Ang II induce la secreción de IL-1 β por un mecanismo vesicular no clásico

Uno de los fenómenos que no ha sido aclarado, es cómo se secreta IL-1 β . En otros modelos celulares se ha establecido que sería por un mecanismo de secreción de proteínas de tipo no clásico. Sin embargo, no se ha podido determinar el mecanismo exacto de secreción, pero se cree que sería una mezcla de distintos fenómenos, los cuales serían determinados por las señales que activaron al inflamasoma. Con respecto al mecanismo de secreción de IL-1 β en células no inmunes, es desconocido cómo se transporta y secreta esta proteína hacia el medio extracelular. Asimismo, se desconoce el mecanismo inducido por Ang II.

Para determinar cómo ocurre la secreción de la citoquina activa, primero se estudió si era por el mecanismo clásico de secreción retículo/Golgi o si era por un modo alternativo.

Los FC se estimularon con LPS 1 μ g/mL durante 7 h y luego se adicionó Brefeldina A 100 nM por 1h, finalmente se estimuló con Ang II 1 μ M (**Esquema 13**). Al terminar los estímulos, se recolectó el medio de cultivo celular y se cuantificó IL-1 β por ELISA.



Esquema 13

Los resultados indicaron que Brefeldina A, molécula que interfiere con el mecanismo anterógrado desde el retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi, no pudo prevenir la secreción de IL-1 β inducida por LPS 8h + Ang II 16h (**Fig. 15^a**), por lo que este fenómeno de secreción sería independiente del sistema clásico de secreción de proteínas y correspondería a un mecanismo alternativo o no clásico.

Posteriormente, para dilucidar cuál podría ser el mecanismo de secreción no clásico que podría estar involucrado, se utilizó Bafilomicina A1, inhibidor de V-ATPasa que impide la formación de vesículas que poseen esta bomba de H⁺.

Los FC se estimularon con el mismo esquema anterior, pero en vez de Brefeldina A, se estimuló con Bafilomicina A1 1 nM (**Esquema 13**). Se observó que Bafilomicina A1 genera una disminución en la secreción de IL-1 β mediada por LPS 8h +Ang II 16h (**Fig. 15b**).

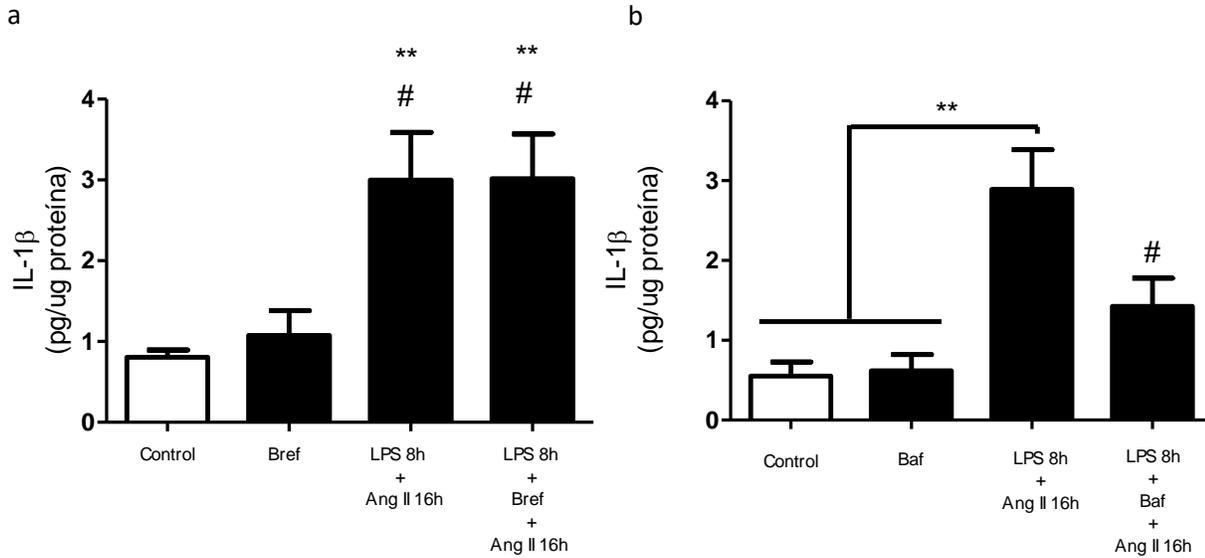


Figura 15. Ang II induce la secreción de IL-1 β por un mecanismo no-clásico de secreción de proteínas. FC fueron tratados con LPS 1 μ g/mL por 7 h, luego se preincubó por 1 h Brefeldina A o Bafilomicina A1 y finalmente se estimuló con Ang II 1 μ M por 16 h. a) Células tratadas con Brefeldin A 100 nM. ELISA expresado en pg IL-1 β / μ g proteína. B) Células tratadas con Bafilomicina A1 1 nM. ELISA expresado en pg IL-1 β / μ g proteína. A) ** p<0,01 vs control, # p<0,05 vs. Bref. B) **p<0,05 vs controles, # p<0,05 vs. LPS 8h + Ang II 16h. a) n=5 experimentos independientes. B) n=6 experimentos independientes. Valores promedios \pm SEM.

Ambos resultados indican que la secreción de IL-1 β inducida por LPS + Ang II en FC, sería un mecanismo de secreción de proteínas de tipo no-clásico, que no requeriría del transporte mediado por retículo/Golgi. Adicionalmente, se pudo establecer que la formación de vesículas, que expresan V-ATPasa, sería uno de los mecanismos de secreción no clásico, que induce Ang II en los FC para inducir la secreción de IL-1 β hacia el medio extracelular.

7. DISCUSIÓN

7.1 Angiotensina II activa el inflamasoma

El inflamasoma y su participación en las enfermedades crónicas no transmisibles es un tópico muy estudiado en estos últimos años. La activación de este complejo multimérico se ha relacionado con varias enfermedades como esclerosis múltiple, Alzheimer, Parkinson, aterosclerosis, diabetes tipo II y obesidad (56). Numerosos estudios han confirmado que el inflamasoma NLRP3 juega un papel importante en la aterosclerosis, la ocurrencia de un accidente cerebrovascular (57) y las enfermedades cardíacas (22), siendo reconocido como un nuevo blanco farmacológico para estas enfermedades. El estudio y comprensión de la activación de este complejo es un fenómeno muy poco estudiado en células inmunes y del mismo modo muy pocos antecedentes existen con respecto a la activación de éste en células residentes cardíacas como los FC.

En este trabajo se planteó que Ang II es un activador del inflamasoma NLRP3 en FC de rata neonata y los resultados expuestos demuestran que la hipótesis planteada se cumple: Ang II activa el inflamasoma NLRP3 en FC, siendo este evento dependiente de la cascada de señalización que genera un aumento de Ca^{2+} en el citosol, proveniente desde el retículo, favoreciendo la secreción de IL-1 β al medio de cultivo.

Se debe destacar que éste es el primer trabajo en la literatura que relaciona la activación del inflamasoma NLRP3 mediada por Ang II con la señalización que aumenta Ca^{2+} .

Ang II es un péptido pro-fibrótico e hipertensivo que posee receptores en los FC, pero se desconocía su participación en la activación de NLRP3 y caspasa-1, y en la secreción de IL-1 β hacia el medio extracelular.

Los FC clásicamente han sido caracterizados como células que realizarían una función de tipo sostén (1). Sin embargo, en los últimos años han aparecido trabajos que han confirmado que estas células podrían actuar como células centinelas: captando señales y entregando una respuesta (3-5).

En este trabajo se ha demostrado que los FC son capaces de reconocer señales de activación del inflamasoma y generar una respuesta de tipo inflamatoria: la secreción de IL-1 β al medio extracelular.

Al inicio de este estudio, poco se sabía de la activación de inflammasoma en FC. Solo dos trabajos se habían publicado al momento de comenzar esta tesis. Se conocía que los FC podían activar al inflammasoma y secretar IL-1 β al ser estimulados con las clásicas primeras y segunda señales: LPS y ATP (11, 12). Sin embargo, se desconocía si existían otras segundas señales, que pudiesen activar al inflammasoma, que fueran propias del corazón.

Se planteó que sería Ang II una molécula que tenía posibilidades de activar el inflammasoma y en particular NLRP3, el complejo más estudiado y que había demostrado un rol principal en FC (11, 12). Este planteamiento surgió debido a que Ang II presentaba dos de las tres características básicas que se necesitan para activar a NLRP3: variaciones de osmolaridad del medio celular y aumento de ROS. La primera característica estaría dada, principalmente, debido al aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular y la segunda debido a la actividad de NADPH oxidasa.

Al comenzar esta tesis, no había ningún estudio publicado que relacionara directamente Ang II con el inflammasoma, en ningún modelo de trabajo ni en ningún tipo celular. No obstante, durante el periodo experimental, se publicaron algunos artículos que relacionaban ambos conceptos.

El primer trabajo que apareció corresponde al desarrollado por Bracey et al., (2014), quienes definieron un nuevo rol de NLRP3 en los FC, independiente de la secreción de IL-1 β , relacionando a este receptor con la regulación de TGF- β 1 (58). Cabe destacar que en este trabajo se cuantificó IL-1 β secretada al medio extracelular inducida por Ang II, la que no presentó niveles significativamente diferentes con respecto a los controles. Pero, la diferencia con esta tesis consiste en que Ang II se utilizó como primera y segunda señal de activación del inflammasoma. Del mismo modo, estos autores no detectaron un aumento significativo de IL-1 β utilizando LPS +ATP. En ese mismo año, Wang et al., (2014), publicó un trabajo en cultivo de macrófagos de ratón, que demostraba que al utilizar Losartán se prevenía: a) la secreción de IL-1 β y b) la inducción de la expresión del ARNm de NLRP3 y caspasa-1, inducidas por LPS + ATP. No obstante, Losartán no previno el aumento en la expresión de ARNm de pro-IL-1 β (59). Es importante destacar que a diferencia del anterior, en este trabajo utilizaron macrófagos, células en las cuáles se induce la expresión de los componentes del inflammasoma con la llegada de la primera señal y que requieren tiempos muy diferentes de estímulo, al compararlos con nuestros resultados en FC. En 2015, Usui et al., (2015) publicaron un trabajo que efectivamente relacionaba Ang II con NLRP3, en

macrófagos J774 y en macrófagos de ratones KO para NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} y caspasa-1^{-/-}. Se demostró que LPS + Ang II inducía la secreción de IL-1 β y que el inflamasoma NLRP3 (NLRP3, ASC y caspasa-1) participaba de este fenómeno. Adicionalmente, se expuso que la activación de AT1 y la señalización asociada a la producción de ROS eran claves para la activación del inflamasoma (60). En 2015, otro trabajo relacionó que en células HK-2 la activación del inflamasoma NLRP3 inducida por Ang II sería un evento dependiente del estrés de retículo endoplásmico (61). Finalmente, en 2016, se demostró la activación del inflamasoma NLRP3 en un modelo de fibrosis hepática por Ang II, y también la regulación de los eventos ROS y de inducción de la expresión de los componentes del inflamasoma por Ang-(1-7) (62). Como se aprecia, hay varias evidencias que apoyan el hecho de que Ang II activa al inflamasoma NLRP3, en distintos tipos celulares. Sin embargo, es importante aclarar que solo ha aparecido un trabajo en FC, pero que no logró demostrar la activación de NLRP3 inducida por Ang II (58). Asimismo, ninguno mostró que esta activación dependería de la cascada de señalización que induce la salida de Ca²⁺ desde el retículo hacia el citosol.

Durante la realización de este trabajo de tesis se logró definir varias situaciones, muchas de ellas diferentes a lo publicado en otros tipos celulares. Lo primero que se mostró fue que, a diferencia de las células de tipo inmune, los FC presentan niveles basales de NLRP3, ASC y pro-caspasa-1, y que estas proteínas no se inducirían por la llegada de la señal 1, y que sería suficiente con estos niveles para generar la activación clásica del inflamasoma con LPS + ATP. No obstante, los niveles de expresión de pro-IL-1 β son concordantes con los expuestos en otros tipos celulares: en un estado basal pro-IL-1 β presenta niveles muy bajos y la primera señal induce su expresión. Se demostró, para nuestro modelo, que a las 8h se lograba un máximo y que las 24h habría un declive. También es importante destacar que, a diferencia de otras proteínas presentes en el FC, el tiempo de plaqueo, que genera tensión mecánica y promueve la acumulación de factores y proteínas que son sintetizados y secretados por los FC en cultivo *in vitro*, no induce la expresión de pro-IL-1 β .

Se debe aclarar que, se utilizó primeramente ATP para determinar el tiempo de estímulo necesario para activar el inflamasoma en FC. En macrófagos derivados de la médula ósea (BMDM), ATP utilizado en concentraciones del rango mM ha demostrado activar al inflamasoma NLRP3 a través de un flujo de Ca²⁺ proveniente desde el retículo (55). El tiempo necesario para cuantificar IL-1 β en el medio de cultivo, inducido por un estímulo de

ATP, en las células de tipo inmune, es de tan solo 30 minutos y se logran concentraciones mayores a 1000 pg/mL. No obstante, al utilizar ese mismo tiempo en los FC no se pudo detectar IL-1 β en el sobrenadante. Se decidió entonces, acumular el máximo de pro-IL-1 β (LPS 8h), estimular con ATP y esperar el tiempo necesario hasta poder detectar en el medio de cultivo niveles de IL-1 β que fuesen cuantificables por el método de ELISA. El tiempo al cual ELISA podía discernir claramente entre la situación control y ATP quedó fijado en 16h. Es muy probable que biológicamente la secreción de IL-1 β sea un fenómeno que requiere menor tiempo que el fijado en estos experimentos en FC, pero técnicamente la detección de ésta requiere un tiempo mayor. Por otro lado, luego al probar con Ang II por 16h, inmediatamente se obtuvieron resultados positivos para la cuantificación de IL-1 β en ese tiempo y no se realizó un experimento de temporalidad como con ATP, debido a que a las 16 h ya se observaba significancia con respecto a los controles. Es posible que en los FC, el flujo de secreción de IL-1 β sea lento y que independiente del estímulo utilizado y por lo tanto para la detección de esta citoquina, se requiriesen tiempos largos de estímulo de la señal 2. Lo descrito anteriormente es una gran diferencia si se compara a los FC con las células de tipo inmune, donde las primeras podrían tener una temporalidad de activación del inflamasoma y de la secreción de IL-1 β más larga que las segundas, además de presentar niveles de secreción muy bajos. Esto podría llevar a pensar que a nivel cardiaco podría haber dos fenómenos de activación del inflamasoma NLRP3 y de secreción de IL-1 β , uno que sería agudo, dado especialmente por la actividad de las células inmunes, especialistas en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y otro fenómeno que podría ser crónico e indetectable, que estaría dado por la acción inflamatoria de células no inmunes, como los son los FC. Ambos fenómenos podrían llevar eventualmente, a alteraciones en el tejido cardiaco y en la función cardiaca.

Otro punto que se debe aclarar es el origen del ATP. Es conocido que ATP que se requiere para activar al inflamasoma es exógeno a la célula y debe lograr altas concentraciones en el rango mM. Se ha planteado que bajo condiciones patológicas, altos niveles de ATP son liberados desde células necróticas, los que actuarían como señales de daño de tipo proinflamatorio, activando al inflamasoma NLRP3, a través de su interacción con el receptor P2X7 (63).

Con respecto a la activación del inflamasoma mediada por Ang II, se pudo demostrar por tres metodologías diferentes, que esto ocurría en los FC. Las metodologías ejecutadas son ampliamente utilizadas para determinar la activación del inflamasoma:

a) La colocalización de los componentes del inflamasoma es un fenómeno que debe ocurrir para ensamblar este complejo multiprotéico. Se demostró que NLRP3 y ASC son capaces de colocalizar en un sector específico de la célula, en la zona perinuclear, fenómeno que concuerda con la literatura (23). Normalmente, los componentes del inflamasoma se encuentran distribuidos en distintas zonas dentro de la células, pero al estimular con Ang II o LPS + Ang II ocurre una movilización al sector perinuclear, logrando la colocalización de NLRP3 y ASC.

b) La activación de caspasa-1 es un evento clave en la activación de inflamasoma. Es esta enzima, la encargada final de escindir pro-IL-1 β a IL-1 β . Se demostró que tanto Ang II como LPS + Ang II son capaces de aumentar la actividad de caspasa-1 intracelularmente. En este punto es importante destacar que Ang II, por sí sola, induce tanto la colocalización de NLRP3 y ASC como la actividad de caspasa-1. Este resultado explica que la señal 2 sería independiente de la señal 1, no se requeriría de la actuación previa de la señal 1 para que se active el inflamasoma. Este fenómeno es contrario a lo que se ha visto en otros modelos, donde la señal 2 requiere de la señal 1 para poder ejercer su efecto.

c) Con respecto a la última metodología, la secreción de IL-1 β al medio extracelular, es el último evento que revela que el sistema funciona en su totalidad. Se demostró que LPS + Ang II inducen la secreción de IL-1 β hacia el medio de cultivo celular. No obstante, Ang II por sí sola no indujo la secreción de IL-1 β . Este resultado se explica debido a que, Ang II no induce la síntesis de pro-IL-1 β .

Se debe precisar que la concentración utilizada de Ang II fue de 1 μ M para todos los experimentos. En el inicio de la fase experimental se pudo establecer que la concentración de 100 nM y 1 μ M generaban aumentos en la secreción de IL-1 β . Sin embargo, la concentración de 100 nM no lograba aumentos significativos con respecto a los controles. Esto debido principalmente a la baja cantidad de IL-1 β que se secreta desde los FC y la desviación que existe entre un experimento y otro. Por esta razón se estableció que la concentración de Ang II a utilizar sería de 1 μ M.

Resumiendo, los tres resultados muestran que Ang II, por si sola, puede activar al inflamasoma, pero no puede inducir la secreción de IL-1 β hacia el medio extracelular. Se desconoce qué función anexa a la síntesis y secreción de IL-1 β podría tener el inflamasoma o caspasa-1, aparte del fenómeno de piroptosis que presentan las células inmunes, que resultó ser inexistente en las condiciones de estímulo utilizadas en este trabajo. Sin embargo, se ha descrito que en FC, la activación del inflamasoma estaría relacionada con la regulación de TGF- β . En aquel trabajo se demostró que hay un aumento en la expresión de NLRP3 en FC humanos al estimular con TGF- β 1 y que en FC deficientes en NLRP3 hay una diferenciación celular alterada y activación de R-Smad en respuesta a TGF- β (58). Es importante destacar en este punto, que durante la realización de esta tesis se realizaron experimentos que buscaban describir las diferencias que existen entre los FC y los miofibroblastos cardiacos (MFC), células que se diferenciaron estimulando de manera exógena a los FC con TGF- β , con respecto a la expresión y actividad del inflamasoma, además de la secreción de IL-1 β en ambos fenotipos celulares. Se pudo establecer que la expresión de NLRP3 y ASC son similares, sin embargo la expresión de pro-IL-1 β fue mayor en los FC y, en su contraparte la expresión de pro-caspasa-1 fue mayor en los MFC (64). Con respecto a la actividad de caspasa-1, ésta fue mayor en los MFC, seguramente debido a la mayor expresión de esta enzima en ese tipo celular, pero finalmente la secreción de IL-1 β fue similar para ambos. Estos resultados dan hincapié para pensar que la secreción de IL-1 β , estaría dada por los FC, pero que la diferenciación a MFC llevaría consigo una mayor expresión y actividad de caspasa-1, fenómeno que estaría asociado a la sobrevida celular (65).

7.2 Angiotensina II activa el inflamasoma a través de la cascada transduccional AT1/PLC/IP3/Ca²⁺

Originalmente en este trabajo, se planteó que la activación del inflamasoma inducida por Ang II estaría mediada por un aumento de la concentración de Ca²⁺ en el citosol. Para dilucidar la cascada transduccional que desencadena Ang II, se intervino la señalización que estaría involucrada con el aumento de Ca²⁺. Primero, utilizando Losartán, se estableció que Ang II debía interaccionar con el receptor AT1. Luego, al utilizar U73122 y 2-APB, se estableció que la cascada continuaría con la activación de PLC mediada por la proteína G α_q , que llevaría a la transformación de PIP2 a IP3 y DAG. IP3 interaccionaría con su receptor IP3R, presente en el retículo, y desencadenaría la salida de Ca²⁺ desde aquel

organelo, aumentando su concentración en el citosol. Asimismo, para comprobar si era un aumento de Ca^{2+} proveniente desde el retículo, el agente necesario para inducir la activación del inflamasoma, se usó BAPTA-AM. Los resultados obtenidos concuerdan con lo anterior, indicando que la salida de Ca^{2+} desde el retículo, sería clave en la activación del inflamasoma mediado por Ang II. No obstante, es importante aclarar que se realizó este corto experimento en presencia de Ca^{2+} extracelular, principalmente debido a los problemas de toxicidad asociados al uso del quelante de Ca^{2+} en FC. Es posible que el Ca^{2+} que entrase desde el medio extracelular pudiese activar el sistema del inflamasoma, pero esto no sucedió. Quizá BAPTA-AM habría quelado el influjo del ión, pero en la bibliografía se ha demostrado que el influjo de Ca^{2+} desde el medio extracelular no es clave en la activación de NLRP3. Estos hechos reafirman que la señalización: AT1 – PLC – IP3R – Ca^{2+} sería la secuencia de hechos que desencadenarían la activación del inflamasoma.

7.3 Angiotensina II activa al inflamasoma formado por NLRP3 y caspasa-1

Es conocido que el inflamasoma, que juega un rol primordial en la secreción de IL-1 β hacia el medio extracelular en los FC, es NLRP3 (11, 12). Este inflamasoma estaría compuesto por el receptor intracelular NLRP3, el adaptador ASC y por la enzima caspasa-1. Sin embargo, en otros tipos celulares se han descrito otros inflamasomas, que participarían activamente de la secreción de IL-1 β (56). Para poder comprobar la participación de este receptor en la activación del inflamasoma, se silenció NLRP3 con un siRNA. El hecho de interferir con la expresión de esta proteína provocó que LPS + Ang II no pudiese inducir la secreción de IL-1 β hacia el medio extracelular. Este resultado complementa el experimento previo de la colocalización de NLRP3 y ASC inducida por Ang II. En definitiva, se desprende que la participación de NLRP3 es crucial para la secreción de IL-1 β y sería el principal inflamasoma activado por Ang II en los FC.

Como se mencionó anteriormente, la enzima que se acopla al inflamasoma es caspasa-1 y es la encargada de escindir pro-IL-1 β para producir IL-1 β . Sin embargo, se ha descrito que existen otras enzimas que pueden escindir a pro-IL-1 β , como MMP-9, PR3, catepsina G, elastasa, entre otras (34). Para descartar la participación de estas enzimas en producción de IL-1 β inducida por Ang II, se utilizó ac-YVAD-cmk. Este bloqueador irreversible de caspasa-1, demostró impedir tanto la activación de caspasa-1, como la secreción de IL-1 β inducida por Ang II.

La suma de los resultados de intervención de NLRP3 y caspasa-1, demuestran que sería NLRP3 el inflamasoma que se activa por Ang II y que, efectivamente, sería caspasa-1 la enzima que escinde a pro-IL-1 β en los FC.

7.4 Secreción de IL-1 β y los mecanismos no clásicos de secreción de proteínas

El último fenómeno que se debe llevar a cabo, en esta secuencia de hechos, es la salida de IL-1 β hacia el medio extracelular. Poco se ha estudiado acerca de esta secreción, pero es interesante estudiar cómo sale esta citoquina hacia el medio extracelular, si carece de la secuencia clásica de secreción de proteínas. Existen trabajos indican que sería por métodos alternativos de secreción (35, 36). Sin embargo, se desconoce el mecanismo inducido por Ang II para realizar este flujo. Se pudo demostrar, utilizando Brefeldina A, que no habría participación del sistema formado por retículo/ Golgi, descartando la vía clásica de secreción de proteínas. Este resultado se correlaciona con lo indicado en la literatura, habiendo varias sustancias que no poseen la secuencia de entrada al retículo, que son secretadas por células eucariotas y que no poseen dominios obvios en común o características que potencialmente sean marcadores de destino o localización celular para promover su secreción (66).

Varias son las opciones que ha dado la literatura como método no-clásico de secreción de proteínas, por nombrar algunas: uso de carriers, evaginaciones de la membrana plasmática, formación de diferentes vesículas (35, 36, 67, 68). Sin embargo, uno de los que más llama la atención es la formación de vesículas de tipo autofágicas, que se encargarían de favorecer la reunión de los componentes del sistema del inflamasoma en un espacio pequeño y de favorecer del transporte de IL-1 β hacia el exterior celular. Para determinar si el mecanismo de secreción incluía la formación de vesículas, se utilizó Bafilomicina A1, inhibidor de la V-ATPasa, bomba de H⁺ que está presente en vesículas y que es necesaria para la conformación de éstas (69). Se demostró que Bafilomicina A1 impide la secreción de IL-1 β , pero no a niveles basales. Es posible que el mecanismo vesicular, no sea el único que participe de la secreción. No se descarta que, en conjunto con la formación de vesículas, existiesen otros métodos paralelos de transporte y secreción de IL-1 β en FC. Este resultado llevaría a pensar que al igual que en otros trabajos, habría quizás un espectro de secreción para IL-1 β y que este dependería del tipo y tiempo de estímulo utilizado (35). Como se mencionó anteriormente, las células inmunes pueden perder la continuidad y fluidez de la membrana plasmática, debido al fenómeno concomitante de la piroptosis, por

lo que aquella pérdida podría favorecer la salida de IL-1 β y de otras sustancias hacia el medio extracelular. No obstante, los FC no presentaron piroptosis, por lo que la salida de IL-1 β sería netamente por un proceso activo. Un trabajo reciente, plantea que uno de los roles del Ca²⁺ no sería necesariamente la de activar al inflamasoma, sino que sería la de favorecer la secreción vesicular de IL-1 β hacia el medio extracelular en modelos que presentan baja piroptosis (26). Adicionalmente, la publicación de Gallier-Beckley et al., (2013) plantea que en monocitos de humano, la activación de caspasa-1 y la secreción de IL-1 β serían eventos distintos y separables (70), con respecto a este hecho y según los resultados expuestos, Ang II induciría ambos eventos: la activación tanto de caspasa-1 como la secreción de IL-1 β . Adicionalmente, trabajos de nuestro laboratorio, que sobre-expresaron el receptor AT1 en FC de ratas adultas, mostraron que Ang II 100 nM por 24 h, inducía muerte celular por apoptosis, para lo que se requería de un influjo de Ca²⁺ extracelular. No obstante, este evento no ocurría si no se sobre-expresaba el receptor AT1 (71). Del mismo modo, durante el desarrollo de esta tesis no se observó muerte celular a las 16 h de estímulo con Ang II.

7.5 Degradación de pro-IL-1 β

Finalmente, con respecto a la citoquina pro-IL-1 β que es sintetizada, pero que no es activada por caspasa-1, se pudo demostrar que ésta se degradaría por el mecanismo de autofagia a tiempos largos. No obstante, no se pudo demostrar ni descartar la participación de la degradación de tipo proteosomal en este evento (**Anexo 2**). Estos resultados concuerdan con lo publicado acerca del doble rol de la autofagia en la regulación del sistema del inflamasoma en diferentes tipos celulares inmunes murinos: degradando a pro-IL-1 β por el mecanismo lisosomal y regulando la activación del inflamasoma NLRP3 (72, 73). Asimismo se ha planteado que la ubiquitinización de ASC y la deubiquitinización de NLRP3 serían modificaciones post traduccionales claves para la activación del inflamasoma y es más, la misma poli-ubiquitinización de ASC llevaría a la degradación de los inflamasomas en células inmunes (25). Estos antecedentes llevan a pensar que existiría una relación entre el fenómeno de síntesis de pro-IL-1 β y la activación del inflamasoma con la degradación de sus componentes como métodos de auto-regulación.

7.6 Consideraciones finales

En último lugar, es importante mencionar que la revisión de Butts et al., (2015) plantea que el inflammasoma NLRP3 es un blanco farmacológico promisorio en la insuficiencia cardíaca (22). Creemos que este trabajo podría ir en esa misma dirección: altas concentraciones de Ang II a nivel cardíaco podrían generar el pre-ensamblaje del inflammasoma NLRP3 en las células residentes del corazón y una vez ocurrido un daño, por pequeño que fuese éste, se podría generar la activación completa del sistema, lo que llevaría a la secreción de IL-1 β hacia el medio extracelular. Esta citoquina actuaría de manera paracrina induciendo la hipertrofia y apoptosis de los cardiomiocitos, y a largo plazo generando remodelado cardíaco.

Resumiendo los hallazgos encontrados, se confirma la hipótesis planteada en este trabajo de tesis (ver Figura 16). Ang II genera la activación del receptor AT1, se estimula la cascada transduccional de PLC e IP3R, lo que lleva a la salida de Ca²⁺ desde el retículo hacia el medio extracelular. Este aumento en la concentración de Ca²⁺ induciría la activación del receptor NLRP3, éste se oligomerizaría y reclutaría a ASC y pro-caspasa-1. La enzima se auto-activaría para formar la caspasa-1 activa y poder escindir pro-IL-1 β a IL-1 β . Últimamente, esta citoquina activa se secretaría a través de transporte vesicular.

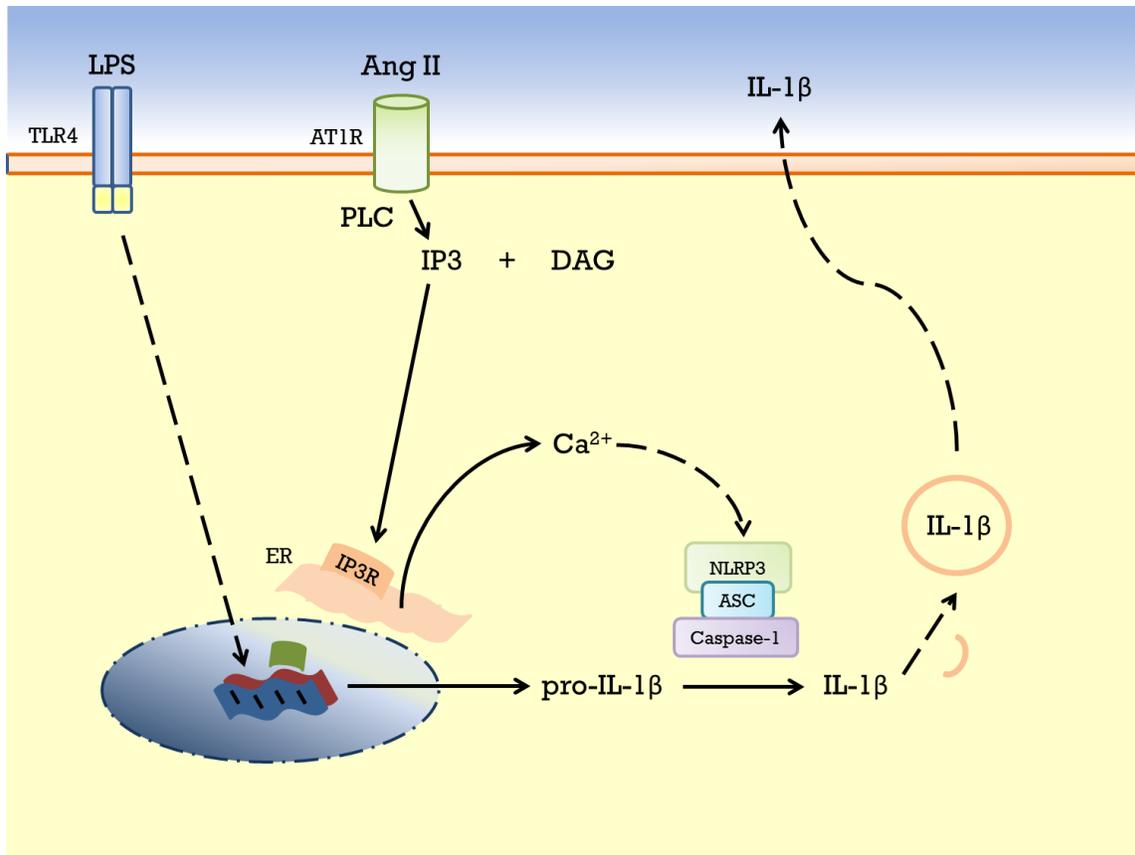


Figura 16. Modelo propuesto. Se plantea que Ang II activa los receptores AT1 presentes en el FC, éstos activan a PLC, que produciría IP3 + DAG. La activación de los IP3R desencadenaría la salida de Ca²⁺ desde el retículo hacia el citosol, fenómeno que sería clave para la activación del receptor NLRP3. La conformación del inflammasoma NLRP3 llevaría a la activación de caspasa-1. La molécula diana de la enzima sería pro-IL-1β que sería cortada para dar paso a IL-1β. Finalmente, esta citoquina sería secretada por mecanismos alternativos, como el flujo vesicular, hacia el medio extracelular.

8. CONCLUSIÓN

- Ang II activa el inflamasoma en FC: induce la movilización de NLRP3 y ASC, la actividad de caspasa-1 y la secreción de IL-1 β .
- Ang II activa al inflamasoma a través de la activación de la cascada transduccional: AT1 - PLC - IP3R - Ca⁺²
- El inflamasoma que es activado por Ang II es el conformado por NLRP3, ASC y caspasa-1.
- La secreción de IL-1 β inducida por Ang II corresponde a un mecanismo independiente de secreción de proteínas. Uno de los mecanismos dilucidados es transporte vesicular.

9. ANEXO

1. Figura anexa 1.

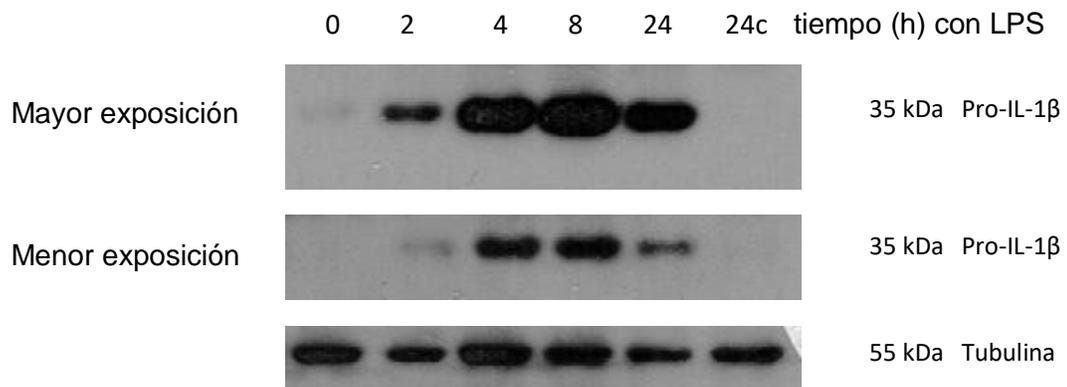
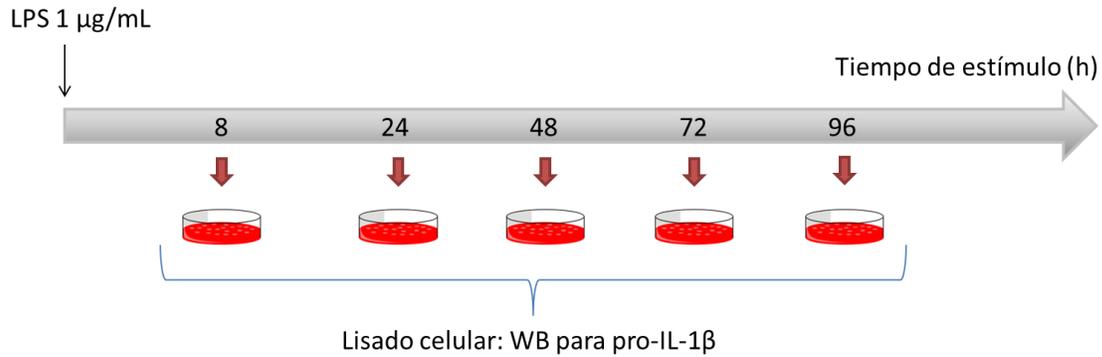


Figura anexa 1. Expresión de pro-IL-1 inducida por LPS. FC se estimularon con LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ entre 0 y 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de estímulo se rescató el lisado celular y se realizaron WB para pro-IL-1 β . Se muestra un film con mayor tiempo de exposición y uno con menor tiempo de exposición.

2. Degradación de pro-IL-1 β

El primer experimento de este trabajo de tesis demostró que una vez que se logra el máximo nivel de pro-IL-1 β (LPS 8h) luego habría decaimiento en la expresión de esta citoquina (LPS 24h). Se quiso determinar el mecanismo por el cual esta citoquina, que se acumula en el citosol, pero que no es secretada al medio extracelular, se degrada. Para ello se estimularon FC con LPS entre 8 y 96 h (**Esquema de estímulo anexo 1**)



Esquema de estímulo anexo 1

Al estudiar lo que sucedía con pro-IL-1 β a tiempos más largos, estando las células sólo con medio de mantención DMEM, se observó que a partir de las 48 h hay una disminución significativa de los niveles de pro-IL-1 β dentro de la célula (**Figura anexa 2**).

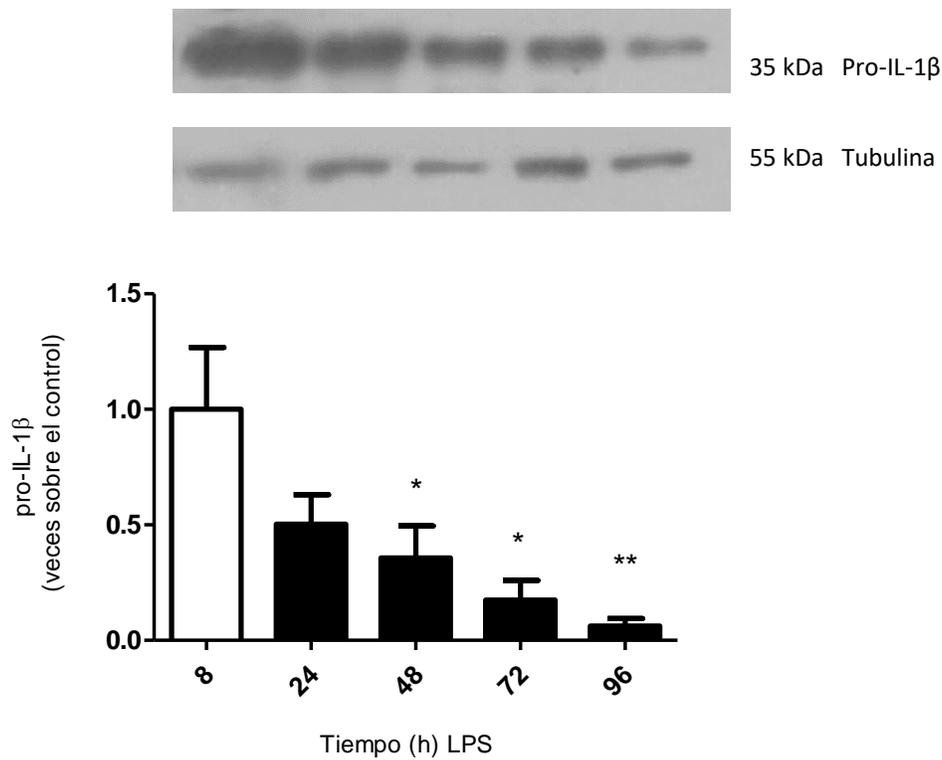
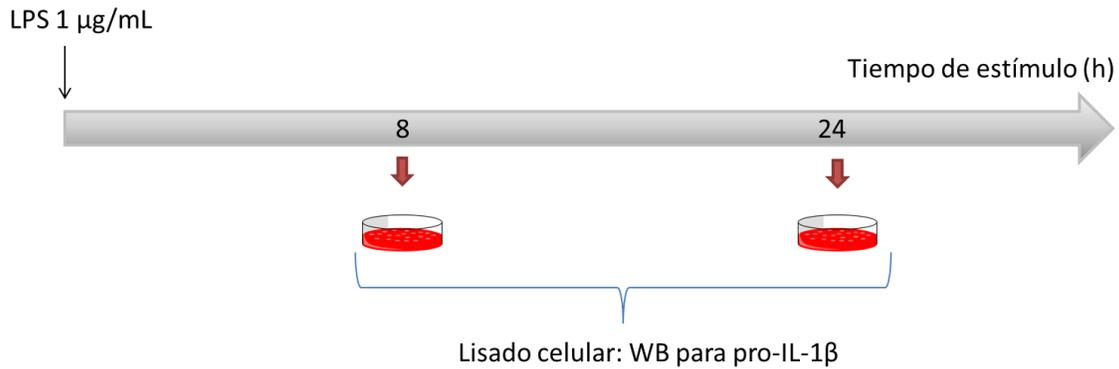


Figura anexa 2. Expresión de pro-IL-1 β inducida por LPS a tiempos largos. FC se estimularon con LPS (1 μ g/mL) entre 0 y 96 h. A partir del lisado celular se realizaron WB para pro-IL-1 β . * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ vs LPS 8h. $n = 4$ experimentos independientes. Valores promedios \pm SEM.

Para establecer si esta disminución en expresión de pro-IL-1 β era debido a degradación se cargó en el gel de WB gran cantidad de proteínas y se reveló exponiendo por largo tiempo (**Esquema de estímulo anexo 2**).



Esquema de estímulo anexo 2

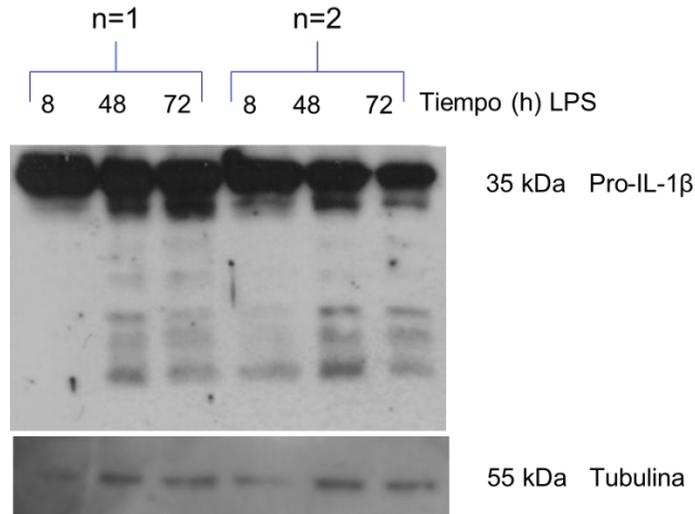
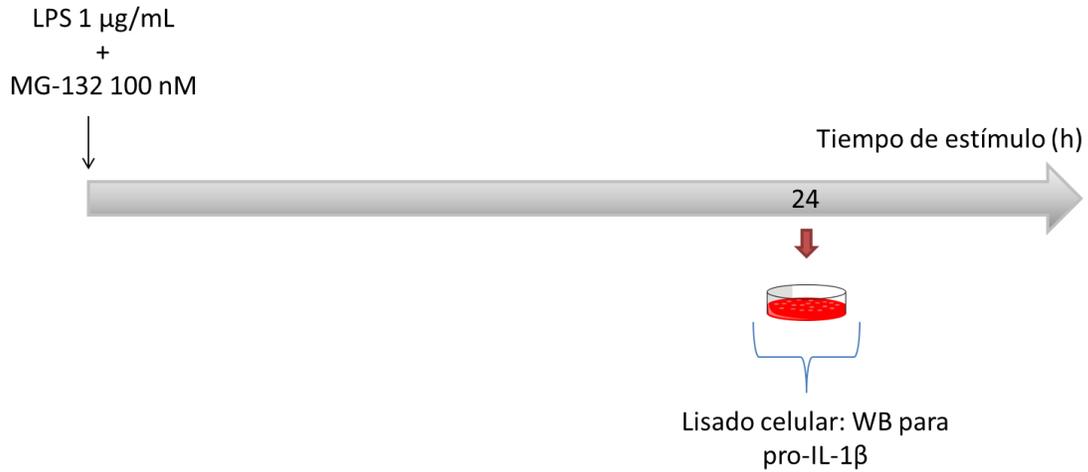


Figura anexa 3. Expresión de pro-IL-1 β inducida por LPS a tiempos largos. FC se estimularon con LPS (1 μ g/mL) entre 8 y 72 h. A partir del lisado celular se realizaron WB para pro-IL-1 β . Se muestran dos experimentos independientes en un mismo gel.

Es importante considerar que existen dos mecanismos por el cual las proteínas son degradadas: sistema del proteosoma o autofagia. Para determinar si pro-IL-1 β es degradada por mecanismos proteosomales o autofágicos se realizaron los siguientes experimentos.

2.1 Degradación de pro-IL-1 β por proteosoma

Primeramente, se utilizó un inhibidor del proteosoma MG-132 (100nM) este inhibidor se adicionó en conjunto con LPS por 24 h (**Esquema de estímulo anexo 3**) y se observó una menor expresión en los niveles de pro-IL-1 β (**Figura anexa 4**). Este resultado es contrario a lo que esperaba, y se sugiere que se debería a que la síntesis de pro-IL-1 β se vería impedida. NF- κ B es el factor transduccional que determina la síntesis de pro-IL-1 β , por lo que la degradación de I κ B por el proteosoma es crucial para la síntesis de esta citoquina (ver esquema aclaratorio de NF- κ B).



Esquema de estímulo anexo 3

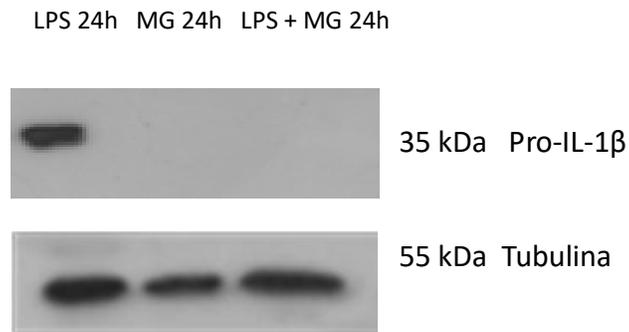


Figura anexa 4. MG-132 disminuye la expresión de pro-IL-1 β . Al estimular los FC con LPS y MG-132 100 nM de manera conjunta por 24 h se observa una disminución en la expresión de pro-IL-1 β . Este resultado es contrario al esperado. Se cree que MG-132 impidió la síntesis de pro-IL-1 β al degradar al inhibidor I κ B.

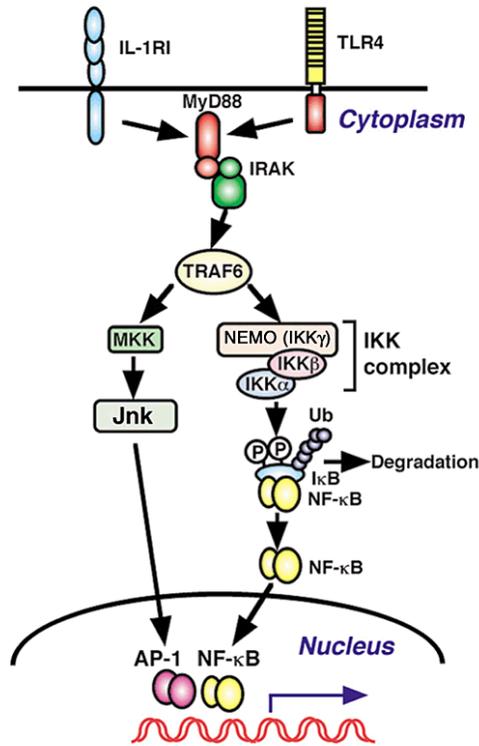
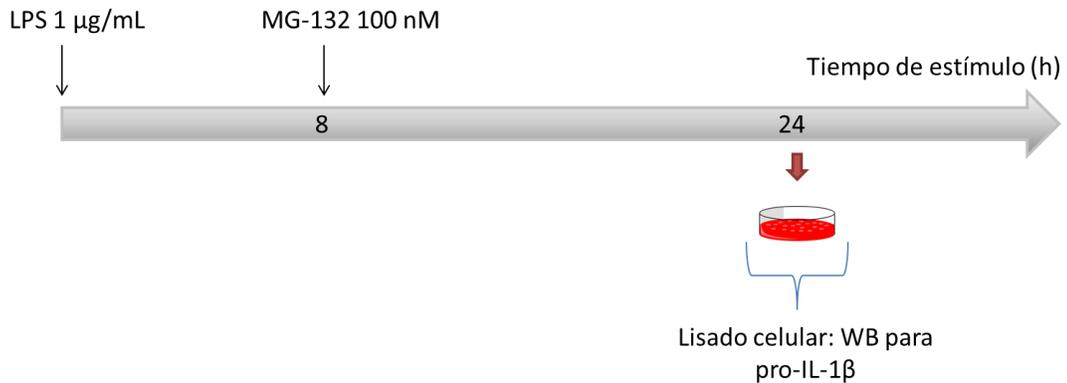


Imagen descargada de: www.nature.com

Se determinó que la adición de MG-132 100 nM se realizaría una vez ocurrida la síntesis de pro-IL- β , a las 8 h de estímulo con LPS (**Esquema de estímulo anexo 4**). Los resultados muestran que, al igual que el resultado anterior, hay una disminución en los niveles de pro-IL-1 β (**Figura anexa 5**). Se sugiere que separar los fenómenos de síntesis y degradación no se lograría utilizando un inhibidor del proteosoma.



Esquema de estímulo anexo 4

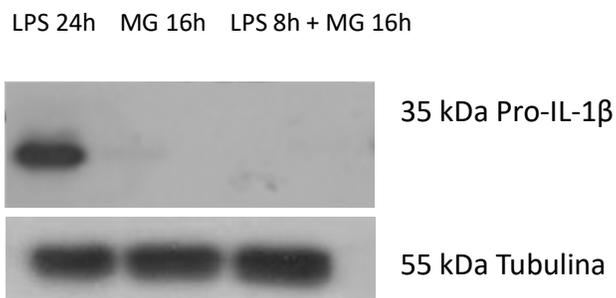
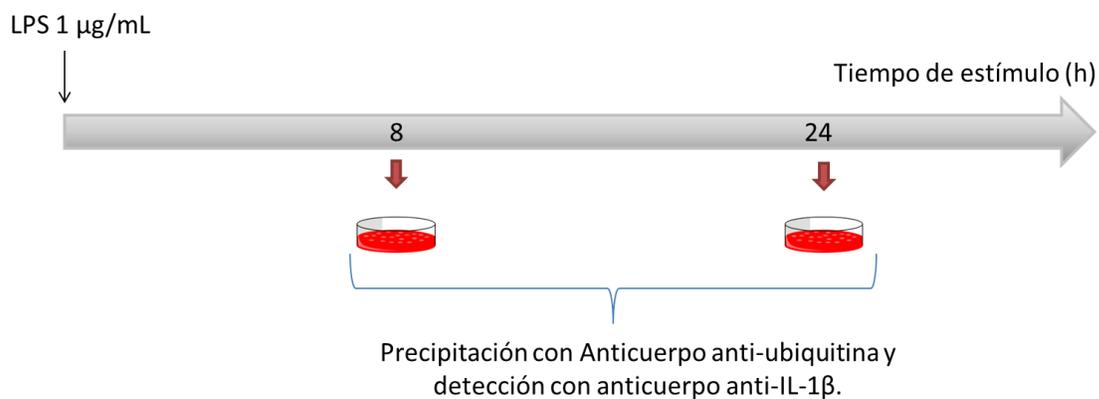


Figura anexa 5. MG-132 disminuye la expresión de pro-IL-1 β . Al estimular los FC con LPS por 8 h y luego con MG-132 100 nM por 16 h se observa una disminución en la expresión de pro-IL-1 β . Este resultado también, es contrario al esperado. Se cree que la síntesis y degradación de pro-IL-1 β serían fenómenos paralelos y no sería posible separarlos por esta metodología.

Para poder demostrar este punto se optó por determinar si pro-IL-1 β se ubiquitina. Se realizó una inmunoprecipitación con Agarosa unida a un anticuerpo contra ubiquitina y luego se realizó un gel. Se reveló utilizando un anticuerpo contra pro-IL-1 β (**Esquema de estímulo anexo 5**)



Esquema de estímulo anexo 5

Se determinó que a las 24 h de estímulo con LPS habría ubiquitinización de pro-IL-1 β (**Figura anexa 6**). Adicionalmente se incluyen los controles “INPUT” y “OUTPUT” de la técnica.

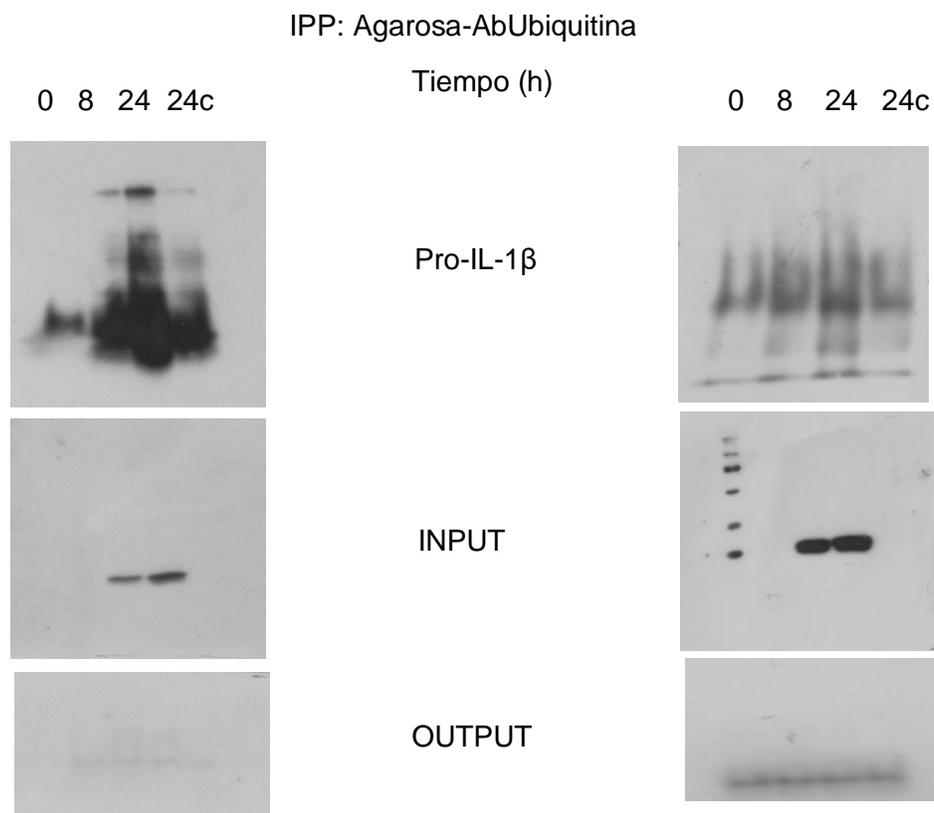
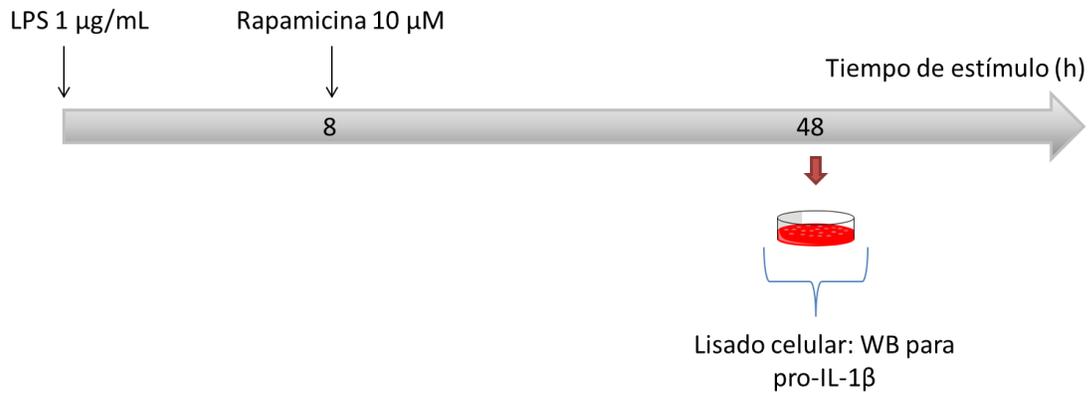


Figura anexa 6. Precipitación conjunta de Ubiquitina y pro-IL-1 β . FC se estimularon con LPS (1 μ g/mL) entre 0 y 24 h. A partir del lisado celular se realizaron IPP, usando Agarosa unida a un anticuerpo anti-ubiquitina. Posteriormente se realizó un gel para pro-IL-1 β . Se muestran dos experimentos independientes con sus respectivos controles INPUT y OUTPUT.

2.2 Degradación de pro-IL-1 β por autofagia

Para demostrar si autofagia es el mecanismo de degradación de pro-IL-1 β , se indujo la autofagia utilizando un inhibidor de mTOR, rapamicina 10 μ M. Una vez provocada la síntesis de pro-IL- β por LPS durante 8 h, se estimuló con rapamicina por 40 h (**Esquema de estímulo anexo 6**).

Los resultados muestran que al inducir la autofagia hay una disminución de la expresión de pro-IL-1 β (**Figura anexa 7**).



Esquema de estímulo anexo 6

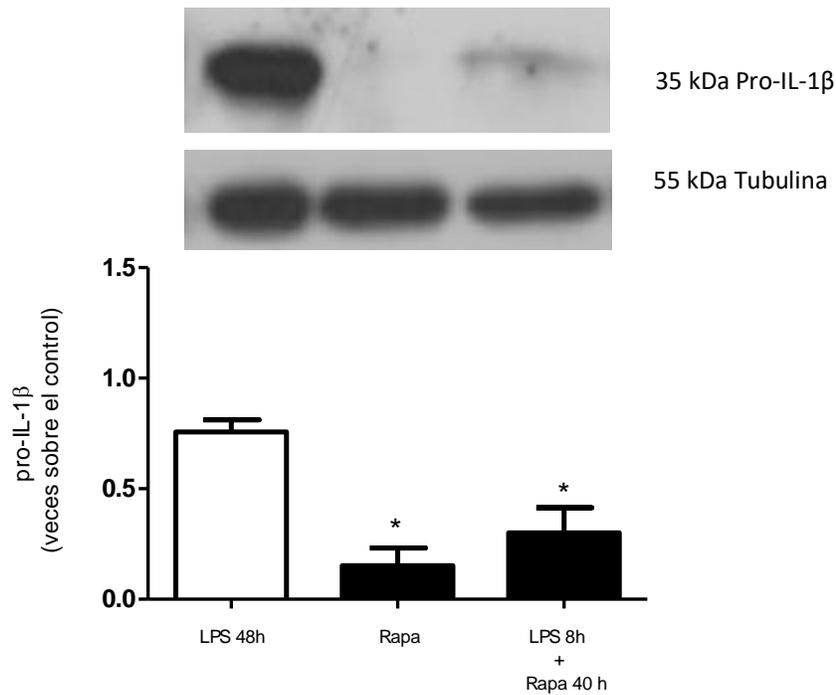
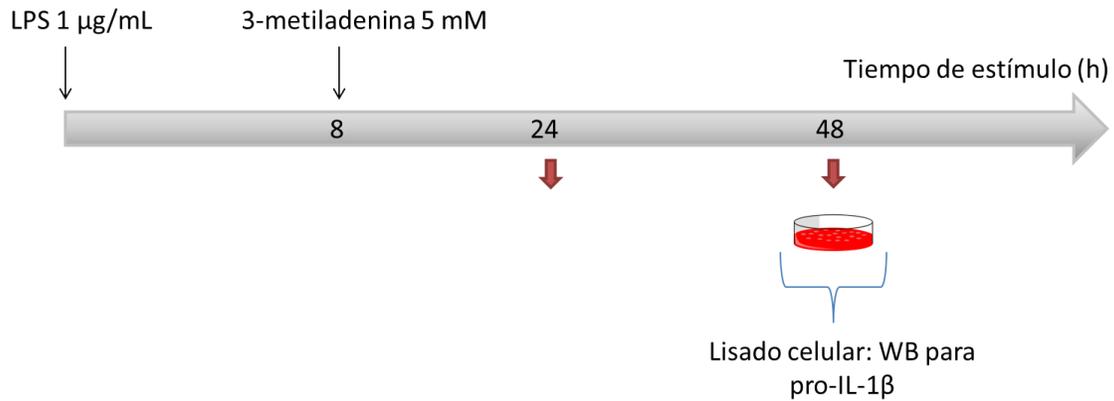


Figura anexa 7. Pro-IL-1 β es degradada por inducción de autofagia. FC se estimularon con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 8 h y luego con Rapamicina 10 μM por 40 h. A partir del lisado celular se realizaron WB para pro-IL-1 β . * $p < 0,05$ vs LPS 48h. $n = 3$ experimentos independientes. Valores promedios \pm SEM.

Asimismo, se realizó un experimento utilizando un inhibidor de la autofagia: 3-metiladenina (3-MA), inhibidor de la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K). Se estimularon FC por 8 h con LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y luego con 3-MA 1 mM por 40 h (**Esquema de estímulo anexo 7**). Los resultados no denotaron efectos en la caída de los niveles de pro-IL-1 β comparado con LPS 48h (**Figura anexa 8**)



Esquema de estímulo anexo 7

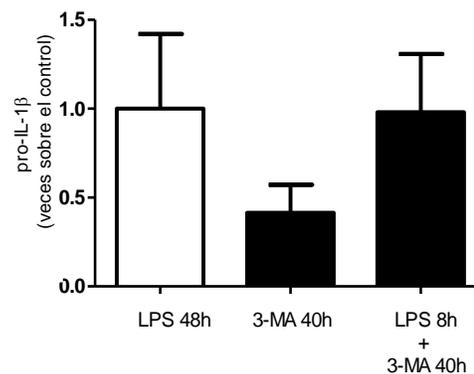
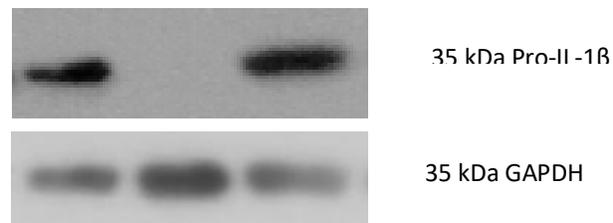


Figura anexa 8. Pro-IL-1 β es degradada por inducción de autofagia. FC se estimularon con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 8 h y luego con 3-metiladenina (1 mM) por 40 h. A partir del lisado celular se realizaron WB para pro-IL-1 β . $p = 0,3812$. $n = 4$ experimentos independientes. Valores promedios \pm SEM.

Es importante destacar que la concentración tradicional utilizada de 3-MA es de 5 mM, concentración que ha demostrado inhibir la degradación de proteínas (74). No obstante, 5 mM y 2.5 mM fueron tóxicas para los FC a tiempos muy tempranos. Por lo que se ajustó la dosis de 3-MA a la máxima concentración donde no hubiese muerte celular observable, resultando 1 mM como la dosis a utilizar. Es posible que la dosis 1 mM no presentase efectos inhibitorios de la autofagia en los FC. Por consiguiente, no se observaría un aumento en la expresión de los FC tratados con LPS 8h + 3-MA 40h comparado con LPS 48h, debido a que no se logró la concentración de 3-MA necesaria para inhibir la autofagia.

2.3. Discusión del Anexo

Los resultados presentados en el anexo demuestran que la degradación de pro-IL-1 β en los FC sería por el mecanismo de autofagia, pero no se descarta que pueda haber participación de la degradación proteosomal. Este resultado está en concordancia con la literatura, donde se ha señalado que la autofagia sería un regulador de IL-1 β : degradando a pro-IL-1 β por degradación lisosomal y regulando la activación del inflamasoma NLRP3 (72). Los resultados obtenidos dan cuenta que la síntesis de pro-IL-1 β es un proceso rápido, que logra un máximo a las 8h, no obstante su degradación sería un fenómeno lento, permaneciendo en el citosol por más de 96 h. Se conoce que pro-IL-1 β sería una de las tantas proteínas que es sintetizada por los FC tratados con LPS y no la única. Estudios previos han demostrado que LPS induce la síntesis de MMP-9 (75), TNF- α (76), α -SMA (76), HMGB1 (77), colágeno (75, 77), entre otras. Quizás la secreción y degradación de estas proteínas serían fenómenos prioritarios y que la falta de la segunda señal de activación del inflamasoma sería un punto de regulación importante. Una de las dudas que surgió fue si en realidad existía degradación de pro-IL-1 β o si había disminución de su expresión por secreción hacia el medio extracelular. Esta duda se aclaró realizando un gel cargado con una gran cantidad de proteínas y con alto tiempo de exposición del film, donde se pudo observar que bajo el peso molecular de 35 kDa aparecía un bandeo que era reconocido por el anticuerpo de pro-IL-1 β , es muy probable que estas bandas sean fragmentos de pro-IL-1 β degradada. Actualmente, es un consenso que pro-IL-1 β no es secretada desde células inmunes, excepto durante necrosis (78), pero poco es sabido en células no inmunes. El trabajo de Baroja-Mazo et al., (2014) demostró que una vez activado el inflamasoma habría secreción de este complejo, pudiendo actuar de manera extracelular y amplificando la respuesta inflamatoria (79). Es posible que en conjunto con el

inflammasoma se secretase tanto pro-IL-1 β como IL-1 β y como el inflammasoma seguiría activo podría escindir de manera extracelular a pro-IL-1 β , pero ninguno de estos fenómenos es conocido en células no inmunes. De todas formas si se secretase pro-IL-1 β hacia el medio extracelular, otras enzimas no específicas podrían degradarla como activarla. Durante la realización de este trabajo se quiso detectar en el medio extracelular la secreción de pro-IL-1 β e IL-1 β (datos no mostrados), pero no se logró diferenciar si se observaba o no pro-IL-1 β debido a la falta de controles positivos para ambas citoquinas y la dificultad técnica de precipitar proteínas del medio de cultivo celular.

Finalmente, el mecanismo por el cual se degradaría la pro-IL-1 β que no es activada y que permanece en el citosol del FC sería autofagia (**Figura anexa 9: Modelo propuesto**). Sin embargo, no se descarta la participación del proteosoma o de otras enzimas no-específicas en este fenómeno.

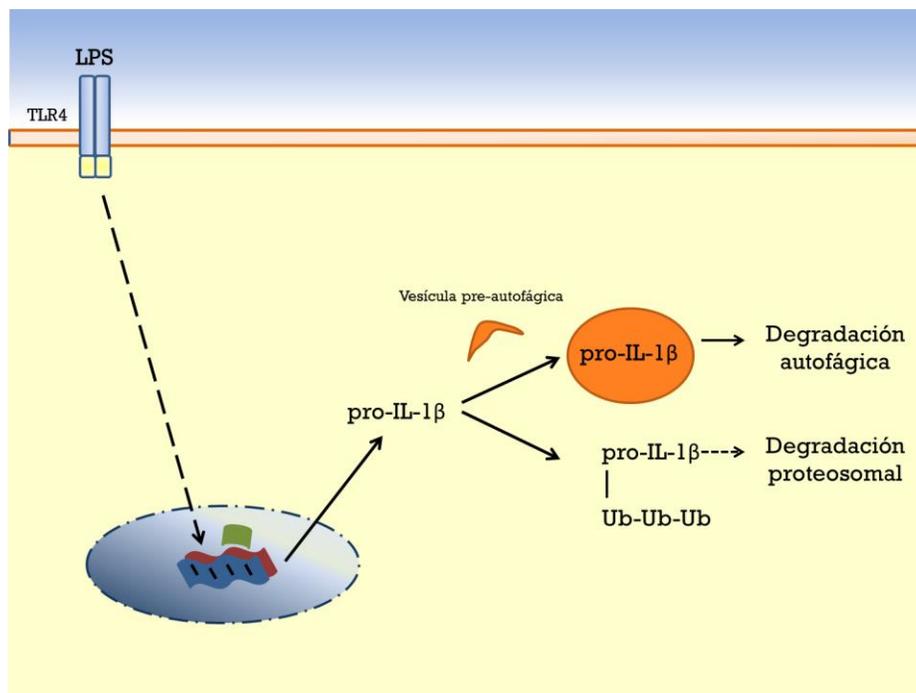


Fig. anexa 9: Modelo propuesto. LPS actúa como primera señal del inflammasoma, induciendo la síntesis de pro-IL-1 β con un máximo de expresión a las 8 h. Una vez logrado ese máximo se aprecia un decaimiento de la señal. Este decaimiento corresponde a la degradación de la citoquina. El mecanismo que genera la degradación de pro-IL-1 β sería autofagia. Sin embargo, pro-IL-1 β se ubiquitina, pero no se pudo comprobar si, efectivamente, ocurría degradación proteosomal.

10. REFERENCIAS

1. Chen W, Frangogiannis NG. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Apr;1833(4):945-53. PubMed PMID: 22982064. PMCID: PMC3541439. eng.
2. Dostal D, Glaser S, Baudino TA. Cardiac fibroblast physiology and pathology. *Compr Physiol*. 2015 Apr;5(2):887-909. PubMed PMID: 25880517. eng.
3. Díaz-Araya G, Vivar R, Humeres C, Boza P, Bolivar S, Muñoz C. Cardiac fibroblasts as sentinel cells in cardiac tissue: Receptors, signaling pathways and cellular functions. *Pharmacol Res*. 2015 Nov;101:30-40. PubMed PMID: 26151416. eng.
4. Lindner D, Zietsch C, Tank J, Sossalla S, Fluschnik N, Hinrichs S, et al. Cardiac fibroblasts support cardiac inflammation in heart failure. *Basic Res Cardiol*. 2014;109(5):428. PubMed PMID: 25086637. eng.
5. Turner NA. Inflammatory and fibrotic responses of cardiac fibroblasts to myocardial damage associated molecular patterns (DAMPs). *J Mol Cell Cardiol*. 2016 May;94:189-200. PubMed PMID: 26542796. eng.
6. Sato H, Watanabe A, Tanaka T, Koitabashi N, Arai M, Kurabayashi M, et al. Regulation of the human tumor necrosis factor-alpha promoter by angiotensin II and lipopolysaccharide in cardiac fibroblasts: different cis-acting promoter sequences and transcriptional factors. *J Mol Cell Cardiol*. 2003 Oct;35(10):1197-205. PubMed PMID: 14519430. eng.
7. Zhang W, Lavine KJ, Epelman S, Evans SA, Weinheimer CJ, Barger PM, et al. Necrotic myocardial cells release damage-associated molecular patterns that provoke fibroblast activation in vitro and trigger myocardial inflammation and fibrosis in vivo. *J Am Heart Assoc*. 2015 Jun;4(6):e001993. PubMed PMID: 26037082. eng.
8. Lugin J, Parapanov R, Rosenblatt-Velin N, Rignault-Clerc S, Feihl F, Waeber B, et al. Cutting edge: IL-1 α is a crucial danger signal triggering acute myocardial inflammation during myocardial infarction. *J Immunol*. 2015 Jan;194(2):499-503. PubMed PMID: 25505286. PMCID: PMC4278196. eng.
9. Ohm IK, Alfsnes K, Belland Olsen M, Ranheim T, Sandanger Ø, Dahl TB, et al. Toll-like receptor 9 mediated responses in cardiac fibroblasts. *PLoS One*. 2014;9(8):e104398. PubMed PMID: 25126740. PMCID: PMC4134207. eng.
10. Wu Y, Li Y, Zhang C, A X, Wang Y, Cui W, et al. S100a8/a9 released by CD11b+Gr1+ neutrophils activates cardiac fibroblasts to initiate angiotensin II-Induced cardiac inflammation and injury. *Hypertension*. 2014 Jun;63(6):1241-50. PubMed PMID: 24711518. eng.
11. 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 Feb;123(6):594-604. PubMed PMID: 21282498. eng.
12. Sandanger Ø, Ranheim T, Vinge LE, Bliksøen M, Alfsnes K, Finsen AV, et al. The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2013 Jul;99(1):164-74. PubMed PMID: 23580606. eng.
13. Church LD, Cook GP, McDermott MF. Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008 Jan;4(1):34-42. PubMed PMID: 18172447. eng.
14. Satoh T, Otsuka A, Contassot E, French LE. The inflammasome and IL-1 β : implications for the treatment of inflammatory diseases. *Immunotherapy*. 2015;7(3):243-54. PubMed PMID: 25804477. eng.

15. Palmer JN, Hartogensis WE, Patten M, Fortuin FD, Long CS. Interleukin-1 beta induces cardiac myocyte growth but inhibits cardiac fibroblast proliferation in culture. *J Clin Invest.* 1995 Jun;95(6):2555-64. PubMed PMID: 7769098. PMCID: PMC295937. eng.
16. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2009 2009 May-Jun;57(3):165-76. PubMed PMID: 19479203. PMCID: PMC2788964. eng.
17. Liu W, Zhang X, Zhao M, Chi J, Liu Y, Lin F, et al. Activation in M1 but not M2 Macrophages Contributes to Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction in Rats: a Critical Role of the Calcium Sensing Receptor/NLRP3 Inflammasome. *Cell Physiol Biochem.* 2015;35(6):2483-500. PubMed PMID: 25967877. eng.
18. Rathinam VA, Fitzgerald KA. Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. *Cell.* 2016 May;165(4):792-800. PubMed PMID: 27153493. eng.
19. Vanaja SK, Rathinam VA, Fitzgerald KA. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends Cell Biol.* 2015 May;25(5):308-15. PubMed PMID: 25639489. PMCID: PMC4409512. eng.
20. 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. PubMed PMID: 25216263. PMCID: PMC4162616. eng.
21. Rohde D, Schön C, Boerries M, Didrihson I, Ritterhoff J, Kubatzky KF, et al. S100A1 is released from ischemic cardiomyocytes and signals myocardial damage via Toll-like receptor 4. *EMBO Mol Med.* 2014 Jun;6(6):778-94. PubMed PMID: 24833748. PMCID: PMC4203355. eng.
22. Butts B, Gary RA, Dunbar SB, Butler J. The Importance of NLRP3 Inflammasome in Heart Failure. *J Card Fail.* 2015 Jul;21(7):586-93. PubMed PMID: 25982825. PMCID: PMC4516025. eng.
23. Jo EK, Kim JK, Shin DM, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol.* 2016 Mar;13(2):148-59. PubMed PMID: 26549800. PMCID: PMC4786634. eng.
24. Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, El Hadri K, Friguet B, Simmet T, et al. NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol.* 2015;4:296-307. PubMed PMID: 25625584. PMCID: PMC4315937. eng.
25. Man SM, Kanneganti TD. Regulation of inflammasome activation. *Immunol Rev.* 2015 May;265(1):6-21. PubMed PMID: 25879280. PMCID: PMC4400844. eng.
26. Katsnelson MA, Rucker LG, Russo HM, Dubyak GR. K⁺ efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca²⁺ signaling. *J Immunol.* 2015 Apr;194(8):3937-52. PubMed PMID: 25762778. PMCID: PMC4390495. eng.
27. Yaron JR, Gangaraju S, Rao MY, Kong X, Zhang L, Su F, et al. K⁽⁺⁾ regulates Ca⁽²⁺⁾ to drive inflammasome signaling: dynamic visualization of ion flux in live cells. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1954. PubMed PMID: 26512962. eng.
28. de Zoete MR, Palm NW, Zhu S, Flavell RA. Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Dec;6(12):a016287. PubMed PMID: 25324215. eng.
29. Hung SC, Choi CH, Said-Sadier N, Johnson L, Atanasova KR, Sellami H, et al. P2X4 assembles with P2X7 and pannexin-1 in gingival epithelial cells and modulates ATP-induced reactive oxygen species production and inflammasome activation. *PLoS One.* 2013;8(7):e70210. PubMed PMID: 23936165. PMCID: PMC3723664. eng.
30. Craven RR, Gao X, Allen IC, Gris D, Bubeck Wardenburg J, McElvania-Tekippe E, et al. *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse

- monocytic cells. *PLoS One*. 2009;4(10):e7446. PubMed PMID: 19826485. PMCID: PMC2758589. eng.
31. Suárez R. El inflammasoma: mecanismos de activación. In: Buelvas N, editor.: *Invest Clin*; 2015
 32. Bednash JS, Mallampalli RK. Regulation of inflammasomes by ubiquitination. *Cell Mol Immunol*. 2016 Apr. PubMed PMID: 27063466. ENG.
 33. Wittmann M, Kingsbury SR, McDermott MF. Is caspase 1 central to activation of interleukin-1? *Joint Bone Spine*. 2011 Jul;78(4):327-30. PubMed PMID: 21459652. eng.
 34. Netea MG, Simon A, van de Veerdonk F, Kullberg BJ, Van der Meer JW, Joosten LA. IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS Pathog*. 2010 Feb;6(2):e1000661. PubMed PMID: 20195505. PMCID: PMC2829053. eng.
 35. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011 Aug;22(4):189-95. PubMed PMID: 22019906. PMCID: PMC3714593. eng.
 36. Eder C. Mechanisms of interleukin-1beta release. *Immunobiology*. 2009;214(7):543-53. PubMed PMID: 19250700. eng.
 37. Jia L, Li Y, Xiao C, Du J. Angiotensin II induces inflammation leading to cardiac remodeling. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012;17:221-31. PubMed PMID: 22201740. eng.
 38. Benigni A, Cassis P, Remuzzi G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Mol Med*. 2010 Jul;2(7):247-57. PubMed PMID: 20597104. PMCID: PMC3377325. eng.
 39. Dzau VJ. Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. *Am J Cardiol*. 1987 Jan;59(2):59A-65A. PubMed PMID: 3028117. eng.
 40. Schulz A, Jankowski J, Zidek W, Jankowski V. Absolute quantification of endogenous angiotensin II levels in human plasma using ESI-LC-MS/MS. *Clin Proteomics*. 2014;11(1):37. PubMed PMID: 25505856. PMCID: PMC4223748. eng.
 41. Naranjan S, Dhalla P, Zahradka I, M.C. D, Robert E B. *Angiotensin II Receptor Blockade Physiological and Clinical Implications: Springer Science & Business Media*; 1998.
 42. Harrison DG, Marvar PJ, Titze JM. Vascular inflammatory cells in hypertension. *Front Physiol*. 2012;3:128. PubMed PMID: 22586409. PMCID: PMC3345946. eng.
 43. Wang Y, Li Y, Wu Y, Jia L, Wang J, Xie B, et al. 5TNF- α and IL-1 β neutralization ameliorates angiotensin II-induced cardiac damage in male mice. *Endocrinology*. 2014 Jul;155(7):2677-87. PubMed PMID: 24877626. eng.
 44. Husain K, Hernandez W, Ansari RA, Ferder L. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World J Biol Chem*. 2015 Aug;6(3):209-17. PubMed PMID: 26322175. PMCID: PMC4549761. eng.
 45. Pacurari M, Kafoury R, Tchounwou PB, Ndebele K. The Renin-Angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. *Int J Inflam*. 2014;2014:689360. PubMed PMID: 24804145. PMCID: PMC3997861. eng.
 46. Lijnen P, Papparella I, Petrov V, Semplicini A, Fagard R. Angiotensin II-stimulated collagen production in cardiac fibroblasts is mediated by reactive oxygen species. *J Hypertens*. 2006 Apr;24(4):757-66. PubMed PMID: 16531806. eng.
 47. Villarreal FJ, Kim NN, Ungab GD, Printz MP, Dillmann WH. Identification of functional angiotensin II receptors on rat cardiac fibroblasts. *Circulation*. 1993 Dec;88(6):2849-61. PubMed PMID: 8252698. eng.
 48. Foncea R, Andersson M, Ketterman A, Blakesley V, Sapag-Hagar M, Sugden PH, et al. Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 1997 Aug;272(31):19115-24. PubMed PMID: 9235900. eng.

49. Sánchez L. TCA protein precipitation protocol 2001 [Available from: http://www.its.caltech.edu/~bjorker/TCA_ppt_protocol.pdf.
50. R&D. Rat IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine ELISA Kit [Available from: https://www.rndsystems.com/products/rat-il-1-beta-il-1f2-quantikine-elisa-kit_rl00.
51. ABCAM. Caspase 1 Assay Kit (Fluorometric) (ab39412) [Available from: <http://www.abcam.com/caspase-1-assay-kit-fluorometric-ab39412.html>.
52. **Scientific TF.** Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit [Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/88953>.
53. **Scientific TF.** Silencer® Select [Available from: [https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/sirna/gene/NLRP3#filters=species:^\"Rattus norvegicus\"\\$](https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/sirna/gene/NLRP3#filters=species:^\).
54. Abe J, Morrell C. Pyroptosis as a Regulated Form of Necrosis: PI+/Annexin V-/High Caspase 1/Low Caspase 9 Activity in Cells = Pyroptosis? *Circ Res.* 2016 May;118(10):1457-60. PubMed PMID: 27174943. eng.
55. Murakami T, Ockinger J, Yu J, Byles V, McColl A, Hofer AM, et al. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jul;109(28):11282-7. PubMed PMID: 22733741. PMCID: PMC3396518. eng.
56. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med.* 2015 Jul;21(7):677-87. PubMed PMID: 26121197. PMCID: PMC4519035. eng.
57. Tong Y, Ding ZH, Zhan FX, Cai L, Yin X, Ling JL, et al. The NLRP3 inflammasome and stroke. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(4):4787-94. PubMed PMID: 26131053. PMCID: PMC4483817. eng.
58. Bracey NA, Gershkovich B, Chun J, Vilaysane A, Meijndert HC, Wright JR, et al. Mitochondrial NLRP3 protein induces reactive oxygen species to promote Smad protein signaling and fibrosis independent from the inflammasome. *J Biol Chem.* 2014 Jul;289(28):19571-84. PubMed PMID: 24841199. PMCID: PMC4094069. eng.
59. Wang F, Huang L, Peng ZZ, Tang YT, Lu MM, Peng Y, et al. Losartan inhibits LPS + ATP-induced IL-1beta secretion from mouse primary macrophages by suppressing NALP3 inflammasome. *Pharmazie.* 2014 Sep;69(9):680-4. PubMed PMID: 25272939. eng.
60. Usui F, Shirasuna K, Kimura H, Tatsumi K, Kawashima A, Karasawa T, et al. Inflammasome activation by mitochondrial oxidative stress in macrophages leads to the development of angiotensin II-induced aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Jan;35(1):127-36. PubMed PMID: 25378412. eng.
61. Wang J, Wen Y, Lv LL, Liu H, Tang RN, Ma KL, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in angiotensin II-induced NLRP3 inflammasome activation in human renal proximal tubular cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin.* 2015 Jul;36(7):821-30. PubMed PMID: 26005910. PMCID: PMC4813084. eng.
62. Cai SM, Yang RQ, Li Y, Ning ZW, Zhang LL, Zhou GS, et al. Angiotensin-(1-7) Improves Liver Fibrosis by Regulating the NLRP3 Inflammasome via Redox Balance Modulation. *Antioxid Redox Signal.* 2016 May;24(14):795-812. PubMed PMID: 26728324. eng.
63. Gombault A, Baron L, Couillin I. ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. *Front Immunol.* 2012;3:414. PubMed PMID: 23316199. PMCID: PMC3539150. eng.
64. Boza P, Ayala P, Vivar R, Humeres C, Cáceres FT, Muñoz C, et al. Expression and function of toll-like receptor 4 and inflammasomes in cardiac fibroblasts and myofibroblasts: IL-1β synthesis, secretion, and degradation. *Mol Immunol.* 2016 May;74:96-105. PubMed PMID: 27174187. ENG.

65. Winkler S, Rösen-Wolff A. Caspase-1: an integral regulator of innate immunity. *Semin Immunopathol.* 2015 Jul;37(4):419-27. PubMed PMID: 26059719. eng.
66. Malhotra V. Unconventional protein secretion: an evolving mechanism. *EMBO J.* 2013 Jun;32(12):1660-4. PubMed PMID: 23665917. PMCID: PMC3680731. eng.
67. Piccioli P, Rubartelli A. The secretion of IL-1 β and options for release. *Semin Immunol.* 2013 Dec;25(6):425-9. PubMed PMID: 24201029. eng.
68. Qu Y, Franchi L, Nunez G, Dubyak GR. Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol.* 2007 Aug;179(3):1913-25. PubMed PMID: 17641058. eng.
69. Sun-Wada GH, Wada Y. Role of vacuolar-type proton ATPase in signal transduction. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Oct;1847(10):1166-72. PubMed PMID: 26072192. eng.
70. Galliher-Beckley AJ, Lan LQ, Aono S, Wang L, Shi J. Caspase-1 activation and mature interleukin-1 β release are uncoupled events in monocytes. *World J Biol Chem.* 2013 May;4(2):30-4. PubMed PMID: 23710297. PMCID: PMC3652645. eng.
71. Aránguiz-Uroz P, Soto D, Contreras A, Troncoso R, Chiong M, Montenegro J, et al. Differential participation of angiotensin II type 1 and 2 receptors in the regulation of cardiac cell death triggered by angiotensin II. *Am J Hypertens.* 2009 May;22(5):569-76. PubMed PMID: 19300422. eng.
72. Harris J, Hartman M, Roche C, Zeng SG, O'Shea A, Sharp FA, et al. Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. *J Biol Chem.* 2011 Mar;286(11):9587-97. PubMed PMID: 21228274. PMCID: PMC3058966. eng.
73. Martins JD, Liberal J, Silva A, Ferreira I, Neves BM, Cruz MT. Autophagy and inflammasome interplay. *DNA Cell Biol.* 2015 Apr;34(4):274-81. PubMed PMID: 25757059. eng.
74. Seglen PO, Gordon PB. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Mar;79(6):1889-92. PubMed PMID: 6952238. PMCID: PMC346086. eng.
75. Lew WY, Bayna E, Molle ED, Dalton ND, Lai NC, Bhargava V, et al. Recurrent exposure to subclinical lipopolysaccharide increases mortality and induces cardiac fibrosis in mice. *PLoS One.* 2013;8(4):e61057. PubMed PMID: 23585870. PMCID: PMC3622013. eng.
76. Tomita K, Takashina M, Mizuno N, Sakata K, Hattori K, Imura J, et al. Cardiac fibroblasts: contributory role in septic cardiac dysfunction. *J Surg Res.* 2015 Feb;193(2):874-87. PubMed PMID: 25291964. eng.
77. Yin JP, Su ZL, Wang YM, Wang T, Tian SS, Xu XX, et al. [Release of HMGB1 by LPS-treated cardiac fibroblasts and its contribution to the production of collagen type I and III]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2012 Aug;28(8):785-8. PubMed PMID: 22863579. chi.
78. Hogquist KA, Nett MA, Unanue ER, Chaplin DD. Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Oct;88(19):8485-9. PubMed PMID: 1924307. PMCID: PMC52533. eng.
79. Baroja-Mazo A, Martín-Sánchez F, Gomez AI, Martínez CM, Amores-Iniesta J, Compan V, et al. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat Immunol.* 2014 Aug;15(8):738-48. PubMed PMID: 24952504. eng.