



Estudio del efecto de nuevos canales iónicos en la regulación de inflammasomas

Florencia Rammauro

Orientador: Marcelo Hill

Tesina de graduación de la Licenciatura en Bioquímica

Facultad de Ciencias, UdelaR

Laboratorio de Inmunoregulación e Inflamación

Institut Pasteur de Montevideo-Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, UdelaR

Febrero 2016

ÍNDICE



ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE

- ÍNDICE DE CONTENIDOS	ii
- ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	iv
RESUMEN	1
- RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
- SISTEMA INMUNITARIO: Características generales	4
- RESPUESTA INMUNE INNATA	7
- RESPUESTA INFLAMATORIA	11
- IL-1 β Y PATOLOGÍA	14
- EL INFLAMASOMA NLRP3	19
- LA LINEA THP-1 PARA EL ESTUDIO DE LA INFLAMACIÓN <i>IN VITRO</i>	22
- INFLAMACIÓN Y CÁNCER	25
- LEUCEMIA LINFOIDE CRÓNICA	27
- TORID Y HCA 112	30
- DOS NUEVAS MOLÉCULAS ¿Implicadas en inflamación?	33
OBJETIVOS	35
- Objetivo general	36
- Objetivos específicos	36
MATERIALES Y METODOLOGÍA	37
- Generación de bacterias electrocompetentes E. Coli XL1-Blue	38
- Amplificación y purificación de plásmidos	38
- Cultivo de células	39
- Transfección transitoria	40

- Cuantificación de IL-1 β por ELISA	41
- Cuantificación de proteínas	42
- Electroforesis SDS-PAGE	42
- Western Blot HCA 112	42
- Western Blot TORID	43
- Western Blot GAPDH	43
- Citometría de flujo	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
- AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS	46
- SOBRE-EXPRESIÓN DE TORID Y/O HCA 112 EN CÉLULAS THP-1 PRE-DIFERENCIADAS A MACRÓFAGOS Y ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DE INFLAMASOMAS.	51
- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE TORID Y HCA 112 EN LLC	59
CONCLUSIÓN y PERSPECTIVAS	68
BIBLIOGRAFÍA	71
- Bibliografía	72

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes celulares y moleculares de inmunidad innata y adaptativa	8
Figura 2. Principales PRRs presentes en células dendríticas y macrófagos	10
Figura 3. Mecanismos de inflamación y resolución de la inflamación	12
Figura 4. Generación y liberación de IL-1 β	17
Figura 5. El inflammasoma NLRP3	20
Figura 6. Roles del inflammasoma en la carcinogénesis	26
Figura 7. Estructura de TORID y HCA 112	31
Figura 8. Diagrama de los vectores pSecTag2 A, B, C y pcDNA3.1(+/-)	46
Figura 9. Electroforesis del plásmido pSecTag2B-HCA112-mCherry	49
Figura 10. Producción de IL-1 β por células transfectadas con TORID y/o HCA 112	53
Figura 11. Porcentaje de producción de IL-1 β por células THP-1 transfectadas con TORID y/o HCA 112	54
Figura 12. Imagen de epifluorescencia de células THP-1 transfectadas por nucleofección con HCA 112-mCherry	56
Figura 13. Expresión de TORID en LLC	60
Figura 14. Expresión de HCA 112 en LLC	61
Figura 15. Citometría de flujo de PBMCs de pacientes progresores para LLC	63
Figura 16. Expresión de HCA 112 en las poblaciones celulares de pacientes progresores para LLC	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de condiciones tratadas con agentes bloqueantes de IL-1 en las cuales esta citoquinas podría estar teniendo un rol en su patología.	15
Tabla 2. Utilización de la línea THP-1.	23
Tabla 3. Amplificación y purificación de plásmidos.	48
Tabla 4. Condiciones testadas de transfección utilizando lípidos catiónicos.	52
Tabla 5. Datos generales y clínicos de los pacientes incluidos en el trabajo.	59

RESUMEN



RESUMEN

La inflamación subyace a una amplia variedad de procesos tanto fisiológicos como patológicos, incluido el cáncer. Los inflammasomas, actores centrales de la inflamación, así como la Interleucina 1 β (IL-1 β) tienen roles contradictorios en múltiples facetas de la oncogénesis. Esta ambigüedad, altamente dependiente del contexto, dificulta llegar a un acuerdo en cuanto a si inhibir o activar el inflammasoma es beneficioso en relación a la terapia del cáncer. Una situación fisiopatológica donde la inflamación y el rol de la IL-1 β están poco caracterizados y podrían tener un papel relevante, es en la leucemia linfocítica crónica (LLC). En este sentido, nos propusimos estudiar la capacidad de TORID y HCA 112, dos moléculas caracterizadas previamente por nuestro grupo como canales iónicos, de regular la activación de inflammasomas en un modelo in vitro de sobre-expresión de estas proteínas, y evaluar la participación, y potencialidad de estas dos moléculas como marcadores pronóstico en LLC.

Se intentó la sobre-expresión de TORID y/o HCA 112 en células THP-1, no lográndose un sistema experimental robusto. Sin embargo, para una de las condiciones, se determinó una disminución en la producción de IL-1 β cuando las células eran transfectadas con ambos plásmidos. Con respecto al rol de estas moléculas en LLC, se encontró una diferencia significativa en la expresión de HCA 112, no así de TORID, entre dos grupos de pacientes catalogados como indolentes y progresores para la enfermedad, estando aumentada en este último. También se identificó en este trabajo que HCA 112 sería expresada por el clon tumoral en los pacientes progresores. Ha sido reportado en la literatura una asociación entre bajos niveles de IL-1 β y mayor progresión en LLC. En este escenario, y teniendo en cuenta que HCA 112 podría, junto con TORID, estar inhibiendo la producción de IL-1 β , nos planteamos como hipótesis que el aumento de HCA 112 podría estar regulando negativamente la presencia de IL-1 β , y esto la asociaría a un peor pronóstico. Estos resultados por un lado muestran la asociación entre HCA 112 y progresión en LLC, volviéndola candidata para su utilización como marcador pronóstico, y por otro abre interrogantes en cuanto al papel de la IL-1 β en esta enfermedad, y la potencialidad de esta interleucina en el tratamiento de la misma.

INTRODUCCIÓN



SISTEMA INMUNITARIO: Características generales

Para poder sobrevivir, todos los organismos han generado estrategias para defenderse de los predadores. Desde los orígenes de la vida, estas estrategias se han ido optimizando, a la vez que los posibles predadores desarrollaron distintos mecanismos de evasión para su propia supervivencia. Esta competencia ha llevado a una sana co-evolución de ambos. El sistema inmunitario se define como el conjunto de moléculas, células y tejidos, presentes en los organismos, responsables de la defensa contra agentes infecciosos y otras sustancias dañinas, y por tanto encargados de mantener la integridad de los mismos [1].

La inmunología es la ciencia que estudia estos mecanismos de defensa. En sus comienzos la inmunología surge como un área estrechamente ligada a la microbiología. Su origen se le atribuye normalmente a Edward Jenner, importante por sus observaciones relacionadas a la viruela [2]. En sus comienzos, y en parte vinculado a su surgimiento, la inmunología se centró en estudiar los mecanismos de defensa contra microorganismos infecciosos, como ser bacterias, virus o protozoarios. Más recientemente, esto se ha ampliado enormemente para incluir un espectro grande de áreas de estudio, todas en las cuales el sistema inmunitario tiene un papel fundamental, como ser cáncer, alergia y autoinmunidad.

Tradicionalmente, el sistema inmunitario se divide en dos ramas: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa [1]. Es comúnmente aceptado que la rama adaptativa de la inmunidad aparece con los vertebrados, quienes poseen ambos tipos de respuesta, mientras que invertebrados y procariotas, como bacterias y arqueas, se valen únicamente de la respuesta inmune innata. Algunos componentes inmunitarios aparecieron temprano en la evolución, como los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), los péptidos anti-microbianos, y el sistema complemento, presentes en todas las plantas y animales. A esta plataforma común de respuesta se le llama sistema inmunitario innato, ya que involucra mecanismos que son heredados como tales y

están prontos para funcionar rápidamente. El sistema inmunitario alcanza su máximo grado de complejidad en los vertebrados, con el surgimiento de los componentes de la respuesta inmune adaptativa [3,4]. Se propone que el surgimiento de los genes RAG marca la aparición de la inmunidad adaptativa. Estos genes codifican para las enzimas RAG-1 y RAG-2, indispensables para el fenómeno de recombinación somática que dará lugar a la generación de receptores de las células de la inmunidad adaptativa [5].

Si bien ambos tipos de respuesta, innata y adaptativa, detectan las amenazas a través de receptores que reconocen moléculas asociadas a patógenos, los receptores pertenecientes a la respuesta innata exhiben una baja especificidad, reconociendo patrones altamente conservados en patógenos o presentes en situaciones de daño. La inmunidad adaptativa, por el contrario, se basa en la diversificación de receptores de antígenos para generar un vasto repertorio de células, cada una de ellas expresando un receptor de especificidad única [4]. Además, el sistema inmunitario adaptativo tiene, a diferencia del innato, la capacidad de generar memoria inmunitaria. Esto significa que puede recordar encuentros previos con un patógeno y repeler o eliminar al mismo en un segundo encuentro, a través de una respuesta inmune más rápida y efectiva. La capacidad de reconocer patógenos de forma específica y la memoria inmunitaria son dos propiedades fundamentales de la respuesta inmune adaptativa, ausentes en la innata [1,5].

A pesar de la aparente y muchas veces simplista separación, ambas respuestas colaboran estrechamente para combatir las amenazas, siendo la respuesta inmune innata fundamental para desencadenar y dirigir la respuesta adaptativa, y valiéndose la inmunidad adaptativa de mecanismos efectores de la respuesta innata para combatir las infecciones [6]. Además de su papel de defensa, el sistema inmunitario tiene una función fundamental en el mantenimiento del medio interno y el restablecimiento de la homeostasis luego de una infección o daño. Ejemplos de esto son el rol de los macrófagos al fagocitar células apoptóticas, o las funciones de limpieza llevadas a cabo por el sistema complemento [7,8]. En el otro sentido, es cada vez más claro que el medio interno puede condicionar la respuesta inmune de un individuo, pudiendo factores tanto genéticos, como epigenéticos y ambientales explicar la variabilidad encontrada en el sistema

inmunitario entre individuos. A través del proyecto “Milieu intérieur” se vienen haciendo esfuerzos en entender como estos distintos factores controlan, o explican, la variabilidad entre los individuos y como pueden condicionar la respuesta de estos a infecciones o vacunas, siendo una contribución importante en camino a una medicina más personalizada [9].

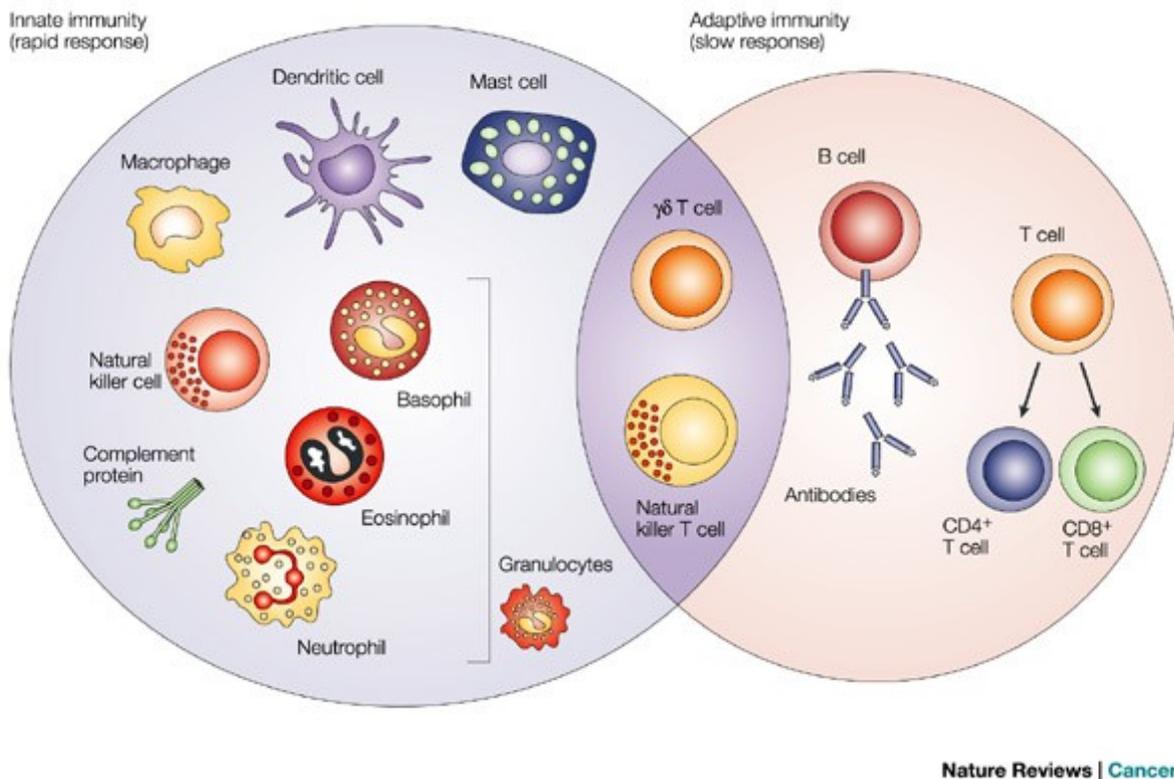
Aunque muchas veces se ve opacada por la espectacularidad del sistema inmunitario adaptativo, la rama innata de la inmunidad es fundamental. Tanto para contener posibles infecciones como para el mantenimiento y restablecimiento de la homeostasis, siendo clave también en muchos procesos patológicos.

RESPUESTA INMUNE INNATA

La respuesta inmune innata es la primera en activarse frente a una amenaza, siendo una respuesta rápida y, muchas veces, suficiente por si sola para controlar el peligro. Presenta ciertas características que la diferencian de la respuesta inmune adaptativa, como una especificidad limitada y que no genera memoria. La respuesta inmune innata se integra tanto de elementos solubles como componentes celulares y es esencial para la supervivencia del organismo. Defectos genéticos en alguno de sus actores, conducen a inmunodeficiencias graves [1].

La piel y las mucosas son la primera línea de defensa contra las infecciones, sirviendo de barreras entre el medio interno y el exterior del organismo. Los epitelios actúan como barrera física, dificultando la entrada de microorganismos por vía transcelular, gracias a las uniones estrechas presentes entre las células, y también constituyen barreras químicas y microbiológicas [1].

Dentro de los elementos solubles que forman parte de la respuesta inmune innata se encuentran los péptidos antimicrobianos y el sistema complemento. Los primeros son producidos por células en los tractos respiratorio, digestivo y genitourinario, y están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se generan en respuesta al reconocimiento de un patógeno por un receptor celular y actúan sobre propiedades físicas de los microbios, de forma que no se genera resistencia, miembros destacados de este grupo son las defensinas [10]. El sistema complemento está compuesto de una serie de proteínas plasmáticas, producidas mayoritariamente por el hígado, y proteínas de membrana presentes en la superficie celular. Las proteínas del complemento colaboran en cascada con la opsonización de patógenos e inducen una serie de respuestas inflamatorias que ayudan a las células del sistema inmunitario a combatir la infección y mantener la homeostasis. Dependiendo del contexto, el sistema complemento se puede activar por tres vías: la vía clásica, la vía alternativa y la vía de las lectinas [11].



Nature Reviews | Cancer

Figura 1. Componentes celulares y moleculares de inmunidad innata y adaptativa. Se ejemplifican algunos de los principales componentes celulares y moleculares de la inmunidad adaptativa y la inmunidad innata. Imagen de dominio público.

El sistema inmune innato también está formado por un conjunto de células, que al igual que los linfocitos B y T del sistema inmunitario adaptativo, derivan de una célula madre hematopoyética común. Dentro de las células que se consideran parte del sistema inmunitario innato se encuentran: los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), mastocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y células NK (**Figura 1**). A excepción de las células NK, el resto se originan de un progenitor mieloide común. Algunas de estas células circulan en la sangre y son reclutadas a sitios de infección o daño, como es el caso de los neutrófilos, mientras que otras, como macrófagos y células dendríticas, además de poder ser reclutadas, residen en los tejidos actuando como centinelas, capaces de detectar y responder a amenazas [1].

En 1989, Janeway propuso el modelo de lo extraño para explicar como el sistema inmunitario es

capaz de distinguir entre lo propio y lo no propio y activarse sólo en este último caso. Este modelo planteaba que el inicio de la respuesta inmune estaría en el reconocimiento a través de receptores, a los que llamó receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, pattern recognition receptors), de estructuras y productos de origen microbiano por parte de células presentadoras de antígeno (APC). Frente a esta señal la APC se activaría aumentando la expresión de moléculas coestimuladoras, lo que le permitiría activar a los linfocitos T y desencadenar una respuesta inmune adaptativa [12]. Sin embargo, aunque esto explicaba la respuesta a bacterias y microorganismos evolutivamente distantes, no podía explicar la respuesta inmune a transplantes o tumores.

Más tarde, Polly Matzinger propuso otra teoría, que permitiría llenar este vacío. En su “modelo del peligro” plantea que las APC son activadas por señales de alarma liberadas por los tejidos lesionados, ya sea aquellos infectados por patógenos o expuestos a toxinas, daño mecánico y muerte por necrosis. Estas señales no son emitidas por células sanas o que experimentan muerte celular programada, de manera que las APC se activarían frente a un entorno de daño y así comenzarían una respuesta inmune [13]. Este modelo explicaría como incluso lo propio, cuando alterado, podría desencadenar una respuesta. Si bien en su momento ambas teorías parecieron oponerse, hoy en día es aceptado que se complementan, ya que tanto señales dadas por el reconocimiento de elementos extraños como señales de peligro debido a daño son capaces de activar a células del sistema inmunitario para desencadenar una respuesta.

La infección y/o el daño tisular son detectados por diversos tipos celulares pero particularmente por células dendríticas (DCs) y macrófagos a través de PRRs, codificados en la línea germinal. Los PRRs reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), altamente conservados por ser fundamentales para la supervivencia de los mismos, y patrones asociados a daño (DAMPs) generados como consecuencia de un daño, ya sea causado por un patógeno o una lesión estéril [14,15].

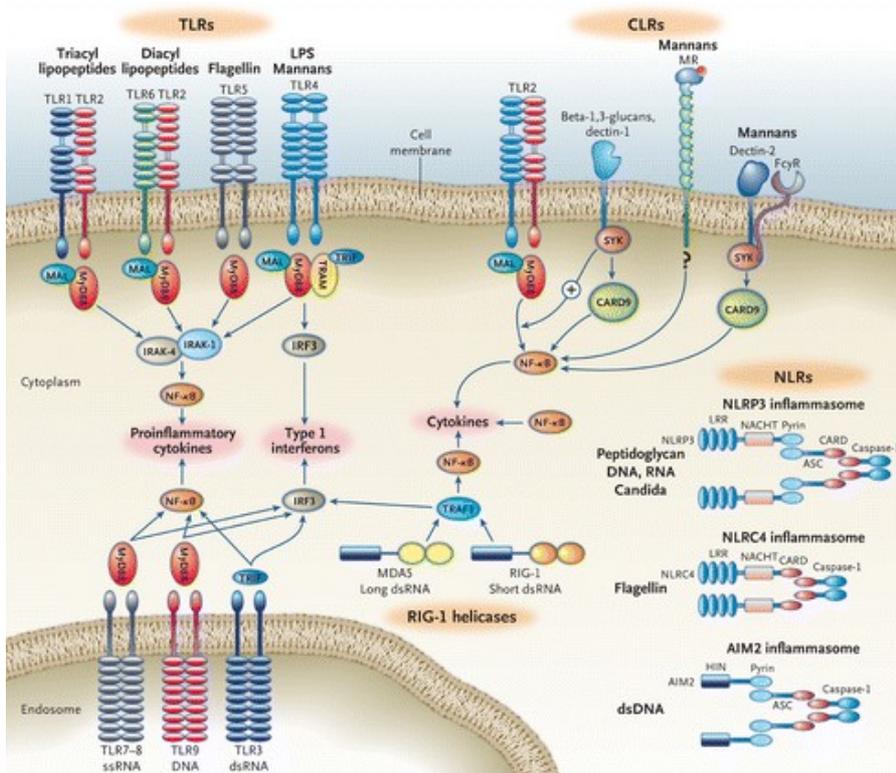


Figura 2. Principales PRRs presentes en células dendríticas y macrófagos. En la imagen se pueden observar los principales tipos de PRRs presentes en células dendríticas y macrófagos, como ser: TLRs, CLRs (receptores de lectinas tipo C), NLRs y helicases RIG-1. Mientras que TLRs y CLRs tienen una localización transmembrana, RIG-1 y NLRs se encuentran en el citoplasma celular. Se esquematizan también algunas de las vías de señalización intracelular que llevan a la producción de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas e interferones de tipo I, así como los ligandos principales conocidos de algunos de estos receptores. Imagen de dominio público.

Dentro de estos receptores se destacan los receptores tipo Toll (TLR, *Toll like receptors*), receptores transmembranarios presentes tanto en la membrana plasmática como en la membrana de vesículas, y los receptores tipo NOD (NLR, *Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing*) de localización citoplasmática, entre otros (**Figura 2**). La localización de los distintos tipos de receptores se relaciona con el tipo de patógeno que detectan. La activación de PRRs lleva a una señalización celular que desencadena la producción de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas e interferones de tipo I, así como la inducción de una respuesta inflamatoria y antimicrobiana [15]. Estas respuestas innatas son también responsables de instruir el desarrollo de una respuesta adaptativa específica del patógeno y apropiada para eliminarlo [16]. La respuesta innata generada es entonces fundamental para desencadenar e instruir una respuesta adaptativa, así como para, en contextos de daño, tanto debido a patógenos como lesión estéril, dirigir la reparación del tejido. A continuación, nos centraremos en la respuesta inflamatoria, ya que la misma es crítica por su papel tanto en condiciones fisiológicas como en patología.

RESPUESTA INFLAMATORIA

Podemos definir la inflamación como una respuesta inespecífica y autolimitada, durante la cual se ponen en marcha un conjunto de mecanismos que coordinan elementos inmunológicos, vasculares, neurales y metabólicos [17]. Básicamente, la respuesta inflamatoria aguda, desencadenada por infección o injuria, implica el envío coordinado de componentes sanguíneos (plasma y leucocitos) y extravasación de estos al tejido conectivo, acompañado de alteraciones sistémicas (a nivel del hígado e hipotálamo), que son funcionales a la eliminación de la noxa y/o reparación tisular.

Esta respuesta está mejor caracterizada para infecciones por microbios, donde un reconocimiento inicial por parte de leucocitos residentes, a través de PRRs, lleva a la producción de una amplia variedad de mediadores inflamatorios: citoquinas, quimioquinas, aminas vasoactivas, eicosanoides, y productos de cascadas proteolíticas. Los mediadores solubles generados durante la inflamación actúan principalmente sobre la microcirculación generando cambios en las células endoteliales y en los leucocitos circulantes. Un aumento en la permeabilidad endotelial favorece el pasaje al tejido de plasma conteniendo anticuerpos y proteínas del sistema complemento. El endotelio activado permite además la extravasación selectiva de leucocitos reclutados desde la sangre, principalmente neutrófilos y monocitos, mientras evita la salida de eritrocitos [18]. Una vez en el sitio de infección los neutrófilos se activan, ya sea por contacto directo con el patógeno o por citoquinas secretadas por las células residentes e intentan matar a los microorganismos invasores mediante desgranulación y generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno, en lo que se conoce como estallido respiratorio (**Figura 3**) [19].

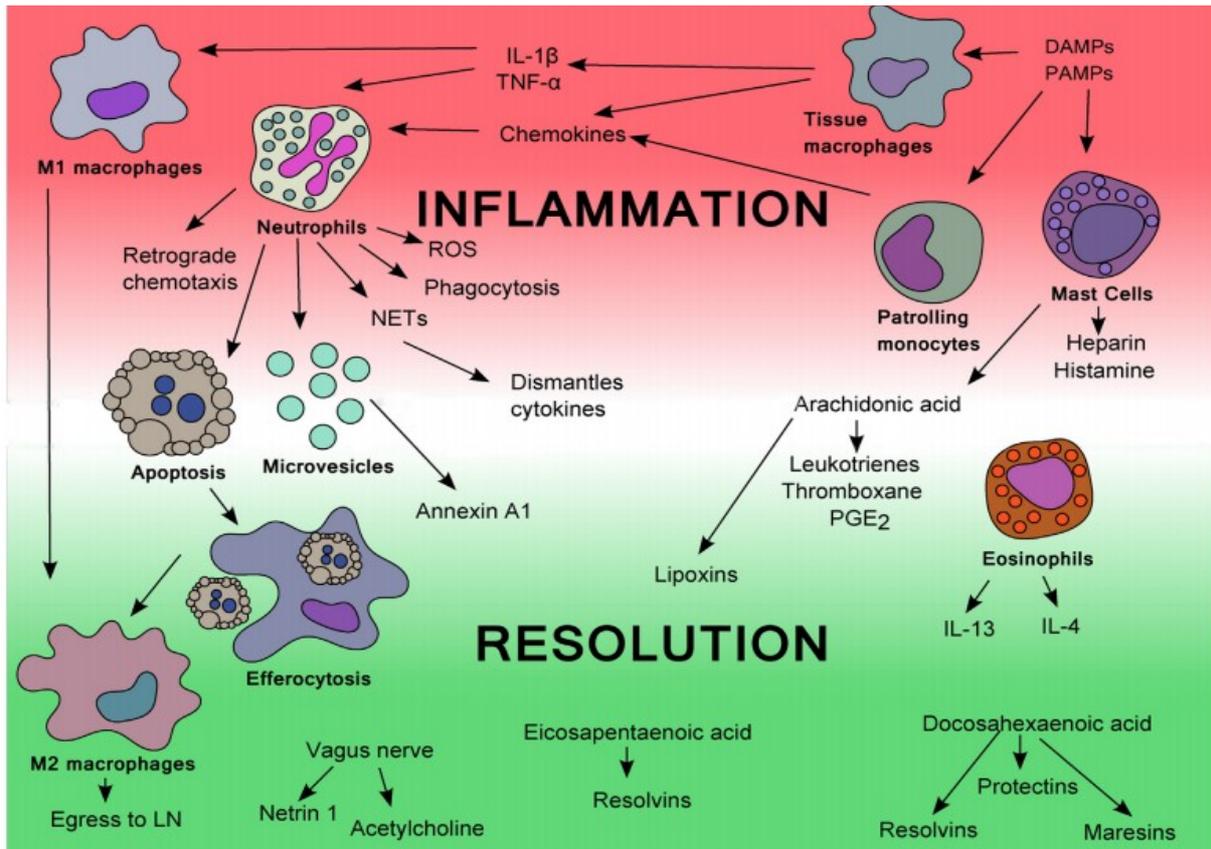


Figura 3. Mecanismos de inflamación y resolución de la inflamación. En la figura se resumen algunos de los eventos claves de la respuesta inflamatoria así como de su resolución. DAMPs y/o PAMPs son reconocidos por las células residentes y gatillan en ellas la producción y liberación de mediadores inflamatorios como ser: metabolitos del ácido araquidónico, quimiocinas y citoquinas. Entre estas últimas se destacan el TNF- α y la IL-1 β . Estos mediadores contribuyen al reclutamiento y activación de neutrófilos y la diferenciación de macrófagos clásicamente activados (M1). La resolución de la inflamación es un proceso activo en el que participan mediadores pro resolutorios. Se destaca la muerte por apoptosis de los neutrófilos y un cambio en el perfil de activación de los macrófagos a macrófagos alternativamente activados (M2). Imagen extraída de Headland SE, Norling LV. The resolution of inflammation: Principles and challenges. Semin Immunol. 2015.

La inflamación generada como consecuencia de un trauma, isquemia o daño por un producto químico o radiación, generalmente no involucra la presencia de ningún microorganismo y es llamada inflamación estéril. Similar a la inflamación inducida por infecciones, está marcada por el reclutamiento de neutrófilos y monocitos (que se diferenciarán a macrófagos en el tejido), así como la producción de mediadores como quimiocinas y citoquinas proinflamatorias, entre las que podemos destacar el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleuquina 1 (IL-1). Los mecanismos que desencadenan la inflamación estéril son menos comprendidos que los involucrados en la respuesta frente a infección. Sin embargo, hoy en día es claro que los PRRs son

capaces de reconocer también materiales no infecciosos que pueden causar daño a los tejidos y moléculas endógenas que normalmente se encuentran en el interior celular y son liberadas al medio en situaciones de muerte celular inmunogénica. Estos DAMPs son funcionalmente similares a los PAMPs en cuanto a su habilidad de activar vías proinflamatorias [20]. Cuando los PAMPs o DAMPs se unen a los PRRs, se desencadenan vías de señalización intracelulares que confluyen en la activación de factores de transcripción como NFκB y AP-1. Estos factores actúan en conjunto para inducir la expresión de mediadores inflamatorios como COX-2, TNF-α e IL-1β.

Una respuesta inflamatoria aguda exitosa resulta en la eliminación del agente infeccioso o la injuria, a la cual le sigue una fase de resolución y reparación, que está mediada principalmente por macrófagos residentes y reclutados [18]. La respuesta inflamatoria debe estar limitada y ser autoregulada. La respuesta aguda exacerbada y sistémica frente a un patógeno puede conducir a la muerte rápida del individuo por sepsis. En otros casos, la persistencia del agente causante de infección o injuria lleva a que la inflamación aguda no resuelta derive en inflamación crónica. Esta respuesta persistente en el tiempo produce alteraciones y daño en los tejidos, terminando en enfermedad. Existen varios ejemplos de esto. Desde infecciones crónicas y enfermedades autoinmunes, hasta patologías como diabetes tipo 2, aterosclerosis, o cáncer, presentan un componente inflamatorio [21].

En este equilibrio entre respuesta beneficiosa y enfermedad son fundamentales los mecanismos reguladores que se ponen en juego durante la respuesta inflamatoria para limitarla, tanto en magnitud como en duración. Históricamente, se creía que la resolución de la inflamación era un proceso pasivo en el cual las células mediadoras de la respuesta morían, dejaban de producir componentes pro-inflamatorios y la respuesta se diluía hasta concluir. Sin embargo, actualmente se comprende que la resolución de la inflamación es un proceso activo cuidadosamente controlado. La deficiencia en cualquiera de los componentes reguladores puede llevar a una sobre activación e inflamación crónica descontrolada [22]. Ejemplo de esto último son los síndromes periódicos asociados a criopirinas (CASPs) que constituyen situaciones patológicas originadas por defectos genéticos en mecanismos reguladores de la inflamación [23].

IL-1 β Y PATOLOGÍA

La inflamación subyace a una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos. Como se mencionó antes es una respuesta fisiológica crítica para el mantenimiento y restauración de la homeostasis, sin embargo, en determinadas circunstancias puede ser causante de enfermedad. La regulación de los distintos mecanismos involucrados en la respuesta inflamatoria es clave en determinar este balance. En este sentido, la regulación de la activación de los inflammasomas ha sido uno de los aspectos de mayor estudio en los últimos años.

Las citoquinas son actores fundamentales del proceso inflamatorio, coordinando la extravasación al tejido conectivo y la activación de leucocitos. En este sentido, la IL-1 es una citoquina clave en la respuesta inflamatoria local y sistémica, siendo un mediador capaz de promover efectos pro-inflamatorios a nivel de la médula ósea, hígado, hipotálamo, endotelio vascular, así como sobre leucocitos de la inmunidad innata y adquirida.

La IL-1, como su nombre lo sugiere, fue la primer citoquina en ser descrita. La familia IL-1 incluye 11 miembros, dentro de los cuales se encuentran la IL-1 α y la IL-1 β , dos citoquinas relacionadas pero distintas. La IL-1 afecta virtualmente todas las células y órganos, siendo un mediador patogénico principal de enfermedades autoinflamatorias, autoinmunes, infecciosas y degenerativas [24]. Tanto la IL-1 α como la IL-1 β se unen al mismo receptor en la membrana plasmática (IL-1R1), que se encuentra expresado en prácticamente todos los tipos celulares. Al unirse al receptor, la IL-1 desencadena una cascada de mediadores inflamatorios, quimioquinas y otras citoquinas [25]. Se ha aprendido mucho de los efectos biológicos de la IL-1 α e IL-1 β a través de pacientes a los que se les administraron bajas dosis de estas citoquinas para mejorar la función hematopoyética. Estos experimentaban una toxicidad inaceptable con fiebre, pérdida de apetito, dolores generalizados articulares y musculares, fatiga, hipotensión y alteraciones del sueño y gastrointestinales [26].

Tabla 1. Ejemplos de condiciones tratadas con agentes bloqueantes de IL-1 en las cuales esta citoquinas podría estar teniendo un rol en su patología. Obtenido y adaptado de Dinarello CA, Simon A, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. Nat Rev Drug Discov. 2012;11(8):633-52.

Enfermedades de articulaciones, huesos y músculos
- Artritis Reumatoidea
- Osteoartritis erosiva de la mano
- Osteomielitis recurrente multifocal
- Lesión traumática de rodilla: policondritis recidivante
Enfermedades autoinflamatorias sistémicas heredadas
- Fiebre mediterránea familiar
- Síndromes periódico asociado a criopirinas (CASPs)
- Síndrome periódico asociado al receptor de TNF
- Síndrome de hiper IgD
- Deficiencia del receptor antagonista de IL-1
Enfermedades inflamatorias sistémicas
- Artritis sistémica juvenil idopática
- Síndrome Schnitzler
- Síndrome de activación de macrófagos
Enfermedades inflamatorias comunes
- Gota, pseudogota
- Diabetes tipo 2
- Hidradenitis supurativa
- Fallo cardíaco sistólico; remodelación cardíaca
- Síndrome del ojo seco
- Psoriasis pustulosa; dermatosis neutrofílica

Se ha demostrado ampliamente el papel patogénico de la IL-1 en procesos diversos, como la diabetes tipo II, injuria isquémica, aterosclerosis, gota, artritis reumatoidea, entre otras. La mejor evidencia del rol patológico de estas citoquinas proviene de su bloqueo específico. El bloqueo de la IL-1 comenzó en 1993 con la introducción del Anakinra, la forma recombinante del antagonista natural del receptor de IL-1 (IL-1RA), que anula la actividad de la IL-1 α y la IL-1 β . Actualmente el Anakinra domina esta área terapéutica aunque también existen otros agentes bloqueantes aprobados para su uso y en fase clínica. La utilización del anakinra y otros bloqueantes con

resultados prometedores en ensayos clínicos habla por sí sola de la relevancia de la IL-1 en muchas de esas enfermedades, ejemplos de condiciones tratadas con estas moléculas se muestran en la **Tabla 1** [26].

La IL-1 β juega también un papel central en un grupo de enfermedades llamadas autoinflamatorias. Las enfermedades autoinflamatorias se dan por una activación patológica del sistema inmune innato en ausencia de autoanticuerpos y células T auto-reactivas [27]. Desde un punto de vista clínico, las enfermedades autoinflamatorias se caracterizan por episodios recurrentes de fiebre, fatiga generalizada, dolores difusos en músculos y articulaciones, pérdida de apetito y alteraciones del sueño. Los monocitos de pacientes con enfermedades autoinflamatorias secretan más IL-1 β que las células de individuos sanos y estos tienen una rápida y completa mejoría al ser tratados con Anakinra. Las enfermedades autoinflamatorias son desórdenes genéticos raros que incluyen a los CASPs, la fiebre mediterránea familiar, síndrome de hiper IgD y síndrome periódico asociado al receptor de TNF [26].

En 2001, Hal Hoffman describió que el defecto genético primario de los pacientes que sufren de CASPs se sitúa a nivel de mutaciones activadoras de la proteína NLRP3 (nucleotide-binding domain and leucin-rich repeat containing protein 3), llamada en un inicio criopirina [23]. La relación causal entre las mutaciones de NLRP3 y enfermedades autoinflamatorias mediadas por IL-1 β fueron fundamentales para comprender el mecanismo de activación post-traducciona

l de esta citoquina. A diferencia de la IL-1 α , la IL-1 β no se encuentra en las células de individuos sanos sino que se requieren una serie de eventos intracelulares antes de que esta citoquina pueda cumplir su función. La principal fuente de IL-1 β son los fagocitos mononucleares: macrófagos y DCs. La producción de IL-1 β activa y su posterior secreción al medio extracelular suele precisar dos señales distintas: una que activa la transcripción génica y la producción de un precursor de 33 kDa, proIL-1 β , y una segunda señal que activa a un complejo intracelular de proteínas llamado inflammasoma, responsable de clivar la proIL-1 β a su forma activa (**Figura 4**). Un paso limitante en la producción de IL-1 β es su transcripción, el estímulo puede ser un producto microbiano, por ejemplo

lipolisacárido (LPS), o incluso citoquinas como TNF, IL-18, IL-1 α y la propia IL-1 β . El precursor de IL-1 β es inactivo, requiriendo ser clivado por la enzima caspasa-1, una proteasa de cisteína. La caspasa-1 también existe en las células como un precursor inactivo, su activación ocurre luego del ensamblado del inflammasoma [24,25].

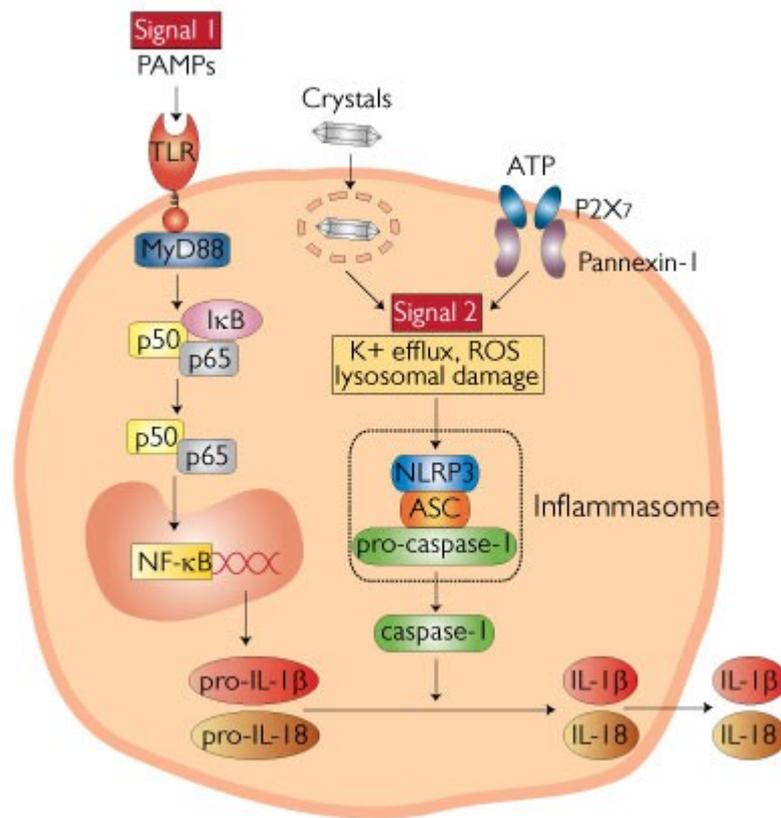


Figura 4. Generación y liberación de IL-1 β . La IL-1 β requiere de una serie de pasos para su generación y activación. La señal 1 puede estar dada por un PAMP el cual es sentido a través de un TLR. Esto desencadena vías de señalización intracelulares que confluyen en la activación del factor de transcripción NF κ B, el que entre otras acciones estimula la producción de pro-IL-1 β y pro-IL-18, estas formas pro deben ser clivadas a su forma activa por la enzima caspasa-1. La señal 2 conduce a la activación del inflammasoma necesario para el clivado de la pro-caspasa-1 a su forma funcional, en la figura se ejemplifican algunos de los estímulos conocidos que conducen al ensamblado y activación del inflammasoma NLRP3 como ser el eflujo de potasio, la producción de ROS o el daño lisosomal.

Por lo mencionado anteriormente parece claro que la regulación de la producción y acción de la IL-1 β son procesos claves en determinar el equilibrio salud-enfermedad, así como puntos interesantes de investigación, con relevancia en múltiples enfermedades y trastornos (más adelante se profundizará en su relación con el proceso tumoral). El bloqueo de la acción biológica de la IL-1 β utilizando anticuerpos neutralizantes o antagonistas de su receptor, es un área ampliamente explotada actualmente. Sin embargo, otro punto de control importante es la producción de esta potente citoquina a través del inflammasoma. En este sentido, es importante comprender los mecanismos que regulan estos complejos multiproteicos.

EL INFLAMASOMA NLRP3

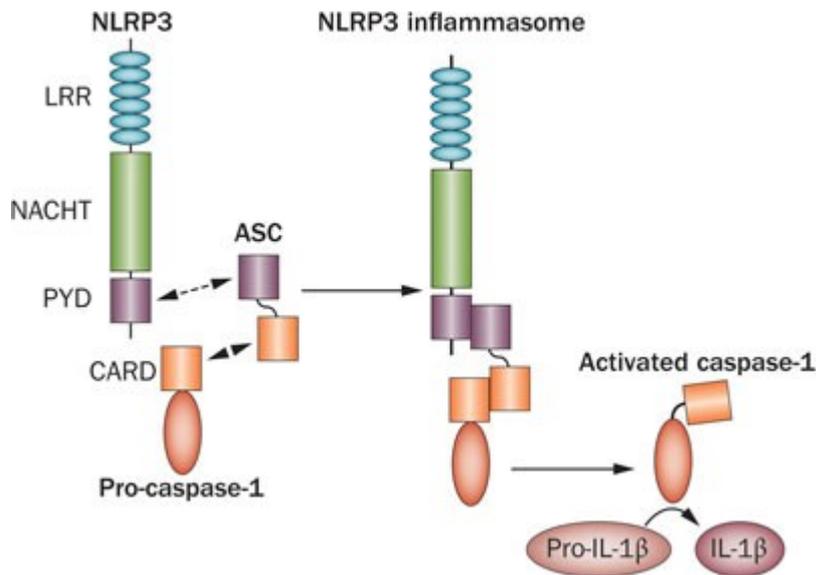
Los inflammasomas son complejos citosólicos ensamblados en respuesta a patógenos invasores y otras señales de daño. Típicamente comprenden una proteína sensora perteneciente a la familia de receptores tipo AIM-2 (absent in melanoma 2), ALR, o a la familia NLR (NOD-like receptors) una proteína adaptadora ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) y el zimógeno inactivo procaspasa-1. La activación del inflammasoma conduce a la generación de la forma activa de esta última mediante un clivaje proteolítico. Entre otros substratos, la caspasa-1 activa es capaz de clivar a la proIL-1beta y la proIL-18, generando las formas activas de estas potentes citoquinas pro-inflamatorias (**Figura 5**). La activación del inflammasoma induce además una forma de muerte inflamatoria altamente inmunogénica, llamada piroptosis [28,29].

A pesar de su localización citosólica, los inflammasomas son capaces de montar una respuesta efectiva contra bacterias extracelulares, intravacuolares o intracelulares, hongos y virus. Además son capaces de sensor sustancias cristalinas como sílica y aluminio y señales endógenas de daño como el ATP. Los NLRs y AIM-2 constituyen los inflammasomas mejor caracterizados. Sin embargo, estudios recientes han identificado nuevos inflammasomas formados por proteínas sensoras no NLRs como pirina, que serían importantes en infecciones microbianas [30].

Los NLRs son una familia conservada de receptores de localización intracelular con 22 miembros en humano y 34 en ratón. Con algunas pocas excepciones, los miembros de la familia de sensores NLR tienen una estructura tripartita con un dominio C terminal LRR, un dominio central NACHT, y un dominio N terminal de reclutamiento y activación de caspasa (CARD) o pirina (PYD). Una vez activados los NLRs oligomerizan mediante sus dominios NACHT resultando en el reclutamiento de la proteína adaptadora ASC, esta interacciona a través de su dominio PYD con el dominio PYD presente en el NLR. Luego, ASC recluta a la procaspasa-1 a través de su dominio CARD, véase **Figura 5** donde se representan los dominios de las proteínas NLRP3, ASC y procaspasa-1 [31]. Los

NLRs que presentan un dominio N terminal CARD no requieren de ASC como proteína adaptadora. Los NLRs se clasifican en dos grandes grupos en función del dominio amino terminal. Así, las proteínas que contienen dominios CARD se denominan NLRCs, y las que contienen dominios pirina se denominan NLRPs. Dentro de los NLRs, el NLRP3 es el mejor caracterizado y más ampliamente estudiado de los inflammasomas, probablemente por su capacidad de ser activado por una vasta variedad de estímulos asociados a infección e inflamación estéril. De manera similar a la propia IL-1 β , el NLRP3 requiere de dos pasos de activación. Primero debe ser transcrito y traducido para luego ser activado [32]. El mecanismo exacto por el cual varios estímulos son capaces de activar el inflammasoma NLRP3 permanece poco claro, sin embargo, estudios recientes indicarían que podrían estar involucradas vías canónicas y no canónicas de activación.

Figura 5. El inflammasoma NLRP3. El inflammasoma NLRP3 está formado por tres componentes: una proteína tipo receptor NOD (NOD-like receptor, NLR), la proteína adaptadora ASC y pro-caspasa-1. La proteína sensora NLRP3 contiene tres dominios: LRR, NATCH y PYD, a través de este último interacciona con el dominio PYD presente en ASC. ASC contiene un dominio CARD a través del cual recluta a la Pro-caspasa-1. El ensamblado de estos componentes para formar el inflammasoma NLRP3 lleva al clivado y activación de la caspasa-1, que posteriormente cliva la pro-IL-1 β para generar IL-1 β madura. Abreviaciones: ASC, apoptosis-associated speck-like protein containing CARD; CARD, caspase activation and recruitment domain; LRR, leucine-rich repeat region; NLRP3, NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3; PYD, pyrin domain. Imagen extraída de Rock KL, Kataoka H, Lai JJ. Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities. *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9(1):13-23.



De forma canónica, el inflammasoma NLRP3 es activado por bacterias Gram positivas como *Staphylococo aureus*, virus como el virus de la gripe, toxinas formadoras de poros, así como ligandos endógenos y sustancias cristalinas como el ATP, la sílica y el aluminio. Se cree que en lugar de interactuar directamente con la proteína sensora estos activadores inducen uno o más eventos corriente abajo o perturbaciones dentro de la célula que llevan a su activación. Los eventos generalmente aceptados que activarían al inflammasoma NLRP3 incluyen el eflujo de potasio, la generación de ROS mitocondriales, la liberación de catepsina como resultado de desestabilización de la membrana fagosomal, la liberación de ADN mitocondrial o cardiolipina, y la translocación de NLRP3 a la mitocondria a través de la molécula adaptadora MAVS [31]. Otras señales están descritas pero permanecen aún controversiales. Nuestro interés se centra particularmente en la relación entre el flujo iónico intracelular y la regulación del inflammasoma NLRP3.

La alteración de la homeostasis iónica intracelular en respuesta a los activadores de inflammasomas ha ido tomando un peso considerable en la literatura. En estudios pioneros en la década de los 90' Perregaux et al. han mostrado que el eflujo de K^+ es responsable de la maduración de la pro-IL-1 β [33]. Se ha propuesto que la reducción de los niveles intracelulares de K^+ es la condición necesaria

y suficiente para activar al inflammasoma NLRP3 ante estímulos tan variados como tratamiento con ATP, fagocitosis de material particulado o aún exposición a un medio hipotónico [34]. Recientemente se ha demostrado que disturbios en la concentración iónica intracelular generados por proteínas viroporinas de virus pueden actuar como vía de reconocimiento del patógeno y gatillar la activación del inflammasoma, mostrando la relevancia de este mecanismo en infecciones virales [35]. A pesar de la importancia reconocida del eflujo de K^+ en la activación del inflammasoma NLRP3, la identidad molecular del/los canal/es que median ese transporte permanecen aún desconocidas [36]. Además, la relación del flujo de otros cationes, en particular del calcio, con el eflujo de K^+ es un tema mal comprendido y de intensa investigación. Quedan entonces aún muchas preguntas sin responder en relación al impacto de la homeostasis iónica en la activación de inflammasomas y en cuanto a que moléculas estarían participando en este proceso.

LA LINEA CELULAR THP-1 PARA EL ESTUDIO DE LA INFLAMACIÓN *IN VITRO*

Los macrófagos son células en particular relevantes en lo que a activación del inflamasoma se refiere. Existen varios métodos para estudiarlas *in vitro*. Los más utilizados son la diferenciación de macrófagos a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y las líneas celulares monocíticas con diferentes grados de diferenciación [37].

El uso de líneas celulares tiene múltiples ventajas sobre los cultivos primarios y monocitos-macrófagos derivados de PBMC. La base genética es más homogénea, lo cual disminuye la variabilidad fenotípica entre células y facilita la reproducibilidad de los resultados. Por otro lado, esta base homogénea, permite realizar modificaciones genéticas, como la transfección de genes. Además, monocitos-macrófagos primarios aislados a partir de tejidos o diferenciados de PBMC presentan limitantes en cuanto al número de células que se pueden recuperar, el tiempo que sobreviven en cultivo, y la posibilidad de almacenarlas. Estos factores no existen cuando se utilizan líneas celulares inmortalizadas [37].

La línea THP-1 es una línea celular humana de leucemia monocítica aguda, generada y descrita en 1980 por Tsuchiya [38]. A partir de su establecimiento se convirtió en una de las líneas celulares más comúnmente utilizadas para el estudio de la función y regulación de monocitos y macrófagos en diversos sistemas. Estudios preliminares indican que las células THP-1 se parecen a monocitos y macrófagos primarios tanto en su morfología como capacidad de diferenciación [38]. Otras líneas celulares de monocitos-macrófagos humanas son: U937, Mono Mac 6 y ML-2, difiriendo entre sí en su grado de madurez y origen. Por ejemplo, las células U937 tienen propiedades de monoblastos, teniendo un fenotipo más inmaduro que las THP-1.

En una revisión en 2012 de Qin, Z. se realizó una búsqueda en PubMed para estimar que tanto son usadas las distintas líneas celulares en investigaciones relacionadas a inflamación, aterosclerosis y

diabetes. En la Tabla 2 se muestran los resultados encontrados en ese trabajo del 2012 para los criterios de: número de trabajos totales y trabajos asociados a inflamación, para cada línea celular [39]. A esto se le agregó los resultados que se encontraron este año utilizando los mismos criterios de búsqueda. Para la búsqueda se incluyó el nombre de cada línea celular y el término “inflamación”. En el total de estudios las células U937 son las más utilizadas seguidas de las THP-1, se debe tener presente que las primeras fueron descritas antes, lo que puede estar relacionado a que sean utilizadas en un número mayor de trabajos. Sin embargo, si se toma en cuenta la tendencia de los últimos años, parece incrementarse la utilización de la línea THP-1 con respecto a las demás. En particular, en estudios asociados a inflamación son las más utilizadas, incluso más que las U937 (**Tabla 2**).

Tabla 2. Utilización de la línea THP-1. Número de estudios que utilizan células THP-1, U937, ML-2 o Mono Mac 6, basado en una búsqueda en PubMed realizada en los años 2011^a y 2015^b.

	2011		2015	
	Nombre línea celular	Nombre línea celular e inflamación	Nombre línea celular	Nombre línea celular e inflamación
THP-1	4942	780	6841	1325
U937	8286	609	9626	805
ML-2	673	27	774	37
Mono mac 6	286	35	310	41

^a La búsqueda en PubMed fue realizada el 27 de Mayo de 2011

^b La búsqueda en PubMed fue realizada el 12 de enero de 2015

Las células THP-1 pueden ser diferenciadas a partir de su estado de monocitos a células similares a macrófagos utilizando varios estímulos. Parece existir cierto consenso relativo a que el PMA es el factor de diferenciación más efectivo para obtener macrófagos maduros derivados de células THP-1, con características, en cuanto a su capacidad fagocítica y producción de IL-1 β y TNF- α , parecidas a macrófagos derivados de PBMC [37].

Las células THP-1, tanto en su estado de monocitos como de macrófagos diferenciados, son ampliamente utilizadas para el estudio de mecanismos implicados en la inflamación. Son activadas por estímulos inflamatorios como la exposición a LPS o citoquinas pro-inflamatorias por períodos

de 3 a 6 h, respondiendo con cambios en la expresión de genes relacionados a inflamación (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- α) y una activación de la vía de NF- κ B. Un estudio muestra que el LPS induce una respuesta transcripcional en macrófagos diferenciados a partir de células THP-1 similar a la que genera en macrófagos derivados de PBMC, constituyendo un buen modelo para estudiar mecanismos en los que este implicado el LPS y la expresión de genes dependiente de NF- κ B [40]. Como se explicó anteriormente esta vía es clave durante la producción y liberación de IL-1 β , activando la expresión de proIL-1 β en respuesta a LPS. Además, estas células expresan NLRP3, a diferencia de otras líneas macrofágicas, como por ejemplo las de origen murino. Esta línea celular parece entonces en particular óptima para estudiar los mecanismos de regulación de los inflammasomas *in vitro*.

INFLAMACIÓN Y CÁNCER

Durante mucho tiempo el estudio del cáncer se centro de manera exclusiva en las células tumorales, sin tener en consideración el resto de las células que conforman el microambiente donde se desarrolla el tumor. El sistema inmunitario es un determinante fundamental en el desarrollo y la evolución de los tumores. En este sentido, la inflamación ha sido recientemente incluida como un “hallmark” del cáncer [41].

La desregulación de la respuesta inflamatoria juega un rol central en el desarrollo del tumor, incluido su inicio, promoción, progresión, y metástasis, así como en la respuesta al tratamiento. La primera evidencia que vinculó la inflamación con el crecimiento tumoral fue realizada por Rodolf Virchow quien describió un infiltrado leucocitario presente junto a los tumores [42]. En una primera instancia se creyó que este infiltrado era indicativo de inmunovigilancia y respuesta inmune anti-tumoral, sin embargo, ahora es claro que este infiltrado puede ejercer tanto efectos anti-tumorales como pro-tumorales. Esto último se explica por diferentes mecanismos. Por ejemplo, las células inflamatorias infiltrantes del tumor pueden favorecer su desarrollo a través de la inducción de angiogénesis, producción de mediadores inflamatorios que promueven la proliferación celular, o facilitando la metástasis al remodelar la matriz extracelular [43]. De hecho, ciertos infiltrados inflamatorios se han asociado a un mal pronóstico en pacientes con cáncer [44].

Si bien existe consenso en cuanto a que existe un fuerte vínculo entre inflamación y cáncer, los inflammasomas, actores centrales de la inflamación, tienen roles contradictorios en múltiples facetas de la oncogénesis. Por un lado afectan positivamente vías autónomas de muerte celular en la célula y potencian la inmunovigilancia tumoral, y por otro también estimulan procesos autócrinos y parácrinos que favorecen la inflamación carcinogénica, el crecimiento tumoral, la metástasis y la angiogénesis [45,46]. En células presentadoras de antígeno los inflammasomas pueden estimular respuestas inmunes anti-tumorales. Además, la actividad de los inflammasomas aumenta la

eficiencia de ciertos tipos de quimioterapias (**Figura 6**) [47]. Tan controversial o más es el papel de la IL-1 β en la progresión del tumor. La IL-1 favorece la adherencia de las células tumorales al endotelio *in vitro* y la administración de esta citoquina en ratones aumenta el número de metastasis y el tamaño del tumor, además de tener un rol central en la angiogénesis [48,49]. Sin embargo, algunos autores listan a la IL-1 como una de las citoquinas que podrían ser utilizadas en inmunoterapia, activando el sistema inmune y suprimiendo los tumores [50].

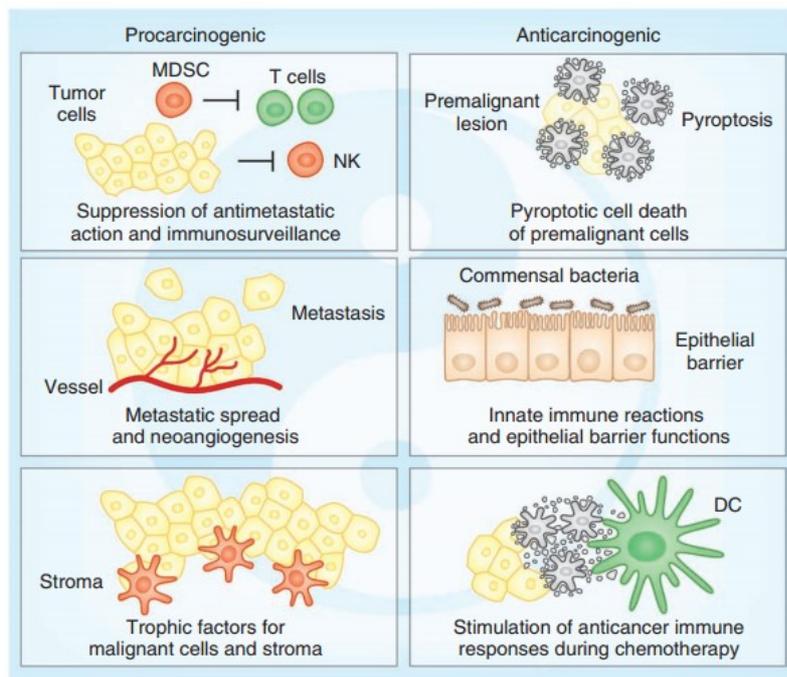


Figura 6. Roles del inflammasoma en la carcinogénesis.

El inflammasoma tiene críticos pero contrastantes roles durante la carcinogénesis. Tiene asignadas funciones procarcinogénicas como la supresión de la respuesta anti metastásica mediada por células NK y T y la inmunovigilancia. Además, favorece la agresividad tumoral y neoangiogénesis. En contraste, el inflammasoma y sus productos pueden limitar la carcinogénesis al gatillar la muerte pirotótica de células pre-malignas, sostienen una respuesta inmune contra microbiota potencialmente carcinogénica y facilitan respuestas inmunes anti-tumorales. Imágen extraída de Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. Nat Immunol. 2012;13(4):343-51.

Esta ambigüedad en torno al rol de los inflammasomas y sus productos, altamente dependiente del contexto, dificulta llegar a un acuerdo en cuanto a si inhibir o activar el inflammasoma es beneficioso en relación a la terapia del cáncer, por lo cual ampliar el conocimiento en esta área sería ampliamente beneficioso y ayudaría a comprender esta intrincada relación entre el sistema inmunitario y el cáncer. Una situación fisiopatológica donde la biología del microambiente tumoral, la inflamación y el rol de la IL-1 β están poco caracterizados y podrían tener un papel relevante, es en la leucemia linfocítica crónica (LLC). En nuestro conocimiento no existen trabajos publicados donde se caracterize el papel de los inflammasomas en la LLC.

LEUCEMIA LINFOIDE CRÓNICA

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es la leucemia más común entre los adultos en países occidentales. Se caracteriza por la acumulación lenta y progresiva de linfocitos B maduros clonales en médula ósea, sangre periférica, bazo y ganglios linfáticos. La evolución de la enfermedad presenta un curso extremadamente variable, con rangos de supervivencia que van de meses a años. La edad media de diagnóstico se sitúa entre los 62 y 72 años con una incidencia mayor en hombres que en mujeres [51]. La incidencia de la LLC varía con la composición étnica de la población estudiada, en nuestro país la tasa de incidencia anual oscila en el entorno de 4-5/100.000 habitantes/año en la población adulta, con una media etaria de 72 años y un rango de edad entre 35-90 años, con una relación 2:1 de hombres respecto a mujeres [52]. Estas tasas de incidencia son similares a las presentes en Europa Occidental.

Típicamente la LLC es detectada a través de un hemograma de rutina en ausencia de sintomatología. Para su diagnóstico es necesario que el individuo presente una linfocitosis de al menos $5 \times 10^9/L$, así como una población de células B clonales con un inmunofenotipo particular, portando entre otros el antígeno CD5 [51]. Han ocurrido grandes progresos en lo que refiere al tratamiento de la enfermedad, pudiendo obtenerse con frecuencia su remisión, sin embargo, los pacientes con frecuencia recaen, por lo cual se considera que permanece como incurable.

Una de las mayores dificultades que presenta el tratamiento de la LLC es su heterogeneidad clínica y molecular. El curso de la enfermedad es variable, pudiéndose distinguir por lo menos tres situaciones diferentes. Algunos pacientes permanecen indolentes para la enfermedad, mantienen un promedio de vida similar al del resto de la población y mueren por causas no ligadas a la misma. Otro grupo debuta con una enfermedad agresiva y tienen necesidad de tratamiento desde el momento del diagnóstico. Por último, otro tercio de los pacientes comienza con un período indolente y por causas desconocidas entran en un período de agravación. Las principales

estrategias de tratamiento se han centrado en disponer desde el diagnóstico de criterios que permitan evaluar el riesgo individual de progresión con el fin de determinar la estrategia terapéutica más adecuada.

Recientemente, se han hecho progresos en la identificación de marcadores biológicos que puedan predecir la progresión de la LLC. En particular, la expresión de genes no mutados de inmunoglobulinas, algunas anormalidades citogenéticas como las deleciones 17p y 11q y la expresión de la proteína asociada a zeta 70 (ZAP-70, zeta-associated protein 70) se vinculan a un peor pronóstico [53]. Existen dos sistemas de clasificación de riesgo, el sistema de Rai y el de Binet, donde los pacientes se clasifican mediante exámen físico y hemogramas en categorías, teniendo cada categoría una sobrevida asociada. El sistema propuesto por Binet en 1977 clasifica a los pacientes en tres categorías en función de su pronóstico: bueno, intermedio y severo (estadio A, B y C, respectivamente) [54].

Unos de los objetivos principales en el campo de la LLC es encontrar una explicación a la heterogeneidad en el pronóstico de la enfermedad, que pueda proporcionar indicios en cuanto al surgimiento de la misma y su progresión. Durante muchos años se creyó que a pesar de las diferencias en cuanto a la evolución de la enfermedad entre pacientes, esta se caracterizaba por la acumulación progresiva de linfocitos B en sangre periférica donde casi no existía proliferación tumoral. Hoy en día es claro que parte de las diferencias en cuanto al pronóstico está asociada a un delicado equilibrio entre poblaciones quiescentes y proliferantes del mismo clon leucémico en el mismo paciente [55].

Por otra parte, en los últimos años el microambiente tumoral ha cobrado un protagonismo central en la LLC apareciendo como determinante en la evolución de la enfermedad y siendo el blanco de nuevas estrategias terapéuticas. Cuando linfocitos B leucémicos son colocados en cultivo experimentan apoptosis, sugiriendo el rol de señales presentes en el microambiente tumoral en la supervivencia y proliferación de las células leucémicas [56]. Si bien se está comenzando a comprender que genes, moléculas y células están involucradas en la interacción con el

microambiente y que papeles cumplen, todavía quedan por elucidar los mecanismos moleculares mediante los cuales se promueve la acumulación/proliferación de las células tumorales. En particular, el rol de citoquinas, quimioquinas y receptores en generar un microambiente favorable así como su asociación con la evolución de la enfermedad son áreas aun poco comprendidas.

Se considera que la inflamación estaría involucrada en el inicio y progresión de la LLC. La producción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, acompañado por la activación intracelular de vías pro-inflamatorias, sugieren que la inflamación crónica contribuye a la fisiopatología y sintomatología de la LLC. La activación del proceso inflamatorio crónico, característicamente encontrado en LLC, proporciona a las células tumorales ventajas en cuanto a su supervivencia y estimula el clon leucémico. La activación constitutiva de reguladores pro-inflamatorios intracelulares como NF- κ B y STAT3 contribuye con esta inflamación crónica mediante la inducción de citoquinas inflamatorias como IL-6, cuyas actividades están potenciadas por el diálogo entre las células de LLC y su microambiente, resultando en las anormalidades cualitativas y cuantitativas encontradas en la enfermedad [57].

Las citoquinas inflamatorias contribuyen con y son el resultado de la activación de vías pro-inflamatorias en el clon tumoral, sugiriendo a estas vías como potenciales blancos de tratamiento [57]. El estudio de los mecanismos involucrados en la inflamación asociada a la LLC son importantes en la comprensión de la enfermedad y la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. Si bien parece existir un consenso en cuanto a que mayor inflamación determina un peor pronóstico, el rol de la IL-1 β aparece como controversial en la literatura, con trabajos que de manera contra-intuitiva sugieren que niveles bajos de esta potente citoquina proinflamatoria en sangre periférica se vincularía a un peor pronóstico [58].

TORID y HCA 112

En un trabajo de Louvet C et al. publicado en el año 2005 se describió por primera vez un transcripto específicamente sobreexpresado en trasplantes de corazón tolerados en rata, al cual llamaron TORID, por transcripto inducido relacionado a tolerancia (Tolerance Related and Induced transcript). Este transcripto de rata muestra homología con los transcriptos LR8/Clast1 en ratón y LR8 en humano [59]. Previamente, TORID/LR8 humano había sido identificado como un transcripto de expresión diferencial entre dos poblaciones de fibroblastos en cultivo, mientras que el ortólogo de ratón (Clast1/LR8) fue identificado como un transcripto sobreexpresado en células B luego de la estimulación con CD40 ligando [60,61].

TORID comparte una estructura similar con HCA 112 (Tmem176a), con quien presenta un 28.5% de identidad en rata y 32% en ratón [59]. Es interesante que estos dos genes se encuentran adyacentes en el mismo cromosoma, comparten un patrón de expresión y regulación similar y existe evidencia de que interactúan físicamente entre sí formando multímeros [59,62]. Todo esto sugiere la posibilidad de que interactúen a nivel celular formando parte de un mismo complejo de membrana, y compartan una función similar [62]. HCA 112 fue identificado inicialmente como un autoantígeno tumoral presente en pacientes con carcinoma hepatocelular, de donde deriva su nombre (Hepatocellular Carcinoma associated Antigen 112), atribuyéndosele un posible rol en la inmunoevasión por parte del tumor [63]. Además, se lo encontró como un transcripto sobreexpresado en los túbulos proximales del riñón de ratones que presentaban proteinuria, apareciendo junto con genes involucrados en el metabolismo, vías de degradación o en la regulación de la inflamación [64].

TORID y HCA 112 son miembros distantes de la familia de proteínas MS4A (membrane-spanning 4-domain family, subfamily A), la cual tiene 18 miembros hasta el momento, destacándose a CD20 y FcεRIβ. Si bien algunos de sus miembros tienen funciones ampliamente descritas, la función de

muchas proteínas de la familia MS4A es pobremente conocida, sugiriéndose que comprenden un conjunto de proteínas adaptadoras y reguladores del transporte iónico [65]. TORID y HCA 112 comparten características con el resto de las proteínas de la familia MS4A, atraviesan la membrana cuatro veces, tienen un tamaño similar, y una organización intrón-exón de sus genes también parecida (**Figura 7**) [65]. Los genes MS4A se encuentran en la mayoría de los grupos de vertebrados, mientras que los Tmem176 solo en mamíferos y peces óseos [66].

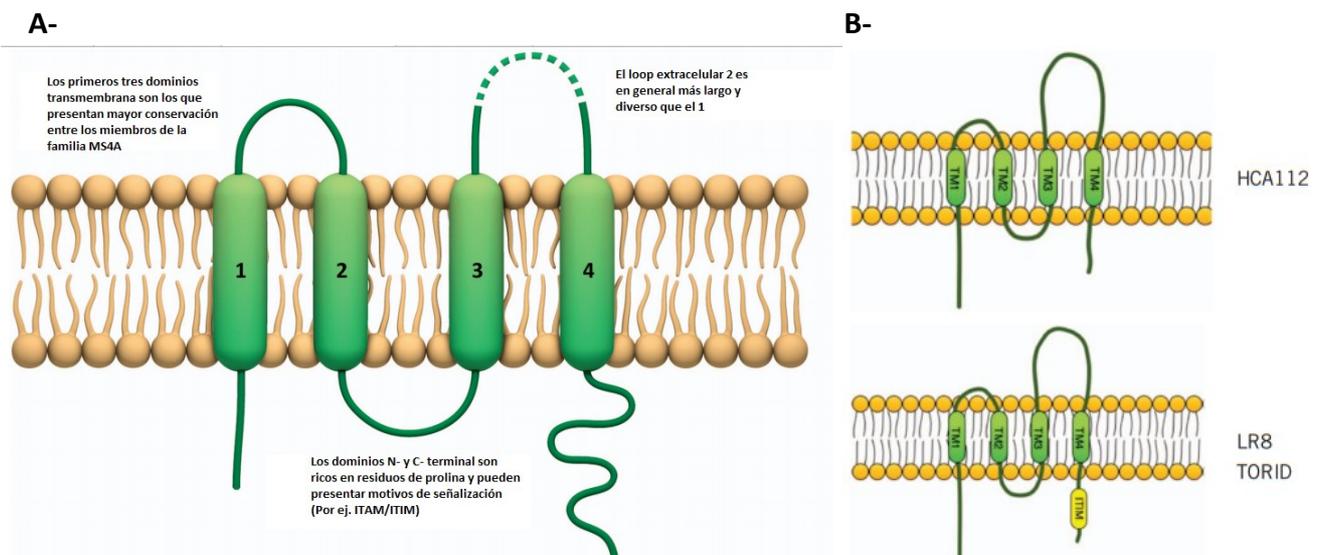


Figura 7. Estructura de TORID y HCA 112. Se muestra un diagrama de la topología consenso de la familia de proteínas MS4A, destacándose las características más relevantes (**A**) y un esquema de la disposición de TORID y HCA 112 en la membrana citoplasmática (**B**), nótese que TORID presentaría un dominio ITIM (dominio de inhibición basado en tirosinas) en una de sus colas citoplasmáticas. Imágenes adaptadas de Eon Kuek et al. 2015.

Tanto TORID como HCA 112 pueden ser consideradas proteínas de expresión ubicua en mamíferos, no estando restringidas a ningún tejido en particular en las especies estudiadas. La expresión de TORID y HCA 112 en tejidos de rata y ratón fue analizada en diferentes trabajos utilizando PCR cuantitativa, encontrándose que, en líneas generales, se expresa preferencialmente en tejidos linfoides [59,62]. La expresión del ARN mensajero para HCA 112 en ratón sigue exactamente el mismo patrón que para TORID [62]. En humano existe una expresión alta del ARN mensajero para ambas proteínas en riñón, hígado, colon, intestino delgado y ovario, además, los transcritos para TORID también se encontraron presentes en gran cantidad en pulmón, cerebro y timo [67].

A nivel de leucocitos, en el trabajo de Louvet C et al. (2005) la mayor expresión de TORID en rata fue encontrada en células dendríticas, particularmente en la subpoblación CD4+, y macrófagos peritoneales. En contraste, se encontraron niveles bajos de expresión en monocitos y células B y no se pudo detectar expresión en otras células de la línea linfocítica como linfocitos NK y diferentes subtipos de células T [59]. En ratón se mostró un patrón de expresión similar, encontrándose una expresión mayor de TORID y HCA 112 en células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) y células dendríticas convencionales [62]. Hasta donde se tiene conocimiento, el patrón de expresión de TORID y HCA 112 no fue analizado en células del sistema inmunitario en humanos.

Tomado en conjunto, parece claro que TORID y HCA 112 presentan un patrón idéntico de expresión en los tejidos y células estudiadas tanto en roedores como en humanos. Esto sumado a las evidencias de interacción física entre ellas y su localización en el genoma, sugiere fuertemente que cumplan una función similar y/o una función conjunta. Alteraciones en estos patrones de expresión parecen estar relacionadas con patologías como el cáncer [67].

DOS NUEVAS MOLÉCULAS ¿IMPLICADAS EN INFLAMACIÓN?

En cuanto a su función, TORID fue identificado por estar sobreexpresado en células infiltrantes en transplantes tolerados, lo que sugiere que puede estar involucrado en mecanismos activos de tolerancia, siendo una molécula asociada a inmunorregulación [59]. La expresión de TORID y HCA 112 en BMDC disminuye luego de un estímulo inflamatorio, y la inhibición de la expresión de estas proteínas en células dendríticas inmaduras aumenta la expresión de moléculas coestimuladoras y su capacidad de inducir proliferación, estando vinculada entonces a mantener el estado inmaduro de células dendríticas [62].

Recientemente, nuestro grupo ha caracterizado la función molecular y localización de esta proteína en la célula [68]. En estudios electrofisiológicos realizados en oocitos de *Xenopus* la sobreexpresión de TORID se asoció a una corriente de cationes monovalentes en respuesta a una disminución del pH, actuando como un canal de cationes no selectivo. TORID se localiza a nivel de la membrana de endosomas y fagosomas en DCs, donde parece tener una función en la regulación del pH fagosomal, DCs TORID^{-/-} muestran un pH fagosomal alcalino mientras que las salvajes presentan un pH fagosomal neutro [68]. Estos resultados serían compatibles con un rol de TORID como responsable del flujo de cationes desde la luz del fagosoma hacia el citosol, favoreciendo entonces la actividad de la ATPasa vacuolar y la acidificación de la luz fagosomal. Además, en un modelo de ratón deficiente en TORID generado por el grupo de Tokuhiisa T, se encontró que aproximadamente un 65 % de los animales presentan ataxia severa [61]. Fenotipos similares han sido encontrados en ratones deficientes en canales iónicos.

Resultados no publicados indicarían que la co-sobreexpresión de TORID y HCA 112 provocaría una corriente mayor que la encontrada para TORID individualmente, reforzando la idea de que puedan cumplir una función conjunta en la célula. Como se mencionó antes las corrientes de iones en el citoplasma pueden regular la activación del inflammasoma NLRP3. Sin embargo, la identidad

molecular de los canales involucrados en la regulación de la homeostásis iónica responsables de la activación de los inflammasomas es en muchos casos desconocida [36]. En este sentido nos pareció interesante estudiar el efecto que estas dos proteínas, capaces de transportar corrientes iónicas, pueden tener a nivel celular regulando este complejo. Para esto se sobreexpresaron TORID y/o HCA 112 en células de la línea THP-1 prediferenciadas a macrófagos y se evaluó la producción de IL-1 β en respuesta a una señal clásica de activación del inflammasoma NLRP3.

Sumado a esto, la expresión de TORID y HCA 112 ha sido asociada a cáncer. Se han evidenciado cantidades aumentadas de TORID y HCA 112 en linfoma, y de HCA 112 en carcinoma de pulmón humanos, cuando se compara con tejidos normales. También alteraciones en la relación entre TORID y HCA 112 se encontraron en cáncer de mama, hígado, tejido linfoide y piel [67].

Dado el profundo y conflictivo vínculo entre el sistema inmunitario, la inflamación y la progresión tumoral también nos interesó estudiar el papel de estas moléculas inmunorreguladoras en cáncer. Para lo cual se evaluó su expresión en PBMCs de pacientes con LLC clasificados como progresores comparándolo con la expresión en pacientes no progresores.

Este último punto es crítico, ya que las contradicciones con respecto al rol de los inflammasomas y sus productos, altamente dependiente del contexto, ha dificultado llegar a intervenciones terapéuticas que actúen sobre estos, en cáncer. Por lo cual, ampliar el conocimiento en esta área sería ampliamente beneficioso y es extremadamente necesario para que el mismo pueda cristalizar en estrategias terapéuticas. En particular, estudiar moléculas que parecen estar involucradas tanto en inflamación como en el cáncer puede ayudarnos a comprender mejor la relación entre estos últimos.

OBJETIVOS



Objetivo general:

El objetivo general de este trabajo es estudiar la capacidad de Torid y HCA 112 de regular la activación de inflammasomas en un modelo in vitro de sobre-expresión de estas proteínas en células THP-1, y evaluar la potencialidad de estas dos moléculas como marcadores pronóstico en leucemia linfoide crónica a células B (LLC).

Objetivos específicos:

1. Amplificar y purificar los plásmidos a ser utilizados en las transfecciones.
2. A- Poner a punto un modelo in vitro de sobre-expresión de Torid, HCA 112 o ambas proteínas en células THP-1 pre diferenciadas a macrófagos.
B- Comparar la activación de inflammasomas entre células transfectadas con TORID y/o HCA 112 y transfectadas con un plásmido control.
3. Comparar la expresión de Torid y HCA 112 entre muestras de individuos diagnosticados con LLC catalogados como progresores o indolentes para la enfermedad.

El objetivo académico de esta tesina así como de mi estadía en el laboratorio de Inflamación e Inmunoregulación fue situarme en el contexto de un laboratorio de investigación y familiarizarme con técnicas de rutina en el área de la inmunología y biología molecular, como ser: cultivo celular, ELISA, western blot, microscopía de fluorescencia, citometría de flujo, PCR y transfección de células.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Generación de bacterias electrocompetentes E. Coli XL1-Blue

A partir de un stock de células E. Coli XL1-Blue fue realizado un mini cultivo en 8 mL de medio LB con 8 µL de tetraciclina (5 mg/mL) O.N. a 37 °C. Un inóculo de 6 mL del minicultivo fue colocado en 600 mL de medio LB y se incubó a 37 °C hasta que alcanzara una DO a 600 nm entre 0,6 y 0,8 (correspondiente a células en fase exponencial de crecimiento). En este momento se centrifugó el cultivo a 3000 g por 15 minutos a 4 °C. Se resuspendió el pellet bacteriano en 600 mL de agua miliQ fría y se centrifugó a 3000 g por 15 minutos a 4 °C. Tres ciclos más de centrifugación y resuspensión fueron realizados disminuyendo a la mitad el volumen de agua miliQ en cada uno. Por último, se resuspendió el pellet en 10 mL de glicerol 10% frío, se centrifugó nuevamente, y se resuspendieron las bacterias en 1 mL de glicerol 10% a partir del cual se generaron alicuotas de 40 µL y se guardaron a -80 °C.

Para comprobar que las bacterias generadas fueran electrocompetentes se transformaron por electroporación (500 V, 8 ms) con un plásmido comercial conteniendo un gen de resistencia a la ampicilina y se plaquearon en medio selectivo LB- Ampicilina (100 µg/mL).

Amplificación y purificación de plásmidos

Transformación de bacterias. 200 µL de bacterias de la cepa XL1-Blue de E. Coli electrocompetentes fueron transformadas con 1 µL de los plásmidos a amplificar mediante electroporación (500 V, 8 ms). Luego se colocaron en 800 µL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL), y se incubaron por 1 h a 37 °C bajo agitación. Se plaquearon 100 µL de este cultivo en placas con medio LB-Agar-Ampicilina (100 µg/mL) O.N. A 37 °C. A partir de colonias crecidas en medio selectivo se realizó un cultivo O.N. de 200 mL en LB-Ampicilina (100 µg/mL) a 37 °C con agitación constante. Parte de este cultivo se utilizó para generar un stock en glicerol de bacterias transformadas que se guardaron a -80 °C.

Purificación de los plásmidos por maxiprep. Los plásmidos se purificaron por maxiprep utilizando el kit comercial (PureLink@HiPure Plasmid Filter Purification Kits, Life technologies).

Brevemente, 200 mL de un cultivo O.N. de bacterias transformadas fueron cultivadas a 37 °C bajo agitación hasta alcanzar una DO a 600 nm de 1-1.5, correspondiente a una densidad de 10^9 células/mL. El cultivo de bacterias fue centrifugado a 4000 g por 10 minutos, se removió todo el medio y se resuspendió el precipitado en 10 mL de buffer de resuspensión con Rnasa A, se agregaron 10 mL de buffer de lisis y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego de la lisis se agregaron 10 mL de un buffer de precipitación y se transfirió todo el contenido a una columna de purificación previamente equilibrada. Se dejó eluir por gravedad hasta que el flujo se detuviera, se removió el filtro interior de la columna y se lavó la misma utilizando 50 mL de buffer de lavado. Finalmente se eluyó el ADN plasmídico con 15 mL de un buffer de elución.

Para la precipitación del ADN plasmídico se agregaron 10,5 mL de isopropanol al eluido y se centrifugó a 12000 g por 30 minutos a 4 °C. Se removió el sobrenadante y se agregaron 5 mL de etanol 70 %. Se centrifugó a 12000 g por 5 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet por 10 minutos, por último se resuspendió en 200 µL de buffer TE y se guardó a -20 °C.

Se determinó la concentración de ADN plasmídico luego de la purificación por absorbancia a 260 nm y se obtuvo la relación A260/A280. Las medidas se realizaron utilizando el Nanodrop 1000.

Cultivo de células

Células monocíticas humanas de la línea THP-1 comercializadas por la American Type Culture Collection (ATCC) fueron cultivadas en medio DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 µg/ml, streptomycin 100 µg/ml, amortiguador HEPES 1%, aminoácidos no esenciales 1% (v/v), piruvato de sodio 1% (v/v) y β-mercaptoetanol 50 µM. Se mantuvieron en atmósfera húmeda a 37 °C y 5% de CO₂. Las células THP-1 fueron sembradas con medio completo e incubadas 48 hs con PMA 0.1 µM para estimular su diferenciación a macrófagos, en placa de 24 pocillos ($0,6 \times 10^6$ células/pocillo) para realizar la transfección transitoria por lipofección y en placas de 100 mm (5×10^6 células/placa) para la transfección por nucleofección.

Transfección transitoria

Lipofección. Se realizó la transfección de macrófagos diferenciados a partir de células THP-1 con los plásmidos de interés por un método de lípidos catiónicos utilizando el kit comercial LTX Plus Reagent (Invitrogen). Las células fueron diferenciadas a una densidad de 600.00 células/pocillo en una placa de 24 pocillos incubándolas con PMA 100 nM por 48 hs. Previo a la transfección se lavaron las células utilizando PBS y se colocaron 200 µL de medio DMEM sin complementar. Se prepararon dos tubos por condición en los cuales se colocaron 25 µl de medio. En uno de los tubos se agregó la cantidad necesaria de plásmido y 4 µl de PLUS Reagent, se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y se mezcló con el otro tubo en el cual se diluyó 1 µl de Lipofectamine LTX Reagent. Se mezcló suavemente y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó la mezcla de ADN-PLUS Reagent-Lipofectamine LTX Reagent a cada pocillo y se incubaron las células con la misma por 3 hs a 37 °C y 5% de CO₂. Pasado el tiempo de incubación se lavaron las células con PBS 1x y se colocaron 250 µl de medio de cultivo.

Nucleofección. 24 hs previo a la diferenciación se pasaron las células THP-1 a medio de cultivo nuevo. Para estimular su diferenciación se colocaron 5x10⁶ células en placas de cultivo no tratadas de 100 mm en un medio conteniendo PMA 100 nM, la diferenciación se dejó proceder por 48 hs a 37 °C y 5 % de CO₂. Al momento de comenzar con la nucleofección se despegaron las células incubándolas con una solución de PBS-SBF 2%-EDTA 0.7 mM durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron por 5 minutos a 300 g y temperatura ambiente, y posteriormente se resuspendieron en 1 ml de DMEM sin complementar para su conteo en cámara de Malassez. Se centrifugaron alícuotas de 2-2.5x10⁶ de células viables durante 10 minutos a 250 g y temperatura ambiente. Los pellet celulares se resuspendieron en 100 µl de solución V más suplemento (Amaya Cell Line Nucleofector Kit V) e inmediatamente se pasaron a una cuba provista en el kit conteniendo 0.5 µg de ADN plasmídico. Las células deben pasar el menor tiempo posible en la solución de nucleofección, por lo que rápidamente se procedió a la electroporación utilizando el programa V-001 en el Nucleofector II (Amaya, Lonza). Inmediatamente luego de finalizada la transfección se agregaron 500 µl de un medio de transfección a la cuba y se transfirieron 500 µL de la suspensión celular a un pocillo de una placa de 6 pocillos conteniendo 2.5 ml de medio de

transfección o 250 μL a dos pocillos de una placa de 12 pocillos conteniendo 1.75 ml de medio de transfección. Las células se incubaron por 4 hs a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5% de CO_2 . Luego de verificar que la mayoría de la células se encontraban nuevamente adheridas al material de cultivo se substituyó el medio de transfección por medio de cultivo. Se dejó proceder la sobreexpresión de la proteína y en caso de ser posible se verificó el éxito de la transfección por microscopía de epifluorescencia.

Nota: El medio de transfección consistió en DMEM complementado con 20% de SFB, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, aminoácidos no esenciales 1% (v/v) y piruvato de sodio 1% (v/v).

Las construcciones utilizadas para las transfecciones fueron: pcDNA3.1-rTorid-GFP (rTorid fusionado a GFP en el N-terminal), pSecTag2B-rTorid-V5His (rTorid con el Tag V5 y una cola de 6 histidinas), pSecTag2B-rHCA112-mCherry (rHCA112 fusionado a mCherry en el N-terminal), pSecTag2B-rHCA112-cmycFLAG y pcDNA3.1-GFP como plásmido control. Para el ensayo con mutantes se utilizaron los siguiente plásmidos: pSecTag2B-rTorid-H110G-V5His, pSecTag2B-rTorid-A103P-V5His y pSecTag2B-rHCA112-W121A-cmycFLAG. Los plásmidos codificantes para Torid y HCA112 contienen la secuencia de rata de estas proteínas. Cuando se utilizarón plásmidos codificantes para Torid y/o HCA112 conjugados a proteína fluorescente se confirmó la transfección por microscopía de epifluorescencia. Más detalles sobre las construcciones utilizadas se pueden encontrar más adelante en el trabajo.

Cuantificación de IL-1 β por ELISA

El ensayo fue realizado utilizando un Kit de ELISA para IL-1 β humana de BD.

100 μL de un anticuerpo monoclonal de captura anti-IL1 β humana a una dilución 1/250 fueron incubados O.N. a 4 $^{\circ}\text{C}$ en una placa para ELISA. El bloqueo se realizó por 1 h con 200 μL de PBS-SFB 10% a 27 $^{\circ}\text{C}$. 100 μL de las muestras y una curva standar en el rango de 0 a 250 pg/mL de IL-1 β humana recombinante se incubaron durante 2 h a 27 $^{\circ}\text{C}$. Para la detección se utilizaron 100 μL de un anticuerpo monoclonal anti-IL1 β humana biotinilado a una dilución 1/1000 que se incubó por 1 hora a 27 $^{\circ}\text{C}$, seguido de 30 minutos con 100 μL de estreptavidina conjugada a peroxidasa de

rabanito (Sav-HRP) a una dilución 1/250. Para el revelado se utilizó TMB como agente de desarrollo de color y peróxido de hidrógeno como sustrato de la enzima, se dejó proceder el desarrollo de color en oscuridad a 27 °C. Se frenó la reacción utilizando ácido fosfórico 1 M y se determinó la absorbancia a 450 nm en lector de placas. A esta medida se le restó la absorbancia a 570 nm y la absorbancia del blanco. Los lavados se realizaron utilizando PBS-Tween 0,1%.

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas de los lisados celulares fue realizada utilizando el método del ácido bicinónico (BCA). En placa de 96 pocillos se colocaron 10 µL de las muestras a diferentes diluciones y 10 µL de una curva estándar para la cual se utilizó BSA (se partió de una solución stock de 2 µg/µL y se prepararon diluciones de entre 1 y 0,1 µg/µL). Se agregaron 200 µL de BCA:CuSO₄ en una relación 50:1, se incubó en oscuridad por 30 minutos a 37 °C y se determinó la absorbancia a 570 nm utilizando lector de placas.

Electroforesis SDS-PAGE

30 µg de proteína de los lisados celulares fueron migrados por electroforesis en un gel de poliacrilamida 4% y 10%, para el gel concentrador y separador, respectivamente, a 150 V. Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) fue utilizado como marcador de peso molecular.

Western Blot HCA 112

A partir del gel se realizó una transferencia semi-seca a una membrana Hybond ECL de 0,45 µm a 20 V por 10 minutos o hasta constatar la transferencia del marcador de peso molecular. El bloqueo de la membrana fue realizado con una solución de TBS 1x-Tween 0,1%- 5% de leche en polvo O.N. a 4 °C. Se incubó la membrana con un anticuerpo policlonal de conejo anti-Tmem176a (Proteintech Group Cat. No: 20378-1-AP) a una concentración de 1,43 µg/mL O.N. a 4 °C. Un anticuerpo de mono anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa a una concentración de 0,27 µg/mL fue utilizado como anticuerpo secundario, se incubó la membrana con el mismo 1 h a temperatura ambiente. Se incubó la membrana por un minuto con el sustrato de

quimioluminiscencia Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). El revelado se realizó manualmente utilizando soluciones de revelado y fijación de Kodak (Sigma). Para los lavados se utilizó una solución de TBS 1x-Tween 0,1%, a excepción de los lavados después de la incubación con el anticuerpo secundario para los cuales se utilizó TBS 1x-Tween 0,3%.

Western Blot TORID

A partir del gel se realizó una transferencia semi-seca a una membrana Hybond ECL de 0,45 μm a 20 V por 10 minutos o hasta constatar la transferencia del marcador de peso molecular. El bloqueo de la membrana fue realizado con una solución de TBS 1x-Tween 0,1%- 5% de leche en polvo durante 3 h a temperatura ambiente bajo agitación suave. Se incubó la membrana con un anticuerpo policlonal de conejo anti-Tmem176b (Proteintech Group Cat. No: 19825-1-AP) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ O.N. a 4 $^{\circ}\text{C}$. Un anticuerpo de mono anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa a una concentración de 0,27 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue utilizado como anticuerpo secundario, se incubó la membrana con el mismo 1 h a temperatura ambiente. Se incubó la membrana por un minuto con el substrato de quimioluminiscencia Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). El revelado se realizó manualmente utilizando soluciones de revelado y fijación de Kodak (Sigma). Para los lavados se utilizó una solución de TBS 1x-Tween 0,1%.

Western Blot GAPDH

Para el WB de GAPDH se partió de una membrana en la que previamente se había realizado un WB para detectar la presencia de Torid o HCA 112. Se le realizó un “stripping” aplicando Tween 20 sobre la superficie y se bloqueó con una solución de TBS 1x-Tween 0,1%- 5% de leche en polvo O.N. A 4 $^{\circ}\text{C}$. Se incubó la membrana con un anticuerpo de conejo anti-GAPDH (Sigma Cat. No: G9545) a una concentración de 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 1 h a temperatura ambiente. Un anticuerpo de mono anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa a una concentración de 0,27 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue utilizado como anticuerpo secundario, se incubó la membrana con el mismo 1 h a temperatura ambiente. Se incubó la membrana por un minuto con el substrato de quimioluminiscencia Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). El revelado se realizó manualmente utilizando

soluciones de revelado y fijación de Kodak (Sigma). Para los lavados se utilizó una solución de TBS 1x-Tween 0,1%.

Citometría de flujo

Se partió de 500.000 células por condición de PBMC, almacenadas en nitrógeno líquido, de pacientes con LLC. Las células se descongelaron y se lavaron dos veces utilizando una solución de PBS, BSA 0.5% y EDTA 1 mM, luego se incubaron por 30 minutos en oscuridad a 4 °C con un anticuerpo anti-IgM conjugado a ficoeritrina o con el anticuerpo anti-CD14 conjugado a ficoeritrina, según correspondiera. Después del marcado de membrana, se repitieron dos pasos de lavado con PBS-BSA 0.5%-EDTA 1 mM y las células fueron fijadas con PFA 2% por 10 minutos en hielo, y luego permeabilizadas incubándolas con una solución de PBS, BSA 0.5% y saponina 0.5% por 10 minutos en hielo. Se realizaron dos lavados con PBS-BSA 0.5%-saponina 0.1% y se incubaron dos horas con el anticuerpo anti-Tmem176a (Proteintech Group Cat. No: 20378-1-AP) a una concentración de 1 µg/mL en hielo. Se repitió el lavado con PBS-BSA 0.5%-saponina 0.1% y se incubaron por 15 minutos con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a fluoresceína a una concentración de 1 µg/mL en hielo. Se repitieron dos pasos de lavado con PBS-BSA 0.5%-saponina 0.1% y las células se resuspendieron en PBS para su pasaje por el citómetro de flujo CyAn™ ADP Analyzer (Beckman Coulter, Inc.). Los datos obtenidos se analizaron utilizando el programa FlowJo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

Previo a los ensayos de transfección se debieron amplificar algunos de los plásmidos a utilizar. Para esto se generaron bacterias electrocompetentes a partir de bacterias *E coli* de la cepa XL1 Blue, suministradas por la Unidad de Proteínas Recombinantes del Institut Pasteur de Montevideo, de acuerdo al protocolo descrito en materiales y metodología. Para verificar que las bacterias fueran electrocompetentes se las transformó por electroporación con un plásmido conteniendo un gen de resistencia al antibiótico ampicilina y se las creció en placas con medio selectivo (LB agar y ampicilina 100 µg/ml). Después de un cultivo O.N. a 37 °C se observó el crecimiento de colonias, verificándose que las bacterias generadas eran efectivamente electrocompetentes.

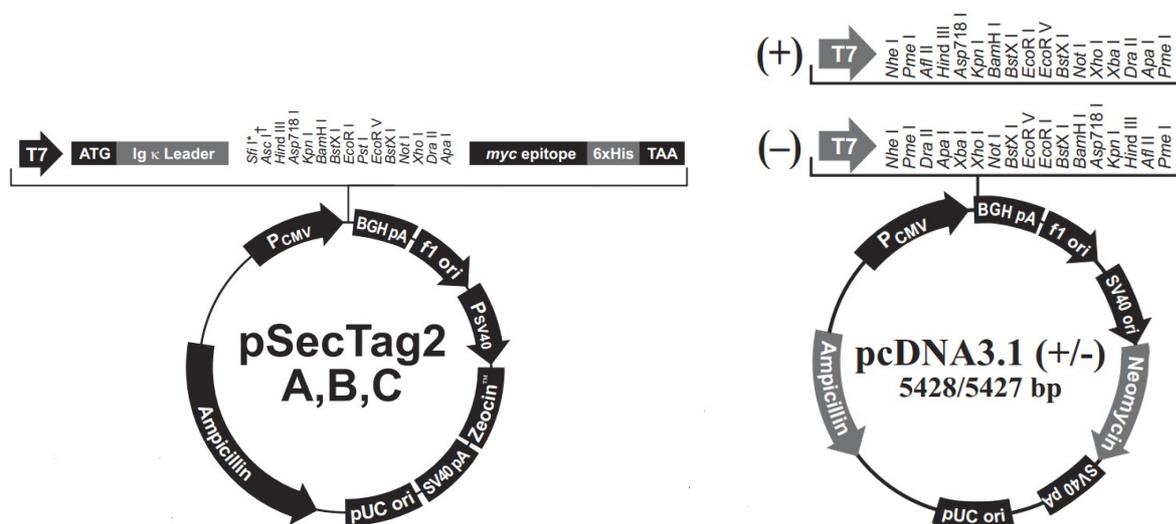


Figura 8. Diagrama de los vectores pSecTag2 A, B, C y pcDNA3.1(+/-). Estos son los vectores utilizados para clonar las secuencias correspondientes a: Torid, HCA 112, HCA 112 fusionado a mCherry, o GFP, como se describe en el texto. Se puede observar que ambos contienen un gen que confiere resistencia a la ampicilina, utilizado como antibiótico de selección en procariontes, y otro antibiótico, zeocina en el caso de pSecTag2 A, B, C y neomicina en el caso de pcDNA3.1(+/-), que permiten la selección de células eucariotas transfectadas. El plásmido pSecTag2B tiene un tamaño de aproximadamente 5.2 kb y el pcDNA3.1 de 5.4 kb. Imágenes adaptadas de las hojas de datos de los plásmidos provistas por Invitrogen.

Se transformaron estas bacterias por electroporación con las construcciones: pSecTag2B-rTorid-V5His, pSecTag2B-rHCA112-cmycFLAG, pSecTag2B-rHCA112-mCherry, y pcDNA3.1-GFP. Todos estos plásmidos contienen un gen codificante para la enzima β-lactamasa que confiere resistencia a la

ampicilina (**Figura 8**), este antibiotico se utiliza como antibiotico de selección en procariotas, solo aquellas bacterias que contengan el plásmido van a crecer en un medio conteniendo el mismo. Luego de la electroporación se incubaron las bacterias por una hora a 37 °C en medio LB sin antibiótico de forma de permitir que se multipliquen y que aquellas que incorporaron el plásmido comiencen a expresar la enzima β -lactamasa, luego de este tiempo se plaquearon las bacterias a dos concentraciones distintas en placas LB agar-ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubaron O.N. a 37 °C.

Para todas las construcciones, excepto el plásmido pSecTag2B-rHCA112-mCherry, se observó el crecimiento de colonias a las dos concentraciones sembradas. A partir de colonias crecidas en estas placas se generaron cultivos más grandes para, por un lado, generar stocks de bacterias transformadas en glicerol y guardarlos a -80 °C y, por otro, proceder a la purificación del ADN plasmídico.

En una primera instancia se purificó el ADN plasmídico por miniprep utilizando un kit comercial, sin embargo, si bien el rendimiento era suficiente para los ensayos que se pretendían realizar, cuando se utilizaron los plásmidos purificados por esta metodología para transfectar células THP-1 y evaluar la activación de inflammasomas, se determinó por ELISA una producción extremadamente alta de IL-1 β , muy superior a la obtenida en estudios previos. Esto podría deberse a algún tipo de contaminación remanente en los plásmidos, probablemente endotoxina, lo cual llevó a probar otra metodología de aislamiento que, a priori, pudiera proporcionar una mayor pureza.

Con este objetivo, se paso a la purificación por maxiprep de algunos de los plásmidos utilizando el kit comercial PureLink@HiPure Plasmid Filter Purification Kits (Life Technologies) el cual permite obtener altos rendimientos y ADN purificado con bajos niveles de endotoxina. En la **Tabla 3** se muestra la concentración de ADN determinada por absorbancia a 260 nm y la relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm del ADN obtenido luego del aislamiento por maxiprep para tres de los plásmidos. En todos los casos el producto de maxiprep se resuspendió en un volumen de 300 μl de buffer TE. A partir de este volumen y la concentración de ADN obtenida se calculó el rendimiento para cada caso. Los rendimientos obtenidos fueron de 80-200 μg de ADN que, si bien

fueron suficientes para los ensayos posteriores, fueron inferiores a los esperados de acuerdo a las especificaciones del kit (500-800 µg).

Tabla 3. Amplificación y purificación de plásmidos. En la tabla se indica, para tres de los plásmidos de interés, las bacterias utilizadas para la amplificación, así como el antibiótico de selección de las bacterias transformadas, el método de purificación del ADN plasmídico, la concentración calculada a partir de la absorbancia a 260 nm, la relación A260/A280 y el rendimiento.

Nombre	Antibiótico de selección en procariontes	Bacterias utilizadas para la propagación	Método de purificación	[ADN] (µg/µL)	Relación A260/A280	Rendimiento (µg)
pcDNA3.1(-)-GFP	Ampicilina 100 µg/ml	<i>E coli XL1Blue</i> electrocompetentes	Maxiprep	0,64	1,98	192
pSecTag2B-PS-rTorid-V5His	Ampicilina 100 µg/ml	<i>E coli XL1Blue</i> electrocompetentes	Maxiprep	0,27	1,92	81
pSecTag2B-PS-rHCA112-cmycFLAG	Ampicilina 100 µg/ml	<i>E coli XL1Blue</i> electrocompetentes	Maxiprep	0,35	1,91	105

En el caso del plásmido pSecTag2B-rHCA112-mCherry no se logró amplificar utilizando bacterias *E coli XL1Blue* electrocompetentes, por lo cual se intentó transformar bacterias *E coli* quimiocompetentes comerciales por shock térmico con 1 µg de ADN. Luego de la transformación se plaquearon las bacterias a dos concentraciones en medio selectivo (LB-Ampicilina 100 µg/µl) O.N a 37 °C, observándose el crecimiento de unas pocas colonias aisladas. A partir de cuatro de estas colonias se generaron cultivos de 3 ml en medio LB-Ampicilina que se incubaron O.N. A 37 °C, de los cuales solo en dos se constató crecimiento por turbidez. De los dos cultivos en los que se observó crecimiento se realizaron purificaciones del ADN plasmídico por miniprep. Cuando se cuantificó el ADN del producto de miniprep por absorbancia a 260 nm los valores de concentración fueron inferiores a los 40 ng/mL, en ambos casos, descartándose pasar a una purificación por maxiprep.

Debido a las dificultades para amplificar este plásmido se evaluó el estado del plásmido original, para esto se determinó la concentración de ADN por absorbancia a 260 nm y la relación A260 nm/A280 nm del mismo, y se corrieron en un gel de agarosa 1 % el plásmido original sin digerir y el

producto de restricción del mismo utilizando la enzima de restricción HindIII. HindII fue una de las enzimas utilizadas para clonar el inserto, por lo cual se puede utilizar para linearizar el plásmido. La relación A260 nm/A280 nm fue de 1.89 y la relación 260/230 de 2,17 estando dentro de los rangos aceptados. Puede que existiera una degradación parcial ya que la concentración reportada por el proveedor era de 1 µg/µl y la que se determinó en esta ocasión fue de 0.51 µg/µl. Sin embargo, en la electroforesis en gel de agarosa no apareció evidencia de degradación. El plásmido linearizado migró al peso esperado de aproximadamente 6 kb correspondiente al vector más el inserto (5.2 kb y 735 pb respectivamente) y en el carril del plásmido sin linearizar se observaron dos bandas probablemente correspondientes a dos estructuras terciarias predominantes adoptadas por el plásmido, dadas por distintos grados de superenrollamiento (**Figura 9**).

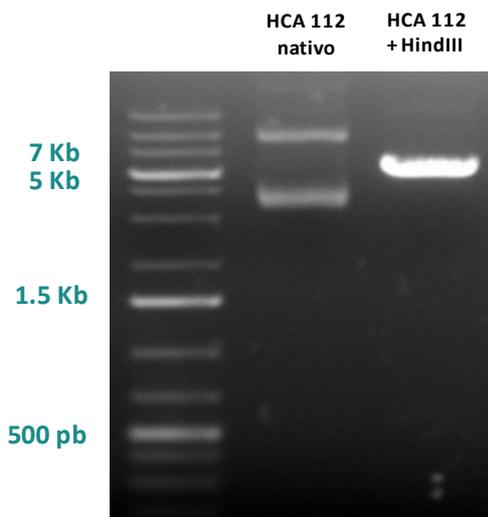


Figura 9. Electroforesis del plásmido pSecTag2B-HCA112-mCherry.

Se muestra la electroforesis en gel de agarosa 1% del plásmido pSecTag2B-HCA112-mCherry nativo y digerido con la enzima de restricción HindIII para su linearización. El gel fue revelado bajo iluminación UV utilizando bromuro de etidio como agente intercalante.

En resumen, se generaron stocks de bacterias en glicerol transformadas con los plásmidos: pSecTag2B-rTorid-V5His, pSecTag2B-rHCA112-cmycFLAG, y pcDNA3.1-GFP, las cuales se guardaron a -80 °C. Los plásmidos fueron purificados en una primera instancia utilizando miniprep, pero provocaron una producción exacerbada de IL-1β cuando utilizados en cultivos celulares, lo cual probablemente sea atribuible a la presencia de endotoxinas ya que se utilizaron bacterias *E coli* para su amplificación, esto llevó a que se utilizara otra estrategia de purificación que proporcionara una mayor pureza. Los plásmidos obtenidos por maxiprep no mostraron los efectos indeseados

observados para los productos de miniprep, y si bien no se alcanzaron los rendimientos indicados por el proveedor la cantidad de ADN obtenida fue suficiente para los estudios posteriores.

Estas observaciones muestran la relevancia de utilizar productos libres de endotoxinas cuando se trabaja con células sensibles a este tipo de estímulo, como macrófagos. Otra alternativa a la purificación por maxiprep podría haber sido agregar un paso posterior de purificación utilizando una columna de detoxificación, como las disponibles comercialmente que presentan una matriz de agarosa-polimixina B. Las polimixinas son una familia de antibioticos que contienen un ciclopetido catiónico con una cadena de ácido graso. La polimixina B neutraliza la actividad biológica de las endotoxinas al unirse al lipido A del LPS [69]. Al pasar el ADN por la columna el LPS presente queda unido a la matriz obteniéndose plásmidos con bajos niveles del mismo.

Por otra parte se tuvieron dificultades con la amplificación del plásmido pSecTag2B-rHCA112-mCherry lo cual no parece ser atribuible a que el plásmido esté degradado ya que no se encontraron evidencias de esto por electroforesis. En este sentido, se debería intentar la amplificación utilizando las cepas de *E coli* recomendadas especialmente para este vector y en caso de no tener éxito puede que el plásmido tenga una cantidad elevada de sales u otro elemento, que interfieran con el ensayo y sea necesario purificarlo previamente.

SOBRE-EXPRESIÓN DE TORID Y/O HCA 112 EN CÉLULAS THP-1 PRE-DIFERENCIADAS A MACRÓFAGOS Y ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DE INFLAMASOMAS

Con el objetivo de evaluar el efecto de TORID y HCA 112 en la activación de inflammasomas se intentó poner a punto un sistema de sobre-expresión transitoria de dichas proteínas en células de la línea monocítica humana THP-1 pre-diferenciadas a macrófagos. Para esto se probó una primera aproximación con un sistema de transfección no viral utilizando lípidos catiónicos (Lipofectamine LTX + Plus Reagent, Invitrogen) y luego otra estrategia por nucleofección utilizando la tecnología de Amaxa Nucleofector.

Las células THP-1 pueden ser diferenciadas a partir de su estado de monocitos a células similares a macrófagos utilizando varios estímulos: forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), 1α , 25-dihidroxitamina D3 ($vD3$) y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Si bien este último tiene relevancia biológica *in vivo* es poco utilizado *in vitro*. En este sentido, el tratamiento con PMA lleva a un fenotipo más maduro, con cambios en la morfología celular observables al microscopio y adhesión a la superficie de cultivo, menor proliferación, aumento de la capacidad fagocítica y un incremento en la expresión de marcadores de superficie celular como CD11b y CD14. Ha sido reportado que 48 horas de tratamiento con una concentración mínima de PMA de 162 nM es suficiente para una diferenciación total a macrófagos [37].

En este trabajo, para lograr la diferenciación a macrófagos, se incubaron las células THP-1 en presencia de PMA a una concentración de 100 nM por 48 hs. La eficacia de este procedimiento se evaluó en todos los ensayos por observación microscópica, considerándose exitosa si se constataba adherencia a la superficie de cultivo y cambios morfológicos a células tipo macrófagos.

El abordaje elegido en un primer momento para la transfección transitoria de los plásmidos consistió en la utilización de un kit de Lipofectamine LTX + Plus Reagent (Invitrogen). Se ensayaron diversas condiciones de transfección utilizando este método. Se variaron las construcciones de plásmidos

utilizadas, la cantidad de ADN plasmídico y el tiempo que se dejó proceder la sobre-expresión de la proteína antes de realizar los ensayos funcionales, intentando encontrar el mejor equilibrio entre eficiencia de transfección y mortalidad celular. En todos los casos se colocaron 600.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se realizaron las variantes mostradas en la **Tabla 4**. El plásmido pcDNA3.1-GFP fue utilizado siempre como plásmido control.

Tabla 4. Condiciones testadas de transfección utilizando lípidos catiónicos. En la tabla se muestran las cantidades de ADN testeadas para cada una de las construcciones (celdas en amarillo) y los tiempos a los cuales se evaluó la transfección y/o se realizaron los ensayos funcionales, según corresponda. Además se realizaron co-transfecciones de Torid y HCA 112 para las cuales se ensayaron diversas combinaciones de construcciones y cantidades de plásmidos. Todas las transfecciones se realizaron siguiendo el protocolo descrito en materiales y metodología.

Construcciones	µg ADN plasmídico					
	0.01	0.04	0.08	0.4	0.8	2
pcDNA3.1-rTorid-GFP				16hs		
pSecTag2B-rTorid-V5His	16 hs	16 hs	16, 24hs	16, 24 hs	16hs	16hs
pSecTag2B-rHCA112-mCherry	16 hs	16 hs		16 hs		
pSecTag2B-rHCA112-cmycFLAG			16, 24hs	16, 24hs	16hs	16hs
PsecTag2B-rTorid-V5His + pSecTag2B-rHCA112-mCherry	16 hs	16 hs		16 hs		
PsecTag2B-rTorid-V5His + pSecTag2B-rHCA112-cmycFLAG			16,48 hs	16, 48 hs	16 hs	16 hs
pcDNA3.1-rTorid-GFP + pSecTag2B- rHCA112-mCherry				16 hs		

Las construcciones que presentaban la proteína de interés fusionada a una proteína fluorescente (pcDNA3.1-rTorid-GFP, pSecTag2B-rHCA112-mCherry, pcDNA3.1-GFP) permitieron evaluar cualitativamente el éxito de la transfección por microscopía de fluorescencia. En las condiciones para las cuales se evaluó la transfección utilizando microscopía de epifluorescencia la eficiencia de las mismas se estimó como inferior al 5%. A pesar de esto se realizaron ensayos para evaluar la activación de inflammasomas, ya que existe la posibilidad de que las células expresaran las proteínas pero la sobre-expresión de las mismas no fuera suficientemente alta para visualizarlo por microscopía. En ningún caso la transfección pareció tener un efecto notorio sobre la viabilidad celular, ni existieron diferencias evidentes en la cantidad de células post transfección comparando las condiciones con

plásmido control y con los plásmidos de interés.

Una de las formas de evaluar la activación de inflammasomas es midiendo la producción y liberación al medio de IL-1 β . La presencia de esta citoquina se puede detectar fácilmente en el sobrenadante de células en cultivo utilizando la técnica de ELISA. En este sentido, nos propusimos evaluar la producción de IL-1 β frente a un estímulo clásico del inflammasoma, utilizando LPS como primera señal y ATP como segunda señal, comparando la respuesta entre células THP-1 transfectadas por lipofección con plásmidos codificantes para TORID y/o HCA 112 y células transfectadas con el plásmido control.

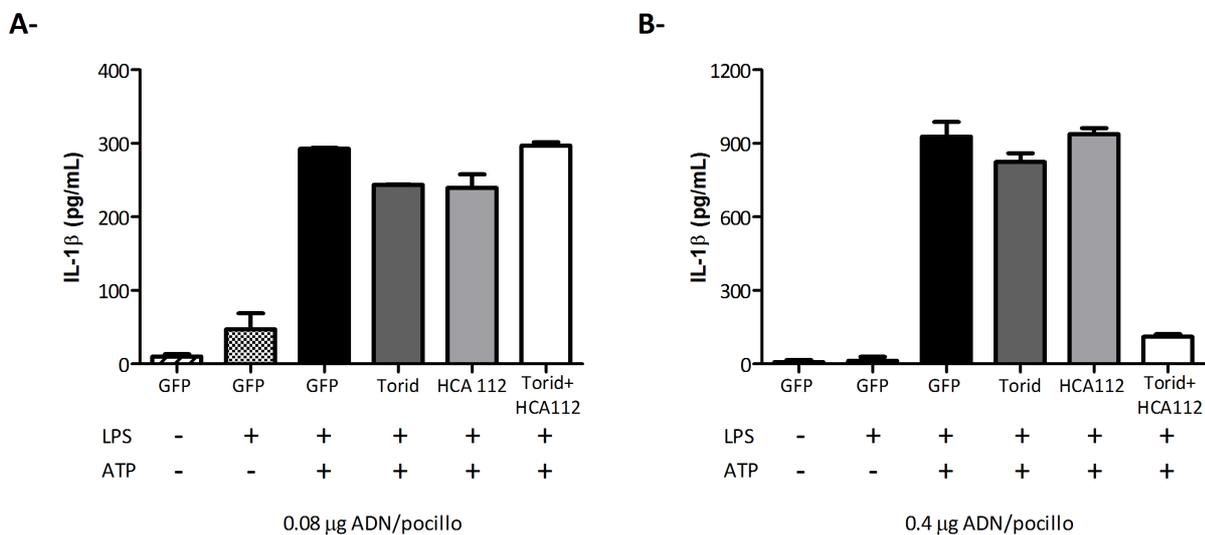


Figura 10. Producción de IL-1 β por células transfectadas con TORID y/o HCA 112. Células THP-1 diferenciadas por 48 h en presencia de PMA fueron transfectadas por lipofección con los plásmidos pSecTag-Torid-V5His, pcDNA3.1-HCA112-mCherry o ambos, el plásmido pcDNA3.1-GFP fue utilizado como control, en condiciones que implacaron 0,08 ug de ADN/pocillo (A-) y 0,4 ug de ADN/pocillo (B-). A las 16 h de la transfección se realizó una estimulación del inflammasoma tratando las células con LPS 0,25 ug/mL por 3 horas y posteriormente con ATP 5 mM durante 45 minutos. El sobrenadante de cultivo fue recuperado y la presencia de IL-1 β cuantificada por ELISA.

En términos generales, se encontró una variabilidad muy grande en los resultados obtenidos entre experimentos, con respecto a la producción de IL-1 β , utilizando esta técnica de transfección. Siendo la condición en la que se utilizaron las construcciones pSecTag2B-rHCA112-mCherry y pSecTag2B-rTorid-V5His, a 0.4 μ g de ADN por pocillo, y se realizó el estímulo 16 horas post transfección en la cual se encontró una mayor reproducibilidad. En la **Figura 10** se muestra la concentración de IL-1 β en

sobrenadante de cultivo para dos condiciones de transfección diferentes (0.08 y 0.4 µg de ADN/pocillo) y en la **Figura 11** se muestra el porcentaje de producción de IL-1β con respecto al control cuando las células fueron transfectadas con TORID, HCA 112 o ambas (0.4 µg de ADN/pocillo) y se realizó el estímulo 16 hs post transfección.

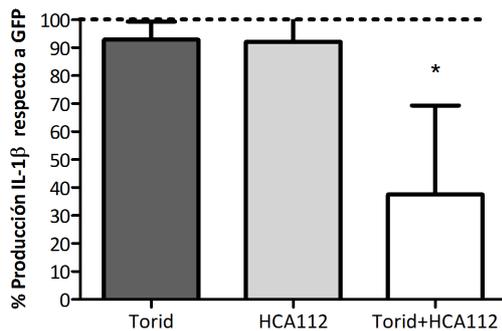


Figura 11. Porcentaje de producción de IL-1β por células THP-1 transfectadas con TORID y/o HCA 112. Se determinó el porcentaje de producción de IL-1β por células THP-1 diferenciadas con PMA y transfectadas con 0.4 µg/pocillo de los plásmidos pSecTag-Torid-V5His, pcDNA3.1-HCA112-mCherry, o ambos, con respecto a células transfectadas con el plásmido pcDNA3.1-GFP utilizado como control. 16 hs después de la transfección las células fueron tratadas con LPS 0.25 µg/ml por 3 hs y ATP 5 mM por 45 minutos para estimular la activación del inflammasoma. El 100% de producción corresponde a células transfectadas con el plásmido codificante para GFP y tratadas con LPS y ATP. Los datos corresponden a tres experimentos realizados de forma independiente. *La media de esta columna varía significativamente de 100 de acuerdo al análisis estadístico One-sample t-test.

Se encontró una disminución significativa en la producción de dicha citoquina, con respecto al control, cuando las células son transfectadas con ambos plásmidos, y no así cuando se las transfecta con cada plásmido de forma individual. Este resultado estaría en concordancia con la hipótesis inicial de que TORID y HCA 112 tendrían un papel en regular el inflammasoma, inhibiéndolo, si bien a priori esperábamos que cada plásmido individualmente tuviera también un efecto. Resultados de nuestro grupo de trabajo han evidenciado que células dendríticas KO para TORID producen cantidades mayores de IL-1β que sus controles “*litter mate*” (datos no publicados), reforzando el papel de TORID como regulador del inflammasoma. Además, la corriente generada en ovocitos de *Xenopus* transfectados con TORID mostrada en Segovia et al. es mayor cuando las células son transfectadas con TORID y HCA 112 conjuntamente, sugiriendo un efecto sinérgico de ambas proteínas en el transporte de corriente (datos no publicados). Sin embargo, la variabilidad entre experimentos utilizando este sistema de transfección y el hecho de no encontrar evidencia de que las células realmente sobreexpresaran las proteínas, lo convirtió en un sistema poco robusto para continuar ahondando en estudios mecanísticos.

La transfección de vectores de expresión o pequeños ARNs de interferencia es ampliamente utilizada para estudiar la función de productos génicos y ha sido aplicada exitosamente a muchos tipos celulares. Sin embargo, las células THP-1 son notoriamente difíciles de transfectar. A pesar de que existen un gran número de estrategias de transfección, tanto de plásmidos como siRNA, sólo unas pocas permiten una transfección segura y efectiva en macrófagos, y muchas de ellas reducen la viabilidad y alteran el comportamiento celular. Ha sido descrita la transfección de células THP-1 utilizando vectores virales, pero este acercamiento requiere laboratorios equipados especialmente, con altos niveles de seguridad y puede causar efectos secundarios desconocidos en la célula [70]. La transfección usando métodos no virales de monocitos THP-1 también ha sido reportada pero sin mantener la viabilidad y funcionalidad luego de su posterior diferenciación a macrófagos. Probablemente debido a esto la mayoría de los estudios utilizan células transfectadas THP-1 sin diferenciar a macrófagos.

En nuestro caso particular nos interesaba estudiar el efecto de la expresión de las proteínas en células tipo macrófagos, por dos razones principales: por un lado es el sistema clásico de estudio del inflammasoma y por otro las células THP-1 una vez diferenciadas pierden su expresión natural de TORID. Por lo cual, buscamos otro método de transfección que permitiera la incorporación de plásmidos en células THP-1 pre-diferenciadas a macrófagos, con una buena eficiencia y sin afectar el comportamiento celular posterior, de forma de poder confirmar los resultados obtenidos previamente.

El grupo de Lorkowski ha reportado una serie de protocolos de transfección de plásmidos, tanto en monocitos THP-1 como en células THP-1 pre-diferenciadas a macrófagos, con altas eficiencias y baja mortalidad, usando una metodología basada en nucleofección [71,72,73]. Esta tecnología combina reactivos y pulsos eléctricos específicos para cada tipo celular, permitiendo una transfección altamente eficiente y reproducible, con tasas de viabilidad altamente superiores a los sistemas de electroporación tradicionales. Es por esto, que como siguiente estrategia de transfección, adaptamos la versión 2014 del protocolo de nucleofección de células THP-1 pre-diferenciadas a macrófagos

reportado por el grupo de Lorkowski.

Células THP-1 pre-diferenciadas a macrófagos se transfectaron por nucleofección utilizando los plásmidos: pcDNA3.1-GFP, pSecTag2B-rHCA112-mCherry, pSecTag2B-rTorid-V5His o estos dos últimos en conjunto. El estado general de las células y la expresión de las proteínas fluorescentes m-Cherry y GFP se siguieron utilizando microscopía tradicional y de epifluorescencia, respectivamente. A las 6 hs post-transfección ya se podían visualizar células que expresaban mCherry como se muestra en la **Figura 12**.

Es importante destacar que para la nucleofección se eligió un programa de transfección que prioriza una mejor eficiencia, a costo de una menor viabilidad celular. Un punto importante que nos planteamos fue lograr normalizar la producción de IL-1 β al número de células. De manera de que si se observaba un efecto se tuviera certeza que era debido a una inhibición real y no a variaciones en el número celular entre condiciones. Sin embargo, una vez adheridas a plástico de cultivo tratado, estas células son particularmente difíciles de despegar, y la utilización de métodos agresivos como la tripsinización generan muerte celular, dificultando que se pueda evaluar el número celular, de forma precisa, por conteo. Debido a esta dificultad, se optó por descartar grandes diferencias en el número final, entre las células transfectadas con el plásmido control y los plásmidos de interés, por observación microscópica y estimación del área del pocillo ocupada.

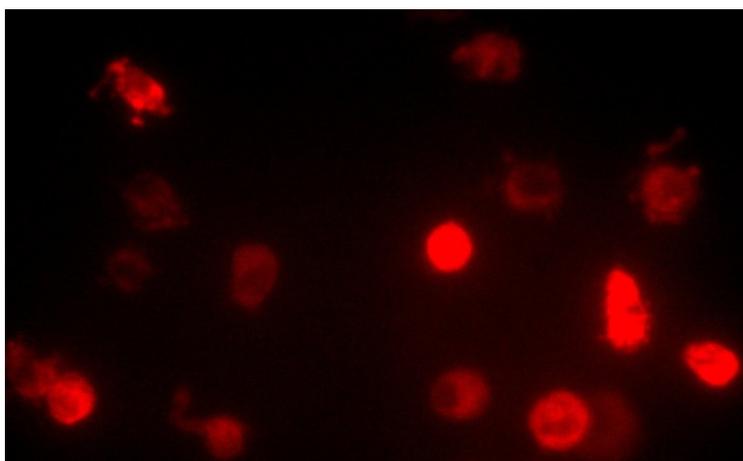


Figura 12. Imagen de epifluorescencia de células THP-1 transfectadas por nucleofección con HCA 112-mCherry. Imagen de microscopía de epifluorescencia de células THP-1 pre diferenciadas a macrófagos por un tratamiento de 48 hs con PMA y transfectadas por nucleofección con el plásmido pSecTag2b-rHCA112-mCherry. La imagen fue tomada 6 hs luego de la transfección. Aumento 40x.

La transfección por nucleofección mostró una eficiencia ampliamente superior que utilizando lípidos catiónicos, pudiendo visualizarse la expresión de la proteína ya a las 6 hs de realizada la misma. Además, parece ser un método robusto, sin registrarse grandes variaciones entre experimentos. Sin embargo, se encontraron dificultades posteriores relacionadas a la estimulación del inflammasoma en las células transfectadas.

Se determinó la producción de IL-1 β luego de realizar una estimulación clásica del inflammasoma con LPS como primera señal y ATP como segunda señal, a las 6 hs o 18 hs post-transfección. En este último caso las células parecen no responder al estímulo de LPS y ATP ya que los niveles de IL-1 β encontrados fueron muy inferiores a los encontrados normalmente cuando se realiza el mismo estímulo, ya sea sobre células THP-1 sin transfectar o transfectadas utilizando lipofectamina. Incluso cuando se realizó el estímulo a las 6 hs post transfección las células produjeron niveles altos de IL-1 β , lo que parece indicar que, por alguna razón, luego de un tiempo post transfección pierden la capacidad de responder al estímulo. Esto podría deberse a que estas células son muy susceptibles a pequeñas variaciones en las condiciones ambientales. Por ejemplo, ha sido demostrado que la técnica de cultivo puede alterar la respuesta de estas células a PMA, lo que se manifiesta en diferencias en el fenotipo y en el perfil de citoquinas secretadas [74]. Entonces, pequeños cambios en el batch de células utilizadas, número de pasajes, o condiciones de cultivo podrían llegar a explicar un efecto tan dramático en la producción de IL-1 β .

Con respecto a la estimulación a las 6 hs, si bien se encontró una producción normal de IL-1 β , y parece existir una tendencia a una menor producción en células que sobreexpresan TOR1D y/o HCA 112, se constató en varias oportunidades que este estímulo temprano con LPS provoca muerte celular, no logrando repetir el experimento en estas condiciones nuevamente.

En resumen, se intentó sobreexpresar las proteínas TOR1D y/o HCA 112 en células THP-1 pre-diferenciadas a macrófagos transfectándolas con plásmidos codificantes para las mismas utilizando lípidos catiónicos. Se probaron diferentes condiciones (cantidad de ADN, construcciones), y se evaluó la producción de IL-1 β luego de un estímulo clásico (LPS+ATP) del inflammasoma NLRP3. No se

evidenció la sobre-expresión de las proteínas por microscopía de epifluorescencia. Sin embargo, se encontró por ELISA una presencia menor de IL-1 β en el sobrenadante de células co-transfectadas con los plásmidos codificantes para TORID y HCA 112, comparado con las transfectadas con el plásmido control y los plásmidos de TORID y HCA 112 individualmente, para una de las condiciones de transfección testadas. Este resultado iría en concordancia con otras evidencias encontradas en nuestro grupo de trabajo que muestran a TORID como regulador negativo de la activación del inflammasoma, y sugieren un efecto sinérgico entre TORID y HCA 112.

Para confirmar estos resultados, principalmente debido a que no existía evidencia de que hubiera una sobre-expresión real de las proteínas utilizando lipofectamina para la transfección, se probó otra metodología. La transfección por nucleofección mostró ser ampliamente superior, observándose por microscopía la presencia de células con proteína fluorescente ya a las 6 hs post transfección. A pesar del éxito en la transfección y expresión de las proteínas se encontraron dificultades en cuanto a la respuesta posterior de las células al estímulo del inflammasoma NLRP3.

Los próximos esfuerzos se centrarán en generar una línea estable de monocitos THP-1 que sobre-expresen las proteínas, creemos que con esta herramienta se podrán alcanzar resultados más reproducibles y abordar aspectos mecanísticos de la inhibición. Así como evaluar otros parámetros indicadores de activación del inflammasoma NLRP3, además de la liberación de IL-1 β al medio de cultivo, como ser determinar que se trata de la forma activa de IL-1 β por western blot, y evaluar la activación de caspasa-1 ya sea por western blot o utilizando la sonda fluorescente FLICA.

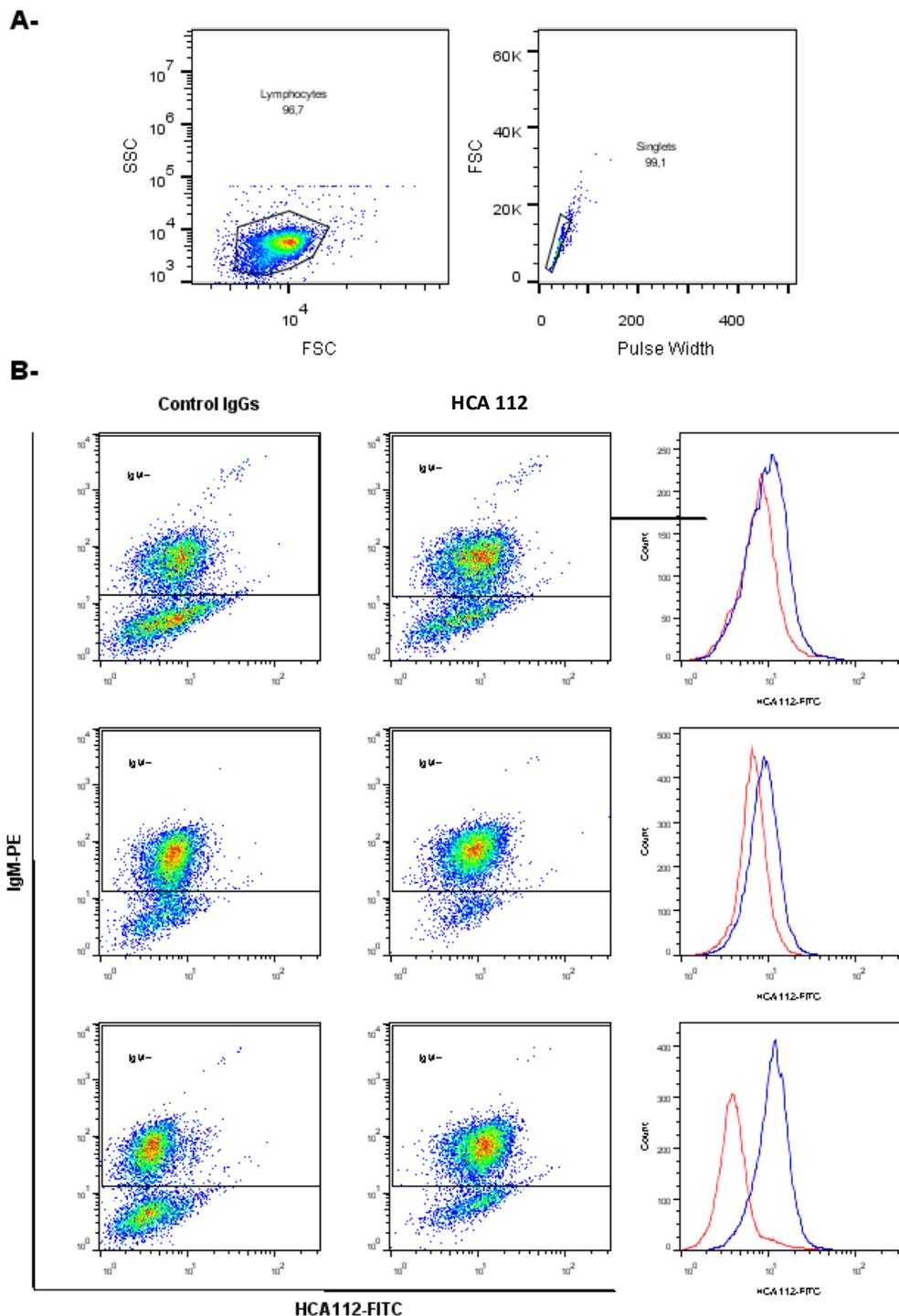


Figura 15. Citometría de flujo de PBMCs de pacientes progresores para LLC. En **A** se muestra la estrategia de ventanas utilizada. En primer lugar se seleccionó en función de tamaño y forma la población de linfocitos y luego se excluyeron dobles y tripletes. En **B** se puede observar la expresión de HCA 112 e IgM comparado con el control utilizando IgGs irrelevantes, para tres pacientes progresores. La población IgM positiva se definió en función del control no marcado. En los histogramas se muestra en rojo el control con IgGs y en azul HCA 112.

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE TORID Y HCA 112 EN LLC

Para estudiar el posible rol de TORID y HCA 112 en la leucemia linfocítica crónica a células B (LLC), se analizó por western blot (WB) la expresión de estas proteínas en lisados celulares, generados a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La sangre fue obtenida de 14 pacientes con un diagnóstico típico de LLC (score Matutes de 4 o 5 [75]). De acuerdo a criterios clínicos, los pacientes se dividieron en dos grupos: un grupo de 7 individuos indolentes para la enfermedad, y un grupo de 7 individuos progresores, caracterizados por una mayor linfocitosis, una enfermedad más agresiva, y necesidad de tratamiento.

Tabla 5. Datos generales y clínicos de los pacientes incluidos en el trabajo. En la tabla se muestran datos generales y clínicos de los pacientes cuyas muestras fueron utilizadas en este trabajo, como ser: estado de la región variable de inmunoglobulina (IgVH), estadio de Binet, y necesidad de tratamiento. En función de estos parámetros y datos relacionados al desenlace de la enfermedad los pacientes se clasificaron en dos grupos: Indolentes y progresores. M: masculino. F: femenino. N/D: no disponible.

	Sexo	Edad	Estado IgVH	Estadio de Binet	Necesidad de tratamiento	Clasificación
I259	M	65	Mutado	N/D	NO	Indolente
I266	F	63	Mutado	A	NO	Indolente
I275	M	67	Mutado	N/D	N/D	Indolente
I285	M	79	Mutado	A	NO	Indolente
I292	F	70	Mutado	A	NO	Indolente
I298	M	56	Mutado	A	NO	Indolente
I325	F	72	Mutado	A	NO	Indolente
P220	M	79	Mutado	C	SI	Progresor
P248	F	52	Mutado	B	SI	Progresor
P249	M	60	Mutado	C	SI	Progresor
P250	M	57	No mutado	N/D	SI	Progresor
P278	M	53	No mutado	A	SI	Progresor
P345	M	64	No mutado	B	SI	Progresor
P351	M	61	No mutado	A	SI	Progresor

En la **Tabla 5** se muestran algunos datos generales y relacionados a la enfermedad de los pacientes cuyas muestras fueron utilizadas en este trabajo. En este sentido, es importante destacar que todos

los individuos categorizados como progresores necesitaron tratamiento. En este grupo se incluyeron tanto individuos con IgV_H de estado mutado como no mutado. Se comparó la media etaria, utilizando un t-test no pareado, entre los grupos indolente (67.43 ± 2.750 años), y progresor (60.86 ± 3.433 años) confirmado que los grupos son comparables en este aspecto ($p=0.1610$).

La expresión de ambas proteínas fue cuantificada por densitometría a partir de bandas de western blots utilizando el programa Image J y normalizada a los valores obtenidos para la enzima gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), proteína de expresión constitutiva. Se compararon los ratios TORID/GAPDH y HCA112/GAPDH entre el grupo progresor e indolente, de forma de establecer si diferencias en la expresión de alguna de estas moléculas podrían estar relacionadas con un mejor o peor pronóstico.

En este trabajo no se encontraron diferencias significativas en la expresión de TORID entre los grupos de pacientes catalogados como indolentes o progresores para la enfermedad, como se muestra en la **Figura 13**, si bien parece existir una tendencia a una mayor expresión de TORID en el grupo progresor.

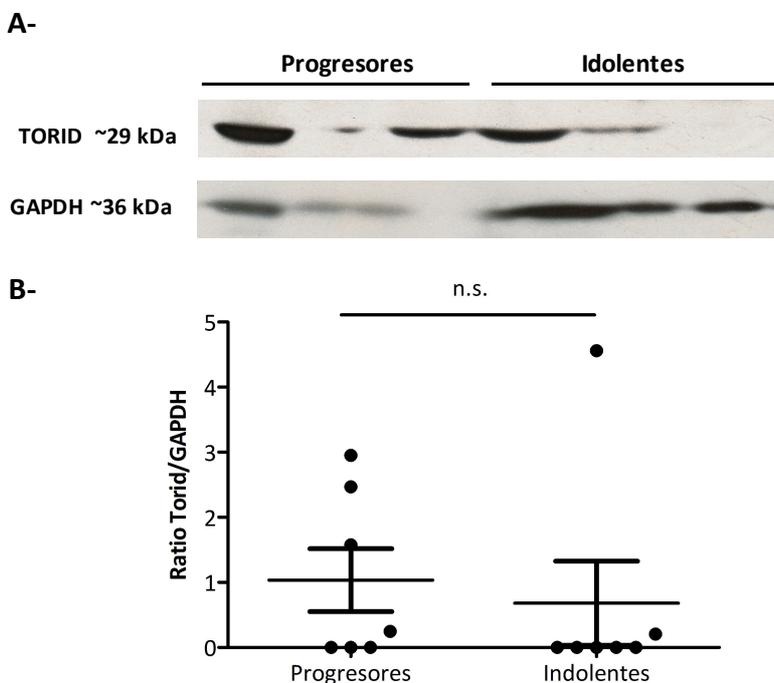


Figura 13. Expresión de TORID en LLC.

A- Se realizó un Western Blot para detectar la presencia de TORID en lisados celulares de PBMC aisladas de individuos con LLC. De acuerdo con los datos clínicos los individuos fueron clasificados como no progresores o progresores para la enfermedad. La figura es representativa de lo encontrado al analizar 14 muestras (7 de pacientes clasificados como indolentes y 7 de progresores) GAPDH fue utilizada como control.

B- Se representa la expresión de TORID relativa a GAPDH para cada una de las muestras analizadas en ambos grupos. La cuantificación de las bandas de WB fue realizada utilizando el programa Image J. n.s.: No significativo, test de Mann Whitney U.

En relación con HCA 112, la cuantificación de los resultados de WB muestra claramente una diferencia significativa en la expresión de esta proteína entre PBMC de pacientes indolentes y progresores, estando en mayor cantidad en estos últimos (**Figura 14**). En un trabajo del año 2012 Cuajungco MP et al. muestran que niveles elevados de TORID y/o HCA 112 estarían asociados a algunos tipos de cáncer. Es interesante que además encuentran que el ratio entre la expresión proteica de HCA 112 sobre TORID, en muestras de biopsia, difiere significativamente entre pacientes sanos y pacientes con cáncer de mama, hígado, tejido linfoide y piel [67]. En condiciones normales TORID y HCA 112 tienen niveles de expresión similares. El ratio HCA112 sobre TORID sería entonces un parámetro interesante a estudiar en este modelo. El tamaño de los grupos y el hecho de que en muchos casos no se detectó presencia de alguna de las dos proteínas hace que este análisis no sea realmente informativo, por lo que no fue llevado a cabo.

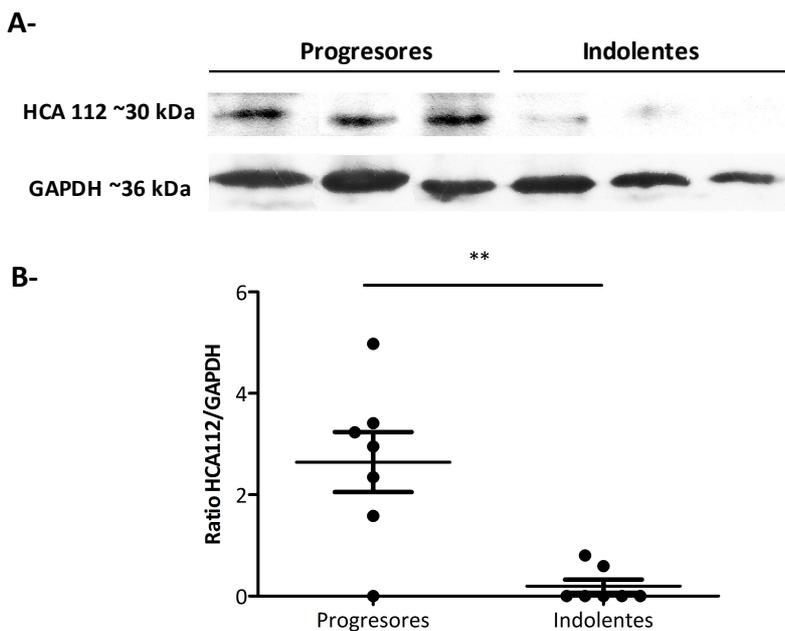


Figura 14. Expresión de HCA 112 en LLC A-

Se realizó un Western Blot para detectar la presencia de HCA 112 en lisados celulares de PBMC aisladas de individuos con LLC. De acuerdo con los datos clínicos los individuos fueron clasificados como indolentes o progresores para la enfermedad. La figura es representativa de lo encontrado al analizar 14 muestras (7 de pacientes clasificados como indolentes y 7 de progresores) GAPDH fue utilizada como control.

B- Se representa la expresión de HCA 112 relativa a GAPDH para cada una de las muestras analizadas en ambos grupos. La cuantificación de las bandas de WB fue realizada utilizando el programa Image J. ** $p < 0,0095$, test de Mann Whitney U.

Esta presencia aumentada de HCA 112 en el grupo progresor, podría colocar a esta proteína como candidata a marcador pronóstico. Es por esto que el siguiente objetivo fue comprender la biología que está por detrás de esta expresión diferencial.

Típicamente, la expresión de una proteína puede cambiar por: una modificación en la frecuencia de poblaciones celulares, alteraciones en la transcripción y/o regulación post transcripcional en subtipos celulares particulares, o ambas. En este sentido, como siguiente paso, nos planteamos establecer que células son las que expresan HCA 112 en los pacientes progresores. En particular, nos interesó saber si la expresión elevada es debida a que el clon tumoral expresa esta proteína, o a un aumento de la expresión de HCA 112 en otras poblaciones. Para esto se realizaron co-marcados de IgM con HCA 112 y de CD14 con HCA 112. Se utilizó IgM para detectar el clon tumoral y CD14 como marcador de monocitos. Este estudio se realizó utilizando citometría de flujo. Como se muestra en la **Figura 15 (A)**, en el análisis se realizó una primera ventana de acuerdo a la morfología celular, y luego otra para seleccionar los singuletes.

La morfología de las células correspondió con la esperada para PBMC aisladas de sangre periférica de pacientes con LLC. La utilización de IgM como marcador de clon tumoral es una buena aproximación, ya que el clon presenta IgM como inmunoglobulina de superficie y es ampliamente mayoritario en la sangre periférica de estos pacientes. Sin embargo, estrictamente, se debería identificar el clon tumoral como una población de linfocitos B (CD19 positiva) que además expresa CD5 [51]. CD5 es un antígeno pan T que se expresa de forma aberrante en células B tumorales de LLC.

Con respecto a HCA 112, se encontró una diferencia significativa en la intensidad media de fluorescencia (MFI) para HCA 112 con respecto al control de IgGs en la población IgM positiva y no así en la IgM negativa, aunque se observa una tendencia (**Figura 16**). La población IgM negativa está conformada principalmente por monocitos y linfocitos T. Como era esperado, ya que está reportado que HCA 112 y TORID se expresan preferencialmente en células de la línea mieloide, la población CD14+ mostró expresión de HCA 112, sirviendonos de control positivo de marcado [62]. La fracción IgM positiva, correspondiente al clon tumoral estaría entonces, sorprendentemente, expresando HCA 112 en los pacientes progresores (**Figuras 15 y 16**). Basándonos en esto, puede que la expresión aumentada de la proteína, encontrada por WB en estos pacientes, sea debido a: 1- un aumento en la

expresión de la proteína en los linfocitos B leucémicos de estos pacientes comparados con los indolentes, 2- que la expresión en cada linfocito leucémico sea la misma pero que los pacientes progresores tengan un número mayor de estas células, o 3- ambas, por un lado la expresión en linfocito B sea mayor en los progresores y esto se potencia porque tienen un número mayor de estos.

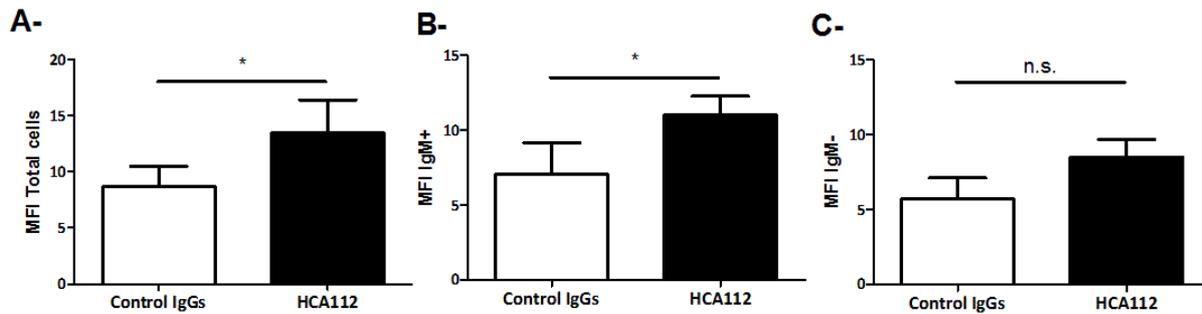


Figura 16. Expresión de HCA 112 en las poblaciones celulares de pacientes progresores para LLC. Se analizó por citometría de flujo la expresión de HCA 112 en PBMCs de pacientes con LLC clasificados como progresores para la enfermedad. En **A**- se puede observar un aumento significativo del MFI de HCA112 en las PBMCs de pacientes progresores con respecto al control con IgGs irrelevantes. Con el objetivo de conocer en que población se estaría expresando HCA 112 se analizó el MFI para HCA 112 en la población IgM+ (**B**-) e IgM- (**C**-) encontrándose un aumento significativo respecto al control en la población IgM+. Se representa lo encontrado para tres pacientes diferentes. * $p < 0.01$, n.s. No significativo, test de Mann Whitney U.

Para controlar el efecto debido a una proporción distinta de células leucémicas en sangre periférica entre los grupos, y la variabilidad entre pacientes, incluso dentro del mismo grupo, se podría determinar esta proporción por citometría de flujo, para cada una de las muestras, y normalizar la expresión de HCA 112 a ella. Otra opción, sería realizar una separación de las células B de muestras de ambos grupos y evaluar la expresión de HCA 112 en ellas por WB. Esta última alternativa además de proporcionar la ventaja de que permite comparar que sucede específicamente en el linfocito B leucémico, comparando pacientes progresores contra indolentes, y, eventualmente, donantes sanos, es mejor pensando en análisis funcionales. En este sentido, se intentó poner a punto una separación de linfocitos B a partir de una muestra de PBMCs utilizando “clasificación de células activadas por fluorescencia” (FACS, fluorescence-activated cell sorting). Se seleccionaron las células CD19 positivas, correspondientes a linfocitos B, obteniéndose con éxito una fracción extremadamente pura (99.7% de eventos CD19+ luego de la separación), lo cual es particularmente importante pensando en futuros

estudios funcionales, en los cuales variaciones en otras poblaciones como células T o monocitos podrían dificultar la interpretación de resultados.

Para completar el presente trabajo se pretende realizar un ensayo evaluando la expresión de HCA 112 en el que se agregue a los grupos de pacientes con LLC (indolente y progresor) un tercer grupo de donantes sanos, los que esperaríamos tengan una expresión de HCA 112 similar a los indolentes. Como las proporciones celulares en sangre periférica de individuos sanos y pacientes leucémicos difieren ampliamente, particularmente estos últimos tienen una proporción muy elevada de células B, se deberían utilizar linfocitos B purificados de individuos sanos para la comparación, en lugar de PBMCs.

Como se comentó antes, la heterogeneidad en el desenlace de la enfermedad hace que marcadores pronósticos capaces de predecir la evolución de la misma al momento del diagnóstico sean fundamentales, facilitando el optar por la estrategia terapéutica más efectiva. Entre los marcadores pronóstico disponibles actualmente el más robusto es el análisis del estado mutacional de la región IgV_H del clon tumoral, aunque también son ampliamente utilizados el estudio de anormalidades cromosómicas y la expresión de CD38 y Zap70 en el linfocito B leucémico. Los marcadores proteicos son particularmente atractivos ya que a priori podrían ser analizados por citometría de flujo, lo que posibilita su aplicación simple en centros hematológicos.

La expresión de HCA 112 en LLC ya había sido previamente estudiada a nivel de ARN mensajero, comparando individuos con la enfermedad y sanos. En un trabajo de Succolo et al. en el que analizan la expresión de genes de las familias MS4A y Tmem176, comparando células B normales y de individuos con LLC, encuentran una expresión muy baja o no detectable tanto de TOR1D como de HCA 112 en linfocitos B normales así como en linfocitos B leucémicos, sin diferencias significativas entre ambos [76]. En este artículo no brindan información sobre las características clínicas y/o moleculares de los pacientes con LLC de los cuales obtienen las muestras, por lo que no se puede saber si utilizan

pacientes indolentes, progresores o una mezcla de ambos [76]. En este sentido, cuando muestran la expresión relativa de ARN mensajero para HCA 112 en muestras de LLC se pueden diferenciar dos grupos, un grupo con expresión de HCA 112 no detectable, y otro con una expresión baja pero detectable que podrían corresponder, de acuerdo a nuestros resultados, con pacientes indolentes y progresores, respectivamente.

Más allá de lo descriptivo de la asociación y la potencialidad como marcador pronóstico de HCA 112, que deberá ser evaluada aumentando el número de muestras, es un objetivo en si comprender el rol biológico que estaría cumpliendo esta proteína en los linfocitos B de pacientes progresores. Si bien una expresión alterada de HCA 112 ha sido asociada a otros tipos de cáncer, como hepatocarcinoma, carcinoma de pulmón y linfomas humanos, y más recientemente a la respuesta al tratamiento con quimiorradioterapia neoadyuvante en pacientes con cáncer rectal, los mecanismos detrás de estas diferencias permanecen esquivos [63,67,77].

Algunas de las hipótesis que nos planteamos para explicar esta asociación se basan en los conocimientos que tenemos actualmente de HCA 112, por un lado como canal iónico y por otro por su capacidad de regular la producción de IL-1 β . Respecto a esto último, el vínculo entre IL-1 β y progresión en LLC se ha descrito previamente, habiendo algunos artículos de finales de los años 80 y principios de los 90 en los que proponen una relación inversa entre la producción de IL-1 β en cultivo por células B de LLC y el grado de progresión de la enfermedad, observando una menor producción en aquellos con mayor progresión del paciente [78-81]. Así como una asociación entre los niveles plasmáticos de IL-1 β y progresión, estando disminuida en pacientes progresores [82]. En esta misma línea, otro estudio, muestra una asociación entre niveles bajos de esta citoquina en suero y menor sobrevida [58].

Resultados preliminares de nuestro grupo mostrarían que HCA 112 puede regular la producción de IL-1 β , disminuyéndola. En este marco es que proponemos que nuestros resultados podrían explicarse de

la siguiente manera: un aumento en la expresión de HCA 112 llevaría a una menor producción de IL-1 β y esto contribuiría a una mayor progresión de la enfermedad. Quedan pendientes estudios que permitan demostrar esta hipótesis.

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS



En el presente trabajo se pretendía, por un lado, estudiar la capacidad de Torid y HCA 112 de regular la activación de inflamasomas en un modelo in vitro de sobre-expresión de estas proteínas en células THP-1, y por otro, evaluar la potencialidad de estas dos moléculas como marcadores pronóstico en LLC.

Para cumplir con el primer objetivo se intentó la sobre-expresión de TORID y/o HCA 112 en células THP-1 prediferenciadas a macrófagos transfectándolas con plásmidos codificantes para estas proteínas. Para la transfección se eligió primeramente la utilización de una metodología basada en lípidos catiónicos, probándose diferentes condiciones. La eficiencia de la transfección se estimó por microscopía de epifluorescencia no observándose una eficiencia superior al 5% para ninguna de las condiciones testadas.

A pesar de esto, se evaluó la presencia de IL-1 β en el medio de cultivo por ELISA comparando las células transfectadas con los plásmidos codificantes para TORID, HCA 112 o ambos, con respecto a las transfectadas con el plásmido control. Se encontró una gran variabilidad entre experimentos. Sin embargo, para una de las condiciones se pudo determinar una disminución en la producción de esta citoquina cuando las células eran transfectadas con ambos plásmidos y no así cuando se transfectaban con cada plásmido individualmente o con el plásmido control.

Resultados de nuestro grupo de trabajo han evidenciado que células dendríticas KO para TORID producen cantidades mayores de IL-1 β que sus controles “*litter mate*” (datos no publicados), reforzando el papel de TORID como regulador del inflamasoma. Además, la corriente generada en ovocitos de *Xenopus* transfectados con TORID mostrada en Segovia et al. es mayor cuando las células son transfectadas con TORID y HCA 112 conjuntamente, sugiriendo un efecto sinérgico de ambas proteínas en el transporte de corriente (datos no publicados). Este efecto sinérgico observado para el transporte de corriente tendría sentido con lo que nosotros observamos con respecto a la disminución en la producción de IL-1 β , y refuerza la idea de que TORID y HCA 112 podrían estar cumpliendo una función conjunta en las células.

Para intentar confirmar estos resultados se cambió la metodología de transfección, probando un protocolo de transfección por nucleofección. Se obtuvieron muy buenos resultados con respecto a la transfección y sobreexpresión de las proteínas, pero aparecieron dificultades en los ensayos de estimulación del inflammasoma NLRP3.

Las dificultades con respecto a lograr una sobreexpresión confiable y reproducible entre experimentos hacen que no se tengan bases del todo sólidas para continuar ahondando en este punto. Quizá una forma de evitar estos inconvenientes sería pasar de la transfección transitoria a generar líneas de células THP-1 que sobreexpresen de forma estable TORID y/o HCA 112.

Con respecto a la potencialidad de TORID y HCA 112 como marcadores pronóstico en LLC, se comparó por WB la expresión de estas proteínas entre pacientes catalogados como indolentes y progresores para la enfermedad. Se encontró una diferencia significativa en la expresión de HCA 112 entre estos dos grupos, estando aumentada en el grupo progresor. Se encontró que HCA 112 estaría siendo expresada por el clon tumoral en los pacientes progresores.

Ha sido reportada una asociación entre bajos niveles de IL-1 β y mayor progresión de la enfermedad. En este escenario nos planteamos como hipótesis que el aumento de HCA 112 podría estar regulando negativamente la presencia de IL-1 β y esto explicaría el peor pronóstico. Restan realizar experimentos para comprobar esta teoría.

BIBLIOGRAFÍA



Bibliografía

- [1] Murphy K, Travers P, Walport, M. *Inmunobiología de Janeway*. 2008. México. Mc Graw Hill.
- [2] Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2005;18(1):21–25.
- [3] Bailey M, Christoforidou Z, Lewis M. Evolution of immune systems: specificity and autoreactivity. *Autoimmun Rev* 2013;12(6):643-7.
- [4] Boehm T. Design principles of adaptive immune systems. *Nat Rev Immunol* 2011;11(5):307-17.
- [5] Sirisinha S. Evolutionary insights into the origin of innate and adaptive immune systems: different shades of grey. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2014;32(1):3-15.
- [6] Cooper M, Alder MN. The evolution of adaptive immune systems. *Cell* 2006;124:815–822.
- [7] Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 2013;496(7446):445-55.
- [8] Orsini F, De Blasio D, Zangari R, Zanier ER, De Simoni MG. Versatility of the complement system in neuroinflammation, neurodegeneration and brain homeostasis. *Front Cell Neurosci* 2014;8:380.
- [9] Thomas S, Rouilly V, Patin E, Alanio C, Dubois A, Delval C, Marquier LG, Fauchoux N, Sayegrih S, Vray M, Duffy D, Quintana-Murci L, Albert ML; Milieu Intérieur Consortium. The Milieu Intérieur study - an integrative approach for study of human immunological variance. *Clin Immunol*. 2015;157(2):277-93.
- [10] Zimmer J, Hobkirk J, Mohamed F, Browning MJ, Stover CM. On the Functional Overlap between Complement and Anti-Microbial Peptides. *Front Immunol*. 2015;5:689.
- [11] Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010;11:785–97.
- [12] Janeway CA Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1989;54 Pt 1:1-13.
- [13] Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:991-1045.
- [14] Olive C. Pattern recognition receptors: sentinels in innate immunity and targets of new vaccine adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 2012;11(2):237-56.
- [15] Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. 2011;30(1):16-34.
- [16] Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*. 2015;16(4):343-53.

- [17] Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science* 2013; 339(6116):166-72.
- [18] Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008;454(7203):428-35.
- [19] Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006;6,173–82.
- [20] Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(12):826-37.
- [21] Scrivo R, Vasile M, Bartosiewicz I, Valesini G. Inflammation as "common soil" of the multifactorial diseases. *Autoimmun Rev.* 2011;10(7):369-74.
- [22] Headland SE, Norling LV. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin Immunol.* 2015.
- [23] Hoffman HM, Wanderer AA, Broide DH: Familial cold autoinflammatory syndrome: phenotype and genotype of an autosomal dominant periodic fever. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2001;108(4):615-620.
- [24] Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity.* 2013;39(6):1003-18.
- [25] Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(2):89-102.
- [26] Dinarello CA, Simon A, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(8):633-52.
- [27] Park H, Bourla AB, Kastner DL, Colbert RA, Siegel RM. Lighting the fires within: the cell biology of autoinflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(8):570-580.
- [28] Martinon, F. et al. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proILbeta. *Mol. Cell* 2002;10,417–426
- [29] Rathinam, V.A. et al. Regulation of inflammasome signaling. *Nat. Immunol.* 2012;13,333–342.
- [30] Xu, H. et al. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pypin inflammasome. *Nature* 2014;513,237–241.
- [31] Vanaja SK, Rathinam VA, Fitzgerald KA. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends Cell Biol.* 2015;25(5):308-15.
- [32] Gurung P, Lukens JR, Kanneganti TD. Mitochondria: diversity in the regulation of the NLRP3 inflammasome. *Trends Mol Med.* 2015;21(3):193-201.
- [33] Perregaux DG, Gabel CA: Human monocyte stimulus-coupled IL-1beta posttranslational processing: modulation via monovalent cations. *The American journal of physiology* 1998, 275(6 Pt 1):C1538-1547.
- [34] Munoz-Planillo R, Kuffa P, Martinez-Colon G, Smith BL, Rajendiran TM, Nunez G: K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* 2013, 38(6):1142-1153.

- [35] Triantafilou K, Triantafilou M. Ion flux in the lung: virus-induced inflammasome activation. *Trends Microbiol.* 2014;22(10):580-8.
- [36] Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat. Rev Immunol.* 2013;13(6):397-411.
- [37] Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol.* 2014;23(1):37-45.
- [38] Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980;26(2):171-6.
- [39] Qin Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis* 2012;221:2-11.
- [40] Sharif O, Bolshakov VN, Raines S, Newham P, Perkins ND. Transcriptional profiling of the LPS induced NF- κ B response in macrophages. *BMC Immunology* 2007;8:1.
- [41] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646–674.
- [42] Virchow R. An address on the value of pathological experiments. *Br. Med. J.* 1881;2:198–203.
- [43] Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(11):759-71.
- [44] Rusakiewicz S, Semeraro M, Sarabi M, Desbois M, Locher C, Mendez R, Vimond N, Concha A, Garrido F, Isambert N, Chaigneau L, Le Brun-Ly V, Dubreuil P, Cremer I, Caignard A, Poirier-Colame V, Chaba K, Flament C, Halama N, Jäger D, Eggermont A, Bonvalot S, Commo F, Terrier P, Opolon P, Emile JF, Coindre JM, Kroemer G, Chaput N, Le Cesne A, Blay JY, Zitvogel L. Immune infiltrates are prognostic factors in localized gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* 2013;73(12):3499-510.
- [45] Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nat Immunol.* 2012;13(4):343-51.
- [46] Kolb R, Liu GH, Janowski AM, Sutterwala FS, Zhang W. Inflammasomes in cancer: a double-edged sword. *Protein Cell.* 2014;5(1):12-20
- [47] Ghiringhelli F. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.* 2009;15,1170–1178.
- [48] Dinarello CA. Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade? *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(2):317-29.
- [49] Voronov E, Carmi Y, Apte RN. The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. *Front Physiol.* 2014;5:114.
- [50] Xu HM. Th1 cytokine-based immunotherapy for cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2014;13(5):482-94.
- [51] Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J*

Hematol. 2015;90(5):446-60.

[52] Bezares F, Slavutsky I, Gabus R, Giordano M, Oppezzo P. Leucemia Linfática Crónica. Las neoplasias linfoides. Buenos Aires 2009;27-48.

[53] Bianchi S, Dighiero G, Pritsch O. Selected topics in Chronic Lymphocytic Leukemia. InTech 2012:3-19.

[54] Binet JL, Leparrier M, Dighiero G, Charron D, Vaugier G, Beral HM, Natali JC, Raphael M, Nizet B, Follezou JY, “A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia. Prognostic significance,” Cancer 1977;40(2):855-864.

[55] Chiorazzi N. Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. Best Pract. Res. Clin. Haematol. 2007;20(3):399-413.

[56] Caligaris-Cappio F, Bertilaccio MT, Scielzo C. How the microenvironment wires the natural history of chronic lymphocytic leukemia. Semin Cancer Biol. 2014;24:43-8.

[57] Rozovski U, Keating MJ, Estrov Z. Targeting inflammatory pathways in chronic lymphocytic leukemia. Crit Rev Oncol Hematol. 2013;88(3):655-66.

[58] Yan XJ, Dozmorov I, Li W, Yancopoulos S, Sison C, Centola M, Jain P, Allen SL, Kolitz JE, Rai KR, Chiorazzi N, Sherry B. Identification of outcome-correlated cytokine clusters in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2011;118(19):5201-10.

[59] Louvet C, Chiffolleau E, Heslan M, Tesson L, Heslan JM, Brion R, Bériou G, Guillonnet C, Khalife J, Anegon I, Cuturi MC. Identification of a New Member of the CD20/FcεR1b Family Overexpressed in Tolerated Allografts. Am J Transplant. 2005;5(9):2143-53.

[60] Lurton J, Rose TM, Raghu G, Narayanan AS. Isolation of a gene product expressed by a subpopulation of human lung fibroblasts by differential display. Am J Respir Cell Mol Biol. 1999;20(2):327-31.

[61] Maeda Y, Fujimura L, O-Wang J, Hatano M, Sakamoto A, Arima M, Ebara M, Ino H, Yamashita T, Saisho H, Tokuhisa T. Role of Clast1 in development of cerebellar granule cells. Brain Res. 2006;1104(1):18-26.

[62] Condamine T, Le Texier L, Howie D, Lavault A, Hill M, Halary F, Cobbold S, Waldmann H, Cuturi MC, Chiffolleau E. Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells. J Leukoc Biol. 2010;88(3):507-15.

[63] Wang Y, Han KJ, Pang XW, Vaughan HA, Qu W, Dong XY, Peng JR, Zhao HT, Rui JA, Leng XS, Cebon J, Burgess AW, Chen WF. Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies. J. Immunol. 2002;169:1102-1109.

[64] Nakajima H, Takenaka M, Kaimori JY, Nagasawa Y, Kosugi A, Kawamoto S, Imai E, Hori M, Okubo K. Gene expression profile of renal proximal tubules regulated by proteinuria. Kidney Int. 2002;61:1577-1587.

[65] Eon Kuek L, Leffler M, Mackay GA, Hulett MD. The MS4A family: counting past 1, 2 and 3. Immunol Cell Biol. 2015.

[66] Zuccolo J, Bau J, Childs SJ, Goss GG, Sensen CW, Deans JP. Phylogenetic analysis of the MS4A and TMEM176

gene families. PLoS One. 2010;5(2):e9369.

[67] Cuajungco MP, Podevin W, Valluri VK, Bui Q, Nguyen VH, Taylor K. Abnormal accumulation of human transmembrane (TMEM)-176A and 176B proteins is associated with cancer pathology. *Acta Histochem.* 2012;114(7):705-12.

[68] Segovia M, Louvet C, Charnet P, Savina A, Tilly G, Gautreau L, Carretero-Iglesia L, Beriou G, Cebrian I, Cens T, Hepburn L, Chiffolleau E, Floto RA, Anegón I, Amigorena S, Hill M, Cuturi MC. Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation. *Am J Transplant.* 2014 May;14(5):1021-31.

[69] Morrison DC, Jacobs DM. Binding of polymixin B to the lipid A portion of bacterial polysaccharide. *Immunochemistry* 1976;13:813-18.

[70] Lee JS, Hmama Z, Mui A, Reiner EN. Stable gene silencing in human monocytic cell lines using lentiviral-delivered small interference RNA. Silencing of the p110 α isoform of phosphoinositide 3-kinase reveals differential regulation of adherence induced by 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol and bacterial lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 2004;279, 9379.

[71] Schnoor M, Buers I, Sietmann A, Broddle MF, Hofnagel O, Robenek H, Lorkowski S. Efficient non-viral transfection of THP-1 cells. *J Immunol Methods* 2009;344(2):109-115.

[72] Maeß MB, Buers I, Robenek H, Lorkowski S. Improved protocol for efficient nonviral transfection of premature THP-1 macrophages. *Cold Spring Harb Protoc* 2011;2011(5).

[73] Maeß MB, Wittig B, Lorkowski S. Highly Efficient Transfection of Human THP-1 Macrophages by Nucleofection. *J Vis Exp* 2014;91,e51960.

[74] Aldo PB, Craveiro V, Guller S, Mo G. Effect of culture conditions on the phenotype of THP-1 monocyte cell line. *Am J Reprod Immunol* 2013;70(1):80–86.

[75] Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, Catovsky D. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia.* 1994;8(10):1640-5.

[76] Zuccolo J, Deng L, Unruh TL, Sanyal R, Bau JA, Storek J, Demetrick DJ, Luidner JM, Auer-Grzesiak IA, Mansoor A, Deans JP. Expression of MS4A and TMEM176 Genes in Human B Lymphocytes. *Front Immunol.* 2013;4:195.

[77] Lopes-Ramos C, Koyama FC, Habr-Gama A, Salim AC, Bettoni F, Asprino PF, França GS, Gama-Rodrigues J, Parmigiani RB, Perez RO, Galante PA, Camargo AA. Comprehensive evaluation of the effectiveness of gene expression signatures to predict complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy and guide surgical intervention in rectal cancer. *Cancer Genet.* 2015.

[78] Ugglä C, Aguilar-Santelises M, Rosén A, Mellstedt H, Jondal M. Spontaneous production of interleukin 1 activity by chronic lymphocytic leukemic cells. *Blood.* 1987;70(6):1851-7.

[79] Pistoia V, Cozzolino F, Rubartelli A, Torcia M, Roncella S, Ferrarini M. In vitro production of interleukin 1 by normal and malignant human B lymphocytes. *J Immunol.* 1986;136(5):1688-92.

[80] Aguilar-Santelises M, Amador JF, Mellstedt H, Jondal M. Low IL-1 beta production in leukemic cells from

progressive B cell chronic leukemia (B-CLL). *Leuk Res.* 1989;13(10):937-42.

[81] Aguilar-Santelises M, Magnusson R, Svenson SB, Loftenius A, Andersson B, Mellstedt H, Jondal M. Expression of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and interleukin-6 in chronic B lymphocytic leukaemia (B-CLL) cells from patients at different stages of disease progression. *Clin Exp Immunol.* 1991;84(3):422-8.

[82] Hulkkonen J, Vilpo J, Vilpo L, Koski T, Hurme M. Interleukin-1 beta, interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 plasma levels and cytokine gene polymorphisms in chronic lymphocytic leukemia: correlation with prognostic parameters. *Haematologica.* 2000;85(6):600-6.