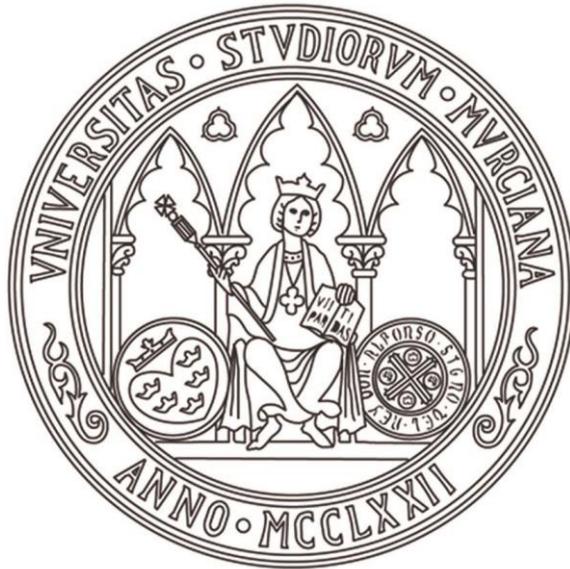




UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Regulación del inflammasoma NLRP3
en enfermedades autoinflamatorias y su implicación
en el metabolismo

D.^a María Cristina Molina López
2024



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Regulación del inflammasoma NLRP3
en enfermedades autoinflamatorias y su implicación
en el metabolismo

Autor: D.^a María Cristina Molina López

Director/es: D. Pablo Pelegrín Vivancos



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 18-01-2024

D./Dña. María Cristina Molina López

doctorando del Programa de Doctorado en

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INTEGRACIÓN Y MODULACIÓN DE SEÑALES EN
BIOMEDICINA**

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Regulación del inflammasoma NLRP3 en enfermedades autoinflamatorias y su implicación en el metabolismo

/Regulation of the NLRP3 inflammasome in autoinflammatory diseases and its involvement in metabolism

y dirigida por,

D./Dña. Pablo Pelegrín Vivancos

D./Dña.

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 18 de enero de 2024

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

Este trabajo de Tesis ha sido llevado a cabo en el Instituto Murciano de Investigaciones Biosanitarias Virgen de la Arrixaca Pascual Parrilla y ha sido financiado por:

1. Regulación del inflamasoma NLRP3: implicaciones en síndromes autoinflamatorios (SAF2017-88276-R), IP: Pablo Pelegrín. Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades - Agencia Estatal de Investigación.
2. Desarrollo técnico de un equipo para determinar en el punto de atención la inmunosupersión de pacientes críticos con sepsis basado en la actividad del inflamasoma NLRP3 (DTS21/00080). IP: Pablo Pelegrín. Instituto de Salud Carlos III.
3. Caracterización de la piroptosis inducida por gasderminas en el desarrollo de enfermedades metabólicas (PID2020-116709RB-100), IP: Pablo Pelegrín. Ministerio de Economía, Industria y competitividad.
4. Estudio clínico para valorar la reducción de la inflamación pulmonar aguda inducida por SARS-CoV-2 mediante MCC950, un inhibidor del inflamasoma NLRP3 (ID32SEN0820). Fundación Séneca.
5. PlasticHeal. (965196). IP: Pablo Pelegrín. EU Horizon 2020.

El autor de esta memoria de Tesis ha participado en la beca de doctorado “Ayudas para contratos predoctorales para la formación de doctores” (PRE2018-086824). Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades - Agencia Estatal de Investigación.

Agradecimientos

Esta etapa llega a su fin, pero me ha brindado un gran enriquecimiento personal y laboral. La persona que entró en 2019 es muy distinta a la de ahora y solo tiene pensamientos positivos de este período. Por ello me gustaría agradecer a todas esas personas que me han ayudado, me han enseñado y me han apoyado.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi director Pablo Pelegrín, por darme la oportunidad de poder realizar el doctorado en su grupo de investigación, por elegirme entre los demás y apostar por mí, brindándome su confianza. También por instruirme, enseñarme, por corregirme y guiarme durante esta etapa. Gracias por su apoyo y entrega durante toda la tesis en especial estos últimos meses.

A mis tutores de tesis, Pedro Aparicio al comienzo, y Elena Martínez-Orozco en este último año.

Agradecer también al profesor Luke O'Neill por aceptarme en su grupo en Dublín. Es una etapa que nunca olvidaré, tanto él como su grupo me aceptaron como una más, y me hicieron disfrutar de mi estancia allí y de la ciudad. También a los amigos que hice en Dublín y me hicieron sentir como en casa Lorena, Sebas, Alessia, Ariadna y Pedro.

A los integrantes del Grupo del CEBAS-CSIC liderados por Pachi, y en especial a Carlos, por todas las conversaciones que hemos tenido, aclaraciones y dudas, y por su implicación en el desarrollo de la parte de metabolómica.

A los integrantes de la plataforma de Cultivo celular, en especial a Rosario, por su apoyo en mis experimentos de Seahorse, por su implicación y sus consejos.

A mis compañeros de laboratorio, que me han hecho este camino más fácil y han dedicado su tiempo en enseñarme y ayudarme en todo momento Malvina, Anai, Cristina Alarcón, Santiago, Alejandro, Carlos de Torre, Fernando, Curro, Juanjo y Dani.

En especial a Diego y Alberto, por sus consejos y risas, y formando junto a Laura el mejor equipo de pádel del laboratorio, que seguro que seguirá en pie. Y a Mari Carmen, por su cariño, sus consejos y apoyo, y por todas las charlas que hemos tenido.

A mis amigos del laboratorio, Laura, Adri N, Adri G, Julito y Sandra, gracias por todo, sin vosotros este camino no hubiera sido igual, sin vuestros consejos y con vuestra paciencia y vuestro cariño. Estoy muy contenta de haber emprendido este camino con vosotros, espero que este camino para vosotros sea igual de fructífero, solo con

conoceros para mí ya lo ha sido, os deseo lo mejor, en especial a Laura que también acaba su etapa y estoy segura de que donde vaya le irá bien.

A mis amigas de toda la vida de mi pueblo, Cristina, María, Marta G, Yaiza, Patricia, Reyes y Marta M; mi amiga de la carrera María Muñoz; y a mis amigas que hice en Holanda, Cristina V y Carmen; por su apoyo incondicional y sus consejos, por animarme y sacarme siempre una sonrisa, y estar en todo momento conmigo.

A mi familia, por estar siempre ahí, por vuestro cariño, por confiar en mí, por cuidarme y apoyarme. En especial a mi hermana que recientemente ha conseguido su título de doctora, y durante estos años nos hemos ayudado y apoyado, sabemos perfectamente lo duro que es llegar hasta aquí.

Por último, a Alejandra, no tengo palabras para agradecerle, tú que has vivido de cerca todo este proceso, has vivido conmigo mis frustraciones y momentos de estrés, pero siempre has estado ahí, apoyándome. También en mis momentos felices cuando he aprendido algo nuevo y las cosas han salido bien. Gracias por estar conmigo siempre.

No sé qué me deparará el futuro, pero si tengo algo claro, siempre llevaré conmigo los buenos momentos que he vivido en esta etapa.

La constancia y la perseverancia son más importantes incluso que el talento para conseguir las metas.

ÍNDICE

Índice

ABREVIATURAS	19
INTRODUCCIÓN	25
1. Sistema inmunitario innato.....	27
1.1 Sistema inmunitario.....	27
1.2 Inflamación.....	28
1.3 Células implicadas en la inflamación.....	28
1.4 Inductores exógenos y endógenos de la inflamación	33
1.5 Receptores de reconocimiento de patrones	34
1.6 Vía de señalización NF-κB	39
1.7 Citoquinas	41
2. Los inflammasomas.....	46
2.1 Componentes de los inflammasomas.....	46
2.2 Mecanismos efectores de los inflammasomas	48
2.3 Tipos de inflammasomas.....	49
3. Inflammasoma NLRP3.....	51
3.1 Estructura de NLRP3.....	52
3.2 Mecanismos de activación	53
3.3 Mecanismos de regulación de NLRP3.....	58
4. Inmunometabolismo.....	61
4.1 Rutas metabólicas.....	61
4.2 Metabolismo en macrófagos.....	64
5. Enfermedades autoinflamatorias.....	69
5.1 Síndrome periódico asociado a criopirina.....	72
6. Estrategias terapéuticas dirigidas al inflammasoma NLRP3	74
OBJETIVOS	79
MATERIALES Y MÉTODOS	83
1. Reactivos.....	85
1.2 Soluciones.....	86
2. Muestras biológicas	87
2.1 Macrófagos inmortalizados de ratón.....	87
2.2 Células Raw-blue	89

2.3 Muestras humanas	89
2.4 Células HEK293T	93
2.5 Macrófagos derivados de médula ósea	93
3. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	94
4. Western blot.....	96
5. Microscopía	98
5.1 Inmunofluorescencia	98
5.2 Microscopía de fluorescencia en HEK293T	99
6. Citometría de flujo.....	100
6.1 Detección de oligómeros de ASC en monocitos humanos	100
6.2 Detección de oligómeros de ASC en HEK293T	101
7. Ensayo de lactato deshidrogenasa	101
8. Determinación de L-lactato	102
9. Ensayo reportero de NF- κ B	102
10. Determinación de la expresión de ARNm	103
11. Análisis de transcriptoma	104
12. Detección de metabolismo a tiempo real	105
13. Estudio metabolómico.....	107
13.1 Estudio metabolómico no dirigido	107
13.2 Estudio metabolómico dirigido.....	108
14. Transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia	109
15. Análisis estadístico	110
RESULTADOS	113
1. Activación del inflammasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS	115
1.1 Las variantes de NLRP3 asociadas a CAPS dan como resultado un inflammasoma constitutivamente activo	115
1.2 Los niveles de expresión de variantes de NLRP3 asociadas a CAPS influyen en la activación constitutiva del inflammasoma	121
2. Modulación del inflammasoma NLRP3 asociado a CAPS mediante NF- κ B	127
3. Regulación del inflammasoma NLRP3 asociado a CAPS por deubiquitininas.....	139
4. La activación constitutiva del inflammasoma NLRP3 con mutaciones asociadas a CAPS induce una reprogramación metabólica de las células mieloides	145
4.1 Las variantes de NLRP3 asociadas a CAPS inducen reprogramación metabólica.....	145
4.2 El inflammasoma NLRP3 con variantes patogénicas asociadas a CAPS altera la expresión de los genes de la glicólisis	152
4.3 La glicólisis está afectada por el inflammasoma NLRP3 mutante asociado a CAPS	161

4.4 La disminución de la glicólisis por la activación constitutiva del inflammasoma NLRP3 mutante limita la producción de IL-1 β	168
5. El 4-octilitaconato bloquea la activación constitutiva del inflammasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS	171
6. Moléculas análogas a MCC950 como potenciales inhibidores de NLRP3, y nuevos tratamientos del síndrome CAPS.....	176
DISCUSIÓN.....	185
1. Activación del inflammasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS	187
2. Modulación del inflammasoma NLRP3 asociado a CAPS mediante NF- κ B	190
3. Regulación del inflammasoma NLRP3 asociado a CAPS por deubiquitinasa.....	192
4. La activación constitutiva del inflammasoma NLRP3 con mutaciones asociadas a CAPS induce una reprogramación metabólica de las células mieloides.....	194
5. El 4-octilitaconato bloquea la activación constitutiva del inflammasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS	196
6. Moléculas análogas a MCC950 como potenciales inhibidores de NLRP3, y nuevos tratamientos del síndrome CAPS.....	198
7. Resumen	200
CONCLUSIONES	203
Conclusiones en español	205
Conclusiones en inglés	206
REFERENCIAS	209
RESUMEN EN INGLÉS.....	235
PUBLICACIONES ASOCIADAS A ESTA TESIS.....	245

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismos de señalización de TLRs	36
Figura 2. Vía canónica de señalización de NF-κB	41
Figura 3. Dominios del sensor NLRP3	52
Figura 4. Modelos de conformación en 3D de NLRP3.	53
Figura 5. Modelo de activación canónica del inflamasoma NLRP3	56
Figura 6. Modelo de activación no canónica del inflamasoma NLRP3	57
Figura 7. Modificaciones postraduccionales de NLRP3.	61
Figura 8. Esquema de la vía de la glicólisis	62
Figura 9. Esquema del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.....	63
Figura 10. Reprogramación metabólica de los macrófagos a M1 o M2.....	68
Figura 11. Estructuras moleculares de succinato, itaconato y sus derivados.	69
Figura 12. Esquema del sistema inducible por doxiciclina	87
Figura 13. Separación en gradiente de densidad de sangre completa.....	91
Figura 14. Representación de ELISA tipo sándwich	96
Figura 16. Representación de los resultados de Seahorse	106
Figura 17. Los monocitos de pacientes CAPS presentan una activación constitutiva del inflamasoma NLRP3	118
Figura 18. Liberación basal de citoquinas en pacientes CAPS y FMF	119
Figura 19. Diferente expresión génica de <i>IL1B</i> e <i>IL18</i> entre pacientes CAPS y FMF.	120
Figura 20. La expresión de variantes de NLRP3 asociadas a CAPS en macrófagos producen el procesamiento constitutivo de GSDMD	123
Figura 21. La expresión de variantes NLRP3 asociadas a CAPS en macrófagos resulta en una activación constitutiva del inflamasoma	124
Figura 22. El aumento de la expresión de la variante p.D303N de NLRP3 resulta en un aumento en la activación constitutiva del inflamasoma.	126
Figura 23. El LPS modula la activación del inflamasoma NLRP3 en macrófagos que expresan la variante p.D303N.....	130
Figura 24. Diferentes PAMPs y DAMPs inducen la liberación de IL-1β dependiente de NF-κB en macrófagos que expresan variantes patogénicas de NLRP3.	131
Figura 25. La dosis y el tiempo de los inductores de NF-κB condicionan la liberación de IL-1β en macrófagos con variantes de NLRP3 asociadas a CAPS	133
Figura 26. La activación de NF-κB con diferentes PAMPs y DAMPs aumenta la formación de oligómeros de ASC y la liberación de IL-1β en células de pacientes CAPS.....	135
Figura 27. La inducción de NF-κB modula el inflamasoma NLRP3 con variantes patogénicas	136
Figura 28. Secretoma del inflamasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS.	138
Figura 29. Las deubiquitininas modulan la activación constitutiva del inflamasoma en macrófagos que expresan la variante p.D303N de NLRP3	141

Figura 30. Las deubiquitinasas controlan la activación inflammasoma NLRP3 asociado a CAPS tras la inducción de NF-κB.	142
Figura 31. Las deubiquitinasas están involucradas en la activación constitutiva del inflammasoma NLRP3 en pacientes CAPS.	143
Figura 32. Los inhibidores de deubiquitinasas afectan la expresión de <i>Il1b</i> e <i>Il18</i>	144
Figura 33. Los monocitos de pacientes con CAPS presentan un metabolismo alterado.....	147
Figura 34. Metabolitos identificados tentativamente en células mieloides con variantes de NLRP3 asociadas a CAPS.....	148
Figura 35. La expresión de variantes asociadas a CAPS presentan una expresión alterada de genes relacionados con el metabolismo.....	154
Figura 36. Análisis de transcriptómica en macrófagos que expresan la variante patogénica p.D303N de NLRP3.	155
Figura 37. Análisis de enriquecimiento GO en macrófagos que expresan la variante patogénica NLRP3 p.D303N.	157
Figura 38. Disminución de la capacidad glicolítica en macrófagos que expresan la variante patogénica p.D303N de NLRP3.	163
Figura 39. Los producción de lactato, piruvato y ATP glicolítico esta disminuida en macrófagos que expresan la variante patogénica p.D303N de NLRP3.	164
Figura 40. El ciclo de los ácidos tricarboxílicos no está afectado en macrófagos que expresan la variante patogénica p.D303N de NLRP3.	166
Figura 41. La glicólisis modula la liberación de IL-1β, pero no IL-18, en macrófagos que expresan la variante p.D303N de NLRP3.....	169
Figura 42. 4-OI inhibe la liberación de IL-18 en macrófagos que expresan variantes de NLRP3 asociadas a CAPS.....	173
Figura 43. 4-OI reduce la activación de caspasa-1, el procesamiento de GSDMD y la piroptosis inducida por NLRP3 p.D303N.	174
Figura 44. 4-OI inhibe la formación de oligómeros de ASC dependiente de la expresión de la variante p.D303N de NLRP3.....	175
Figura 45. Los análogos de MCC950 (E1 y E3) inhiben la liberación de IL-1β dependiente de NLRP3.....	178
Figura 46. Curvas IC ₅₀ de E1 y E3.	179
Figura 47. E1 y E3 inhiben el inflammasoma NLRP3 silvestre y NLRP3 con variantes asociadas a CAPS.....	180
Figura 48. El análogo de MCC950, E1, inhibe la señal de cebado de NLRP3.....	182
Figura 49. Esquema modelo de la activación de NLRP3 con variantes patogénicas asociadas a CAPS.....	201

Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de las principales inflamomasopatías.....	71
Tabla 2. Listado de reactivos utilizados en los distintos ensayos.	85
Tabla 3. Datos demográficos y clínicos de los individuos inscritos en esta Tesis.....	90
Tabla 4. Kits ELISA que se han utilizado en esta Tesis.	95
Tabla 5. Anticuerpos y diluciones utilizadas en la técnica de Western Blot.	98
Tabla 6. Metabolitos identificados tentativamente en monocitos humanos.	150
Tabla 7. Metabolitos identificados tentativamente en macrófagos que expresan la variante p.D303N de NLRP3.....	151
Tabla 8. Procesos biológicos de genes regulados positivamente en macrófagos que expresan la variante p.D303N de NLRP3.....	158
Tabla 9. Procesos biológicos de genes regulados negativamente en macrófagos que expresan la variante p.D303N de NLRP3.....	159

ABREVIATURAS

Abreviaturas

La nomenclatura utilizada en esta Tesis para genes y proteínas se ha empleado según lo establecido por el comité internacional HGNC (del inglés *Hugo Gene Nomenclature Committe*) y por el nombre recomendado del consorcio de la base de datos UniProt, formado por el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), el Instituto Suizo de Bioinformática (SIB), y el recurso de información sobre proteínas (PIR).

4-OI	4-Octilitaconato
2-DG	2-Desoxi-D-glucosa
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
AD	Autosómico dominante
ALR	Receptor tipo AIM2
ATP	Adenosín trifosfato
ASC	Proteína asociada a la apoptosis con dominio CARD
AR	Autosómico recesivo
BMDM	Macrófagos derivados de médula ósea
BRCC3	Subunidad 3 del complejo que contiene BRCA1/BRCA2
BRET	Transferencia de energía por resonancia por bioluminiscencia
BSA	Albúmina de suero bovino
CARD	Dominio de reclutamiento y activación de caspasas
CAPS	Síndrome periódico asociado a criopirina
CINCA	Síndrome articular, cutáneo y neurológico crónico infantil
CLR	Receptor de lectina tipo C
DAMP	Patrones moleculares asociados al daño
DC	Célula dendrítica
DUB	Deubiquitinasa
ECAR	Tasa de acidificación extracelular
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ETC	Cadena de transporte de electrones
FAS	Síntesis de ácidos grasos
FAO	Oxidación de ácidos grasos
FCAS	Síndrome autoinflamatorio familiar inducido por frío
FMF	Fiebre mediterránea familiar
GSDMD	Gasdermina D
HAMP	Patrones moleculares de alteración homeostática
HIF1α	Factor 1-alfa inducible por hipoxia

ABREVIATURAS

HMBG1	Proteína de caja 1 del grupo de alta movilidad
IL	Interleuquina
IFN	Interferón
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
LDH	Lactato deshidrogenasa
LRR	Repeticiones ricas de leucina
LPS	Lipopolisacárido
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MMR	Receptor de manosa de macrófagos
MSU	Cristales de urato monosódico
mtROS	Especies reactivas de oxígeno mitocondriales
MWS	Síndrome de Muckle-Wells
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NLR	Receptor tipo NOD
NK	Células asesinas naturales
NO	Óxido nítrico
NOMID	Enfermedad inflamatoria multisistémica de inicio neonatal
OCR	Tasa de consumo de oxígeno
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PCA	Análisis de componentes principales
PYD	Dominio pirina
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
PPP	Ruta de las pentosas fosfato
PTM	Modificación postraduccional
RFP	Proteína roja fluorescente
RLR	Receptor tipo RIG-I
SEAP	Fosfatasa alcalina embrionaria secretada
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TLR	Receptor tipo <i>Toll</i>
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TOFIE	Evaluación del inflammasoma en tiempo de vuelo
USP	Peptidasas específicas de ubiquitinas
UCHL	Ubiquitina C-terminal hidrolasa
YFP	Proteína amarilla fluorescente

INTRODUCCIÓN

1.Sistema inmunitario innato

1.1 Sistema inmunitario

La inmunidad hace referencia al conjunto de mecanismos biológicos que posee un organismo para actuar frente a señales de peligro, se constituye de células y moléculas que forman el sistema inmunitario. Este debe ser capaz de discriminar señales propias de las impropias, y de estas últimas, aquellas que sean inofensivas o perjudiciales (Janeway, 1992). El sistema inmunitario se divide en innato, presente en todos los seres vivos, y adaptativo, estando este solo en los organismos vertebrados con mandíbula (Janeway & Medzhitov, 2002; Sattler, 2017).

El sistema inmunitario innato es el primer mecanismo de defensa del hospedador, actúa frente a una gran variedad de toxinas, agentes infecciosos o lesiones. Este se compone de barreras anatómicas (piel y membranas mucosas), fisiológicas (temperatura y pH estomacal) y microbiológicas. También contiene un número limitado de receptores, los denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Estos se expresan principalmente en células específicas del sistema inmunitario innato y reconocen estructuras conservadas de patógenos y moléculas de tejidos dañados, promoviendo la liberación de citoquinas y quimioquinas que activan la respuesta inmunitaria. Dentro de las células efectoras del sistema inmunitario innato se encuentran: monocitos, macrófagos, mastocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células dendríticas (DC), células naturales asesinas (NK) y las células linfoides innatas (Marshall et al., 2018; Thomas et al., 2000). La respuesta innata se caracteriza por ser antígeno-inespecífica, rápida y no genera memoria, sin embargo, estudios recientes muestran que reinfecciones con un patógeno incrementan su efectividad, este fenómeno se le conoce como inmunidad entrenada (Netea et al., 2020; Saeed et al., 2014). Además, esta respuesta se encarga del reclutamiento de células inmunitarias al sitio de infección, la activación del sistema del complemento, la fagocitosis, y la inflamación, también desempeña un papel crucial en la activación de la respuesta inmunitaria adaptativa (Murphy & Weaver, 2016; Turvey & Broide, 2010; Yeretssian et al., 2008).

Por otro lado, el sistema inmunitario adaptativo, llamado así porque está moldeado por la exposición a antígenos, se entiende como el segundo mecanismo de defensa y se considera una respuesta más lenta, pero más eficaz ya que es antígeno-específica (Iwasaki & Medzhitov, 2010). Está orquestada principalmente por los linfocitos T y B, los cuales generan memoria, permitiendo así una respuesta más rápida

y eficiente tras una reexposición al antígeno. A diferencia de la respuesta innata, la respuesta adaptativa cuenta con un repertorio de receptores extremadamente diverso y generado aleatoriamente, y con unas proteínas denominadas anticuerpos, que ofrecen la posibilidad de reconocer cualquier antígeno (Iwasaki & Medzhitov, 2015; Wüthrich et al., 2012).

1.2 Inflamación

La inflamación es una respuesta protectora fundamental del huésped que está orquestada principalmente por el sistema inmunitario innato, aunque también por el adaptativo. Esta actúa frente a diferentes agentes (exógenos o endógenos), para prevenir su propagación y mantener la homeostasis de los tejidos mediante la eliminación de señales dañinas, como lesiones estériles o células necróticas, y promoviendo la reparación del tejido. La definición clásica de inflamación descrita por Celso, Galeno y más tarde por Virchow, se mantiene hasta la actualidad, y comprende varios estadios a nivel tisular: rubor (enrojecimiento), calor, dolor, tumor (hinchazón) y pérdida de función. A nivel molecular, la inflamación comprende una interacción compleja de señales de retroalimentación que pueden conducir a la resolución y reparación (inflamación aguda), o a una respuesta prolongada (inflamación crónica), que resulta en numerosas patologías (Netea et al., 2017; Oronsky et al., 2022).

En la primera etapa de la inflamación, los patógenos o el daño tisular son detectados por receptores PRR presentes en diferentes tipos celulares. Esta detección desencadena la liberación de moléculas proinflamatorias como citoquinas, quimioquinas, aminas vasoactivas, fragmentos del complemento o mediadores lipídicos. Estas señales activan a las células endoteliales, aumentando la permeabilidad vascular y permitiendo la llegada de células inmunitarias al sitio de la infección para aumentar la respuesta inflamatoria, siendo uno de sus principales efectores la formación de inflamasomas, como se detallará más adelante (Serhan et al., 2007; Zhao et al., 2021). Posteriormente, se produce la fase de resolución, en la cual intervienen mecanismos que detienen la inflamación y restablecen la homeostasis del tejido, como la liberación de citoquinas antiinflamatorias o mediadores lipídicos, lipoxinas (Bandeira-Melo et al., 2000; Levy et al., 2001; Serhan & Levy, 2018).

1.3 Células implicadas en la inflamación

En la respuesta inflamatoria participan numerosos tipos celulares, entre los que se incluyen células no inmunitarias, como las células endoteliales y epiteliales. Estas expresan PRRs y tienen la capacidad de identificar patógenos, secretar citoquinas

proinflamatorias y producir péptidos antimicrobianos. Sin embargo, la regulación principal de la inflamación recae en las células del sistema inmunitario, especialmente en las células innatas, donde granulocitos, mastocitos, DC, NK, monocitos y macrófagos tienen gran relevancia. No obstante, los linfocitos T, también desempeñan un papel crucial en la inflamación, estos se pueden diferenciar dependiendo de las señales que los estimulen en varias clases, T reguladores (Treg) o T colaboradores (Th), que a su vez dan a lugar a varios subtipos (Th1, Th2 y Th17) (Zhao et al., 2021).

Granulocitos

El rasgo distintivo de los granulocitos radica en la presencia de gránulos en su citoplasma y en su núcleo lobulado, lo que les otorga el nombre alternativo de leucocitos polimorfonucleares. Estos experimentan un proceso de maduración en la médula ósea, y su producción se intensifica durante las respuestas inmunitarias, su tiempo medio de vida es relativamente corto ya que sólo viven unos pocos días. La función principal de estas células es identificar, ingerir y destruir patógenos microbianos a través de receptores, mecanismos oxidativos y enzimas como lisozimas, colagenasas y elastasas. Además, cuando estas células se activan, liberan sus gránulos, que contienen una variedad de enzimas y proteínas tóxicas. El grupo de granulocitos está formado por basófilos, eosinófilos y neutrófilos, siendo estos últimos los más abundantes (Geering et al., 2013; Murphy & Weaver, 2016).

Los basófilos representan menos del 1% del total de leucocitos, normalmente no están presentes en los tejidos, pero pueden ser reclutados al sitio de inflamación. Tras la estimulación se desgranulan, liberando mediadores proinflamatorios y citoquinas, además de sustancias vasodilatadoras, quimiotácticas y citotóxicas (Gilmartin et al., 2008; Ramsey et al., 2023).

Los eosinófilos, desempeñan funciones importantes en la defensa contra infecciones parasitarias, virales, fúngicas y bacterianas, tras su desgranulación liberan mediadores proinflamatorios y quimioquinas (Murphy & Weaver, 2016). Recientemente se ha demostrado que estas células pueden estar implicadas en funciones homeostáticas y reguladoras del sistema inmunitario, como su acción sobre la resolución de la inflamación (Isobe et al., 2012; Kobayashi et al., 2010; Wu et al., 2011). Tanto basófilos como eosinófilos son cruciales para el desarrollo de la alergia, la inflamación y están involucrados en la regulación de los linfocitos Th2 (Nadif et al., 2013; Strandmark et al., 2017).

Los neutrófilos son las principales células inmunitarias que se reclutan en el sitio de inflamación, después de estímulos quimiotácticos liberados por tejidos dañados o por

los propios patógenos. Estas células migran al sitio de inflamación a través de la circulación sanguínea, donde se extravasan debido a la expresión de moléculas de adhesión, como L-selectina, en la superficie de las células endoteliales. Los neutrófilos desempeñan una amplia gama de funciones durante el proceso inflamatorio, siendo una de las más importantes la fagocitosis, la cual consiste en la ingestión y degradación de patógenos, células muertas y otros materiales extraños. Tras cumplir su función los neutrófilos pueden morir en el proceso de fagocitosis o someterse a apoptosis programada. Otra función de estas células es la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) donde los neutrófilos activados liberan componentes nucleares y granulares para crear estructuras de ADN en forma de red, en la que los patógenos quedan atrapados y sufren la muerte por NETosis (Geering et al., 2013; Poli & Zanoni, 2023). La producción de trampas NET no es exclusiva de estas células, también eosinófilos, mastocitos, monocitos y macrófagos tienen mecanismos similares. Recientemente se ha descrito, que la activación de gasdermina D (GSDMD) es un proceso clave que controla la permeabilidad de las membranas nucleares, permitiendo así la liberación de NET (Chen et al., 2018).

Por otro lado, los neutrófilos también están involucrados en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la secreción de proteasas, el reclutamiento de monocitos y macrófagos al sitio de lesión, y son cruciales para la resolución de la inflamación y restablecimiento de la homeostasis tisular (Zhao et al., 2021). Estudios recientes revelan que similar a los macrófagos, los neutrófilos también pueden experimentar polarización a N1 con perfil proinflamatorio o a N2 con perfil antiinflamatorio (García-Culebras et al., 2019).

Mastocitos

Los mastocitos son células inmunitarias que residen en los tejidos periféricos, principalmente en la piel y en las mucosas, dichas ubicaciones resaltan su importancia en el inicio y la propagación de la respuesta inmunitaria. Estas células, presentan en su citoplasma gránulos que contienen heparina, serotonina e histamina. Tras su activación, liberan mediadores proinflamatorios, entre ellos la histamina (que aumenta la permeabilidad vascular), prostaglandinas y leucotrienos, y una gran variedad de citoquinas, como miembros de la familia IL-1, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleuquina-6 (IL-6), que mejoran el proceso inflamatorio especialmente durante los primeros eventos (Theoharides et al., 2012). Los mastocitos, de manera similar a los basófilos, participan en respuestas alérgicas (Dudeck et al., 2011) y desempeñan un papel importante en el reclutamiento de neutrófilos, pero también de eosinófilos y monocitos (Abraham & St. John, 2010).

Células Dendríticas

Las DCs residen en la piel y en superficies mucosas, se consideran células presentadoras de antígeno profesionales, actuando así como puente entre la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Estas células se subdividen en dos grupos principales: DCs convencionales y DCs plasmacitoides, aunque también hay otro tipo de células DC especializadas, las células de Langerhans.

Las DCs detectan microbios, los capturan mediante varios mecanismos (fagocitosis, endocitosis, pinocitosis) (Swanson & Watts, 1995), y migran desde los ganglios linfáticos periféricos a los primarios. Es aquí donde ocurre la presentación de antígeno a las células T y B, mediante el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II). Además de la presentación de antígeno, las DCs secretan mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios, y regulan la diferenciación de las células T en los distintos subtipos (Th1, Th2, Th17 y Treg) (Segura & Amigorena, 2013; Zhao et al., 2021).

Células asesinas naturales

Las células NK son linfocitos citotóxicos clasificados recientemente como células linfoides innatas, se caracterizan por su citoplasma granular, y juegan un papel importante en la eliminación de células infectadas por virus y células cancerosas. Tienen la capacidad de distinguir las células del huésped normales de las células extrañas mediante receptores. Su función efectora está regulada por un balance entre los receptores de superficie inhibidores y activadores, estos reconocen el MHC de clase I expresado en la superficie de las células normales, dicha unión inhibe la lisis y la secreción de citoquinas. Cuando las células NK se activan, se vuelven citotóxicas y liberan gránulos líticos (perforina o granzimas) sobre las células diana induciendo lisis o apoptosis (Campos et al., 2020). Además, estas células también median la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Chiossone et al., 2018; Ochoa et al., 2017).

Las células NK están involucradas en la respuesta inflamatoria, ya que expresan numerosos receptores PRR. Una vez activadas producen la liberación de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias como el IFN- γ , IL-13, IL-5 y TNF- α , y factores de crecimiento. También promueven la resolución de la inflamación, ya que pueden liberar citoquinas antiinflamatorias, como IL-10, e interactúan con otras células, como los macrófagos y las DCs, para influir en su activación y función (Martinez-Espinosa et al., 2021; Zhao et al., 2021).

Monocitos y macrófagos

Los monocitos son leucocitos derivados de la médula ósea que circulan por la sangre y el bazo, y representan alrededor del 10% de los leucocitos totales de la sangre. Se han identificado varias subpoblaciones en función de la expresión de los marcadores de superficie CD14 y CD16: monocitos clásicos (CD14⁺⁺CD16⁻), monocitos no clásicos (CD14⁺CD16⁺⁺) y, los monocitos intermedios (CD14⁺⁺CD16⁺). Su reclutamiento y diferenciación a macrófagos es esencial para el inicio, progresión y resolución de la inflamación (Hijdra et al., 2013; Passlick et al., 1989).

Durante el inicio de la inflamación, los monocitos clásicos son reclutados por quimioquinas. Estos se encargan de fagocitar a los patógenos, secretar otras quimioquinas y presentar el antígeno a través del MHC de clase II (Chiu & Bharat, 2016). A medida que avanza la inflamación, se incrementa la secreción en el sitio de infección del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), lo que promueve la diferenciación de monocitos a macrófagos, aunque también pueden diferenciarse a células dendríticas (Murphy & Weaver, 2016).

Los macrófagos residentes se encuentran en los tejidos como centinelas, detectando patógenos y lesiones. Estos desempeñan funciones esenciales para el mantenimiento de la homeostasis, ya que están involucrados en el proceso de fagocitosis, autofagia, presentación de antígenos, y orquestan las respuestas inmunitarias como la inflamación. Dichos macrófagos, tienen un fenotipo plástico en respuesta a su entorno, por lo general, según su polarización encontramos dos tipos, los macrófagos activados clásicamente (M1) que tienen un fenotipo proinflamatorio, o los macrófagos activados alternativamente (M2) que tiene un fenotipo antiinflamatorio (Chiu & Bharat, 2016; Gordon & Martinez, 2010; Mantovani et al., 2004).

Los macrófagos M1 se activan en respuesta a señales proinflamatorias, como las citoquinas IFN- γ y TNF- α , o señales derivadas de patógenos, como el lipopolisacárido (LPS). Una vez activados, inducen al inflamasoma, liberan quimioquinas y citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-18, TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-23) y generan intermediarios tóxicos, como el óxido nítrico (NO) o ROS. Además, participan en la fagocitosis, presentan antígenos a través del MHC de clase II, promueven la respuesta inflamatoria, reclutan granulocitos y contribuyen a la diferenciación de linfocitos Th1, lo que a su vez refuerza la polarización hacia el fenotipo M1 (Chiu & Bharat, 2016; Pelegrin & Surprenant, 2009; Wculek et al., 2022).

Por otro lado, los macrófagos M2 se activan en presencia de las citoquinas IL-4 e IL-13, aunque hormonas glucocorticoides parecen estar implicadas. Estos macrófagos promueven la resolución de la inflamación, disminuyen la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-12), aumentan la expresión del receptor 2 de interleuquina 1 (IL-1R2), secretan quimioquinas y citoquinas antiinflamatorias como IL-10 o el antagonista de IL-1 (IL-1Ra), y promueven la diferenciación de linfocitos Th2, los cuales influyen en la polarización a M2 (Gordon & Martinez, 2010; Makita et al., 2015; Wculek et al., 2022).

Sin embargo, el paradigma de clasificación M1/M2 encuentra varias controversias, debido a su simplicidad e incapacidad de representar adecuadamente la complejidad y la plasticidad de las respuestas de los macrófagos frente a distintos estímulos, existiendo un continuo de polaridades entre M1 y M2.

1.4 Inductores exógenos y endógenos de la inflamación

Los PRRs ubicados en las células reconocen una amplia variedad de señales y son los encargados de inducir la respuesta inflamatoria. Las señales que activan los PRRs, se clasifican según su procedencia y se dividen en dos categorías principales: patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) si la señal se asocia a microorganismos patógenos, en cuyo caso es exógena, o patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) si la señal es endógena.

Las señales PAMPs son elementos moleculares específicos conservados que están presentes en bacterias, virus, hongos y parásitos. Entre las moléculas PAMP más destacadas se encuentran el LPS, un componente de las membranas bacterianas Gram-negativas, el ácido lipoteicoico presente en la pared celular de las bacterias Gram-positivas, así como peptidoglicanos, β -glucanos, la flagelina bacteriana, el ARN de cadena simple y bicatenario de virus, y el ADN no metilado, entre otros (Angosto-Bazarrá et al., 2021; Hwangbo et al., 2021).

En cambio, las señales DAMP son moléculas endógenas que se liberan cuando las células del huésped sufren algún tipo de daño debido a una infección, lesión, estrés u otros factores, las cuales pueden activar y amplificar la respuesta inflamatoria actuando como alarminas. Dentro de este grupo se incluyen numerosos elementos como ácidos nucleicos, cristales de ácido úrico, sílice o β -amiloide, el exceso de ácidos grasos como el ácido palmítico, LDL oxidado, el adenosín trifosfato (ATP), las proteínas de choque térmico o la proteína de caja 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1) (Angosto-Bazarrá et al., 2021). Otras señales que también actúan como DAMPs, son

las proteínas de unión a Ca^{+2} S100A9 y S100A8, estas forman un heterodímero y son reconocidas por TLR4 (un subtipo de PRR que se describirá más en detalle en el siguiente apartado) (He et al., 2016).

A parte de las señales PAMPs y DAMPs, se ha observado un grupo de señales que surge cuando hay alguna perturbación de la homeostasis citoplasmática de las células del hospedador. Dichas señales son los patrones moleculares de alteración homeostática (HAMPs), un claro ejemplo es la inactivación de las enzimas RhoA GTPasas que inducen la activación del inflammasoma pirina (Liston & Masters, 2017).

1.5 Receptores de reconocimiento de patrones

Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) tienen un papel fundamental en las respuestas inmunitarias innatas, pero también participan en las respuestas adaptativas. Estos receptores se expresan en la superficie o en el interior de numerosas células del sistema inmunitario o en células no inmunitarias como las células epiteliales, y se encargan de reconocer señales PAMPs, DAMPs o cascadas de señalización inducidas por estas. La activación de estos receptores origina vías de señalización intracelulares específicas y la transcripción de genes inductores de la respuesta inmunitaria, como citoquinas, y quimioquinas, con el objetivo de eliminar los patógenos y las células infectadas. En condiciones normales, la activación de estos receptores origina una respuesta inmunitaria efectiva, sin embargo, en ocasiones esta respuesta no está controlada y se cronifica, dando lugar a numerosas patologías (Akira et al., 2006; Takeuchi & Akira, 2010).

Los PRRs se expresan de forma constitutiva en las células, están codificados en la línea germinal y son independientes de la memoria inmunológica. Se dividen a su vez en varias familias dependiendo de su localización, estructura y el tipo de PAMP o DAMP que reconocen. En entre estas familias se incluyen los receptores tipo *Toll* (TLRs), receptores de lectina tipo C (CLRs), receptores tipo RIG-I (RLRs), receptores tipo NOD (NLRs) y los receptores tipo AIM2 (ALRs), siendo este último la incorporación más reciente (Li & Wu, 2021).

Receptores tipo Toll

Los receptores tipo *Toll* (TLRs) fueron los primeros en describirse y constituyen una de las familias de PRRs mejor caracterizada (Janeway, 1989). Estos receptores se expresan en numerosas células inmunitarias, así como en células no inmunitarias como células epiteliales, endoteliales y fibroblastos (Takeuchi & Akira, 2010). Constan de varios dominios: (i) dominio extracelular N-terminal de repeticiones ricas en leucina

(LRR), es la región responsable del reconocimiento de patógenos; (ii) dominio transmembrana, es una región hidrofóbica que ancla el receptor a la membrana celular; (iii) y el dominio Toll/receptor de interleuquina-1 (TIR), el cual se encuentra en el citoplasma, es esencial para la transducción de la señal y la consecuente activación de la respuesta inmunitaria.

Hay numerosos TLR, se han descrito 10 en humanos y 12 en ratón, lo que permite detectar una amplia gama de patógenos. Estos receptores se dividen en dos subgrupos dependiendo de su localización celular. Un grupo está compuesto por TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, los cuales se encuentran en los compartimentos intracelulares: endosomas, lisosomas y endolisosomas; y reconocen mayormente ácidos nucleicos microbianos. El resto de TLRs (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR10) se encuentran en la membrana plasmática y reconocen principalmente componentes de las membranas microbianas (Barton & Kagan, 2009). TLR4 es el más caracterizado hasta la fecha, reconoce una gran amplia variedad de ligandos PAMPs o DAMPs, donde se incluye el ácido graso palmitato, las proteínas S100A9/8 o LPS (He et al., 2016; Hwangbo et al., 2021).

Cuando, los TLRs se activan tras el reconocimiento de distintas señales PAMPs o DAMPs, se produce una dimerización del receptor para la correcta transmisión de la señal. Pueden formar homodímeros, como TLR4, o heterodímeros, como TLR2 el cual se une tanto a TLR1 como a TLR6 (Creagh & O'Neill, 2006). Tras la dimerización, reclutan otras proteínas y activan dos principales vías de señalización. Una es la ruta dependiente del factor 88 de diferenciación mieloide (MyD88), en esta la quinasa 1 asociada al receptor de IL-1 (IRAK) y el factor asociado al receptor de TNF 6 (TRAF6) promueven la fosforilación de I κ B con la consecuente liberación y translocación al núcleo del factor nuclear kappa B (NF- κ B), lo que conlleva a la inducción de la expresión genes de diferentes citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-1 y TNF- α), quimioquinas y la ciclooxygenasa-2 (Qiao et al., 2012; Verstak et al., 2009). La otra vía es independiente de MyD88 y produce la transcripción de interferón tipo I. Esta ruta es llevada a cabo por los adaptadores TRIF (dominio TIR que contiene proteínas adaptadoras que inducen interferón β) y TRAM (molécula adaptadora relacionada con TRIF) que promueven la activación y translocación al núcleo de IRF3 (factor regulador de interferón 3). La mayoría de los TLR dependen de la expresión de MyD88 para todas sus funciones, mientras que TLR3 y TLR4 son capaces de enviar señales a través de una vía independiente de MyD88 (Oshiumi et al., 2003; Pascual et al., 2021; Yamamoto et al., 2002) (**Figura 1**).

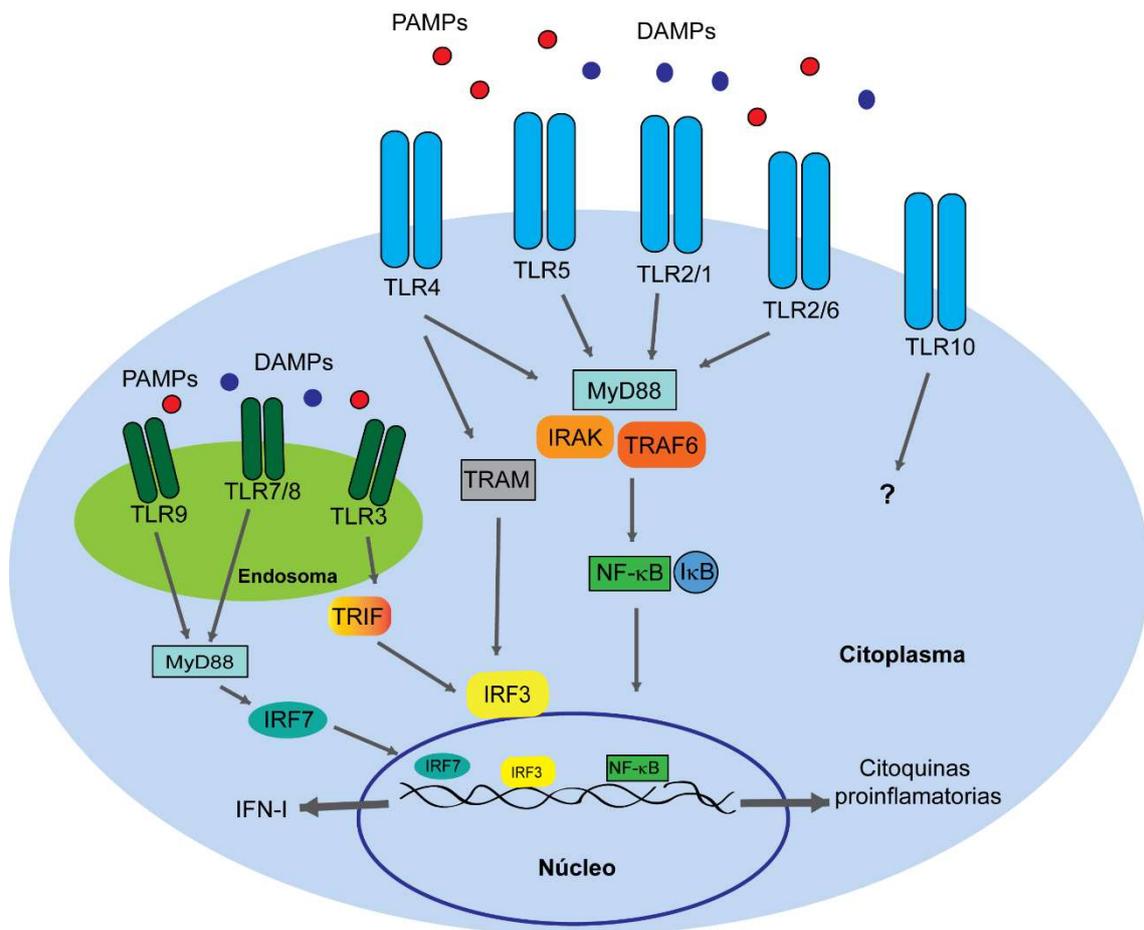


Figura 1. Mecanismos de señalización de TLRs. Resumen de las vías de señalización de los diferentes TLRs. Tras su activación, forman homodímeros o heterodímeros para inducir las vías de señalización dependientes o independientes de MyD88.

Receptores tipo RIG-I

Los receptores tipo RIG-I (RLRs) se encuentran en el citosol de las células, desempeñan un papel crucial en la respuesta innata contra las infecciones virales ya que detectan principalmente ARN viral. La familia de receptores RLRs está compuesta por tres proteínas: (i) gen inducible por ácido retinoico (RIG-I) (ii) factor 5 asociado a la diferenciación del melanoma (MDA5) y, por último, (iii) la proteína “laboratorio de genética y fisiología 2” (LGP2). Los tres miembros tienen un dominio central helicasa/ATPasa y un dominio C-terminal de unión a ARN. RIG-I y MDA5 poseen además dos dominios en tándem en el extremo N-terminal de activación y reclutamiento de caspasas (CARD) que sirven para la transducción de la señal. La pérdida de los dominios CARD en LGP2 sugiere que pueda tener otra función, de hecho, numerosos estudios muestran que regula a RIG-I y MAD5 (Loo & Gale, 2011; Yoneyama et al., 2005).

Los RLRs reconocen principalmente ARN viral con características específicas, como grupos difosfato y trifosfato en su extremo 5' y estructuras de RNA bicatenario (Hornung et al., 2006; Yoneyama et al., 2004). Una vez que RIG-I y MDA5 se unen a estos ARN, se activan y sufren un cambio conformacional exponiendo sus dominios CARD, promoviendo interacciones homotípicas CARD-CARD con la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS), una proteína adaptadora que contiene un dominio CARD y un dominio transmembrana. Esta proteína transmite la señal a la quinasa 1 de unión a TANK (TBK1) y la quinasa de I κ B (IKK ϵ). Estos a su vez activan IRF3 e IRF7, que junto con el factor de transcripción NF- κ B, inducen la expresión de IFN tipo I y otros genes. La actividad de los RLRs está fuertemente regulada por numerosos mecanismos como son las modificaciones postraduccionales (PTMs), interacciones con ARN y proteínas endógenas, y la autofagia (Onomoto et al., 2021; Rehwinkel & Gack, 2020).

Receptores de lectina tipo C

Los receptores de lectina tipo C (CLRs) se expresan principalmente en la superficie de células dendríticas, macrófagos y algunos tipos de células T, y participan tanto en respuestas innatas como adaptativas. Estos comprenden una gran familia de receptores que se unen a carbohidratos presentes en patógenos, como β -glucanos, glicoproteínas y glicolípidos. Los receptores CLRs se caracterizan por tener uno o más dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD) dependientes de calcio, o por poseer dominios similares a lectinas de tipo C (CTLDs) que no necesariamente reconocen ligandos de carbohidratos (Sancho & Reis e Sousa, 2012; Speakman et al., 2020). Dentro de esta familia encontramos numerosos miembros como: Dectina-1, Dectina-2, lectina tipo C inducible en macrófagos (Mincle), y el receptor de manosa de macrófagos (MMR) (Saijo et al., 2007, 2010).

Los receptores CLR son esenciales en el reconocimiento de hongos y el control de las infecciones fúngicas, además promueven la diferenciación de los linfocitos T a Th1 y Th17, ambos esenciales para estas infecciones, y participan también en la presentación de antígeno, la expresión de moléculas coestimuladoras y la secreción de citoquinas (Speakman et al., 2020).

Receptores de tipo NOD

Los receptores tipo NOD (NLRs) reconocen una amplia gama de señales PAMPs y DAMPs en el citoplasma de células dendríticas, macrófagos, linfocitos y células no

inmunitarias como las células epiteliales. El genoma humano contiene 23 miembros de la familia NLR mientras que el de ratón contiene 34. Estas proteínas se componen de tres dominios (i) un dominio C-terminal LRR responsable de la detección de señales, (ii) un dominio central NACHT (presente en las proteínas NAIP, CIITA, HET-E y TP1) que media la auto-oligomerización y la activación dependiente de ATP, y (iii) un dominio N-terminal efector responsable de interacciones proteína-proteína. Este último determina las cinco subfamilias de receptores NLR, que son: (i) NLRA, el cual tiene un dominio de activación ácida, en este grupo encontramos a CIITA (transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad II); (ii) NLRB, se caracteriza por tener un dominio BIR (repetición Baculoviral IAP), se compone solo por NAIP (proteína inhibidora de apoptosis neuronal); (iii) NLRC, presenta un dominio CARD, y se compone por 5 miembros (NOD1, NOD2, NLRC3-5); (iv) NLRP, tiene un dominio pirina (PYD), es la subfamilia más extensa, cuenta con 14 miembros (NLRP1-14); (v) NLRX, tiene un dominio de secuencia dirigida a mitocondrias (MTS), y está formado por NLRX1 (Chen et al., 2021; Girardin et al., 2003; Kanneganti, 2010; Martinon et al., 2002).

Por lo general, estos receptores detectan señales PAMPs o DAMPs gracias al dominio LRR, lo que promueve un cambio conformacional y la oligomerización a través del dominio NACHT, exponiendo así su dominio N-terminal, por el cual se une a otras proteínas que impulsan la transmisión de la señal. En ocasiones, el cambio conformacional es inducido por otras proteínas o por señales intracelulares inducidas por los PAMPs y DAMPs.

Los receptores NLR dan lugar a diferentes vías de señalización, como es el caso de NOD1 o NOD2. Estos reconocen peptidoglicanos de las membranas de bacterias en el citoplasma. Tras la unión específica al ligando, NOD1-2 oligomeriza y recluta a la proteína RIPK2 (serina/treonina-proteína quinasa 2 que interactúa con el receptor) mediante uniones homotípicas CARD-CARD formando un complejo. RIPK2 induce la activación de las vías de señalización de NF- κ B y la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) promoviendo así la transcripción de genes proinflamatorios, y la autofagia (Girardin, et al., 2003; Girardin, et al., 2003).

Por otro lado, los receptores NLR también pueden transducir la señal mediante la formación de inflamasomas, estos son grandes complejos proteicos que producen la activación de caspasa-1, la cual conduce al procesamiento y liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-18. En la familia NLR, numerosos miembros participan en la formación de inflamasomas, como NLRC4, NLRP1, NLRP3 y NLRP6. Se han descrito otros miembros que pueden formar inflamasomas: NLRP2, NLRP7, NLRP10 y

NLRP12, aunque su mecanismo no está del todo claro (Chen et al., 2021; Martinon et al., 2002; Próchnicki et al., 2023).

Más recientemente, se ha identificado un subgrupo NLR que regula negativamente la inflamación, donde se incluye a: NLRP12, NLRX1 y NLRC3, estos controlan la señalización de NF- κ B en múltiples niveles. NLRX1 y NLRC3 actúan de manera similar, ambos interactúan e inhiben TRAF6 atenuando la señalización de NF- κ B, mientras que NLRP12 modula la fosforilación de IRAK-1 e interacciona con TRAF3 y la quinasa inducible de NF- κ B (NIK) (Allen et al., 2012; Gültekin et al., 2014; Xia et al., 2011).

Receptores de tipo AIM2

Los receptores AIM2 (ALRs) constituyen la inclusión más reciente al grupo de PRRs, estos comparten similitudes tanto estructurales como funcionales con el receptor ausente en melanoma 2 (AIM2). Los ALRs se localizan en el citoplasma celular y detectan principalmente el ADN de origen bacteriano o viral, aunque también pueden reconocer ADN del hospedador en el citosol. El número de estos receptores varía significativamente según la especie, por ejemplo, en humanos hay 4 mientras que en ratón hay 13 (Cridland et al., 2012).

El miembro más caracterizado de este grupo es AIM2, y consta de un dominio C-terminal HIN (nuclear hematopoyético inducible por interferón), el cual reconoce al ADN bicatenario, y de un dominio PYD que promueve la formación del inflamasoma. Tras la activación, se produce la liberación de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18 y la activación de la ruta de señalización NF- κ B (Angosto-Bazarra et al., 2021; Hornung et al., 2009).

1.6 Vía de señalización NF- κ B

Los PRRs inducen la activación de diferentes cascadas de señalización que culminan en la transcripción de genes específicos y la propagación de la señal, debido a su importancia en esta Tesis se explicará más en detalle la vía NF- κ B.

NF- κ B es un factor de transcripción que está implicado en múltiples eventos asociados con las respuestas innatas y adaptativas. Además, cumple una función esencial en la respuesta inflamatoria, ya que induce la expresión de numerosos genes proinflamatorios, entre los que se incluyen quimioquinas y citoquinas (como IL-1 β , IL-6 o TNF- α), y está involucrado en la regulación de los inflamasomas. De igual modo, este factor regula otros procesos como son la proliferación, la supervivencia, y la

diferenciación de las células inmunitarias innatas y las células T (Liu et al., 2017; Pflug & Sitcheran, 2020; Qiao et al., 2012).

NF- κ B representa a una familia de factores de transcripción que en mamíferos está compuesta por cinco miembros estructuralmente relacionados: RelA (p65), RelB, c-Rel, y los precursores NF- κ B1 (p105/p50) y NF- κ B2 (p100/p52), los cuales forman homo o heterodímeros, se translocan al núcleo y median la transcripción de genes diana mediante su unión al ADN. La activación de NF- κ B se puede producir a través de dos vías de señalización, denominadas vía de señalización canónica y no canónica (Liu et al., 2017; Pflug & Sitcheran, 2020).

En la vía canónica se observa que en condiciones normales NF- κ B está inactivo, ya que está secuestrado por miembros de la familia I κ B, siendo uno de ellos I κ B α . Tras una señal, como son los estímulos que promueven la activación de receptores de TNF (TNFR), de TLRs, de receptores de interleuquinas y de los receptores de las células T, se produce la fosforilación y activación del complejo de quinasa I κ B (IKK) por la acción de varias quinasas. Este complejo se compone de 2 subunidades catalíticas (IKK α e IKK β) y la subunidad reguladora (IKK γ , también conocida como NEMO). Una vez activado, IKK γ fosforila la subunidad IKK β , y esta a su vez fosforila I κ B α , la cual es ubiquitinada y degradada por el proteosoma, liberando así a NF- κ B. Finalmente, el NF- κ B libre se transloca al núcleo y se une al ADN induciendo la transcripción de los genes proinflamatorios (Qiao et al., 2012; Verstak et al., 2009; Wu et al., 2006) (**Figura 2**).

Por otro lado, en la activación no canónica la quinasa NIK juega un gran papel, ya que activa y fosforila a IKK α , la cual a su vez fosforila la región p100 de NF- κ B2, promoviendo su degradación por el proteosoma y liberando así a p52 que se une a RelB. Este complejo se transloca al núcleo y regula la transcripción de genes (Vaira et al., 2008).

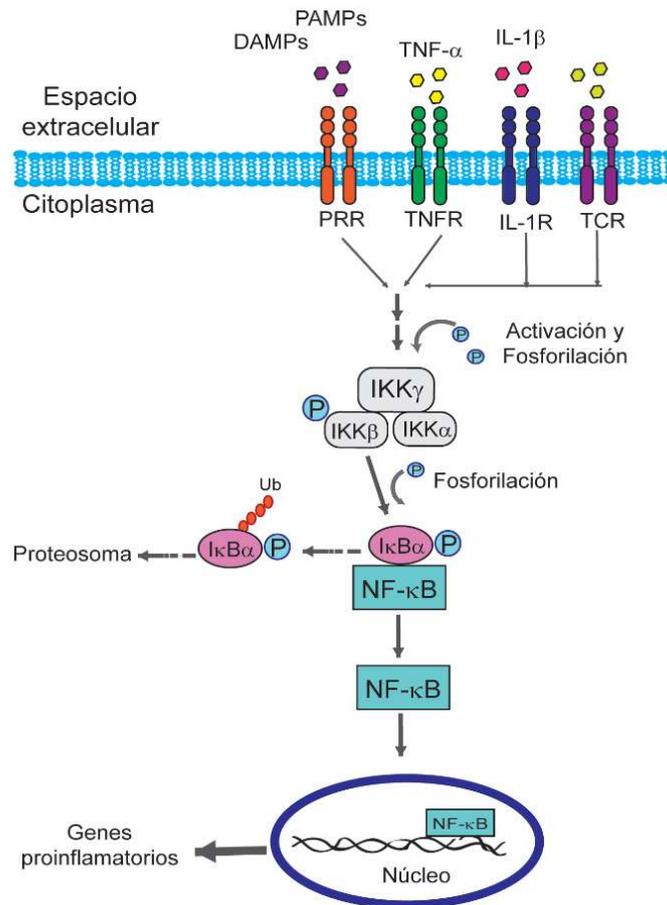


Figura 2. Vía canónica de señalización de NF-κB. El reconocimiento de señales PAMPs o DAMPs por numerosos receptores, produce la activación del complejo IKK γ y la consecuente fosforilación de IκB α , liberando así NF-κB que se transloca al núcleo y promueve la señal.

1.7 Citoquinas

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular que se liberan de las células en respuesta a diferentes estímulos, estas desempeñan un papel crucial en la comunicación celular y en la regulación de numerosos procesos del sistema inmunitario. El listado de citoquinas hasta la fecha es extenso, creando así controversia sobre cómo deben estar clasificadas. Una forma de agruparlas es dependiendo del tipo de receptor al que se unen, incluyendo la familia de receptores de citoquinas tipo 1 y tipo 2, la superfamilia de receptores de TNF, la familia de receptores de IL-1, la familia de receptores de IL-17, la familia de TGF- β y los receptores de quimioquinas (revisado en (O'Shea et al., 2019)).

Durante la inflamación se produce la liberación de un gran número de citoquinas proinflamatorias, sin embargo, una producción desmedida puede desencadenar numerosas patologías. La fase de resolución de la inflamación es crucial, y se

caracteriza por la liberación de citoquinas antiinflamatorias. A continuación, se discutirá más en detalle las citoquinas más relevantes para esta Tesis.

TNF- α

La citoquina TNF- α es un miembro de la superfamilia TNF, la cual se compone por 19 ligandos y 29 receptores. Esta es una citoquina proinflamatoria que tiene efectos pleiotrópicos y se produce en macrófagos, células T y células NK, aunque aparece en otros tipos celulares como fibroblastos, células endoteliales o DCs (Idriss & Naismith, 2000; Zelová & Hošek, 2013). La estimulación de estas células con LPS u otros ligandos de TLR, produce la activación de NF- κ B y un aumento de la expresión del gen *TNF* (Verstak et al., 2009). Por otro lado, esta citoquina se puede encontrar de forma soluble o transmembrana, y se une a dos receptores: TNFR1, el cual origina respuestas citotóxicas y proinflamatorias, o TNFR2, el cual media la activación, migración o proliferación celular (Hsu et al., 1995; Rothe et al., 1995). Por lo general, la producción de TNF- α está controlada, sin embargo, una secreción excesiva puede ser perjudicial y provocar enfermedades inflamatorias crónicas o autoinmunes como artritis reumatoide, o la psoriasis, también se ha visto involucrada en enfermedades cardíacas, renales y cáncer. Por este motivo, se han desarrollado numerosos tratamientos que bloquean la acción de TNF- α , como los anticuerpos monoclonales Infliximab, Etanercept, o Adalimumab (Brennan et al., 1989; Jang et al., 2021; Zelová & Hošek, 2013).

IL-6

IL-6 es una citoquina pleiotrópica involucrada en la inflamación, la hematopoyesis, el metabolismo óseo y el desarrollo embrionario. Esta se sintetiza en varios tipos celulares como monocitos, células T, fibroblastos y células endoteliales y su expresión se induce por una variedad de estímulos, incluyendo los ligandos de TLR, IL-1, TNF- α o ROS, los cuales desencadenan la activación de NF- κ B (Libermann & Baltimore, 1990; Shimizu et al., 1990). Esta citoquina ejerce su función uniéndose al receptor de IL-6 (IL-6R) transmembrana o a su versión soluble, el cual dimeriza con la proteína transmembrana gp130 promoviendo la señal, sin embargo, la unión de las formas solubles de IL-6R y gp30 forman un complejo que neutraliza IL-6 (Aparicio-Siegmund et al., 2019; Nechemia-Arbely et al., 2008).

Por otro lado, IL-6 es un mediador clave de la respuesta de fase aguda, también promueve la activación y proliferación de células inmunitarias como la diferenciación de las células Th17, y la producción de anticuerpos por parte de células B. Los niveles séricos de IL-6 aumentan durante infecciones y en muchas enfermedades inflamatorias

como la diabetes tipo 2, cáncer y enfermedades autoinmunes, por esta razón se han desarrollado terapias para bloquear IL-6, como el Tocilizumab (Aparicio-Siegmund et al., 2019; Hirano, 2021; Puchner & Blüml, 2014).

Familia de citoquinas IL-1

La historia de la familia IL-1 comienza con el descubrimiento de sus dos primeros miembros, IL-1 α e IL-1 β (Dinarello et al., 1974). Esta familia es crucial en la respuesta inmunitaria innata y la inflamación, aunque también puede participar en la respuesta inmunitaria adaptativa. Se compone de 11 citoquinas y 10 receptores IL-1 (IL-1R), los cuales contienen un dominio citoplasmático TIR similar al que se encuentra en los receptores TLR.

Esta familia de citoquinas se divide a su vez en tres subfamilias según el receptor al que se unan: (i) la subfamilia IL-1 comprende a IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra e IL-33; (ii) la subfamilia IL-18 la forman IL-18 e IL-37; (iii) y la subfamilia IL-36 comprende IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-36Ra e IL-38. Por lo general, las citoquinas aparecen en el citoplasma como precursores inactivos y requieren de un procesamiento proteolítico para ser biológicamente activas (Afonina et al., 2011; Hazuda et al., 1991). Además, tienen una secuencia consenso conservada de tres aminoácidos AXD (con la excepción de IL-1Ra), donde A es un aminoácido alifático, X es cualquier aminoácido y D es ácido aspártico; esta secuencia se ubica 9 aminoácidos después del sitio de escisión (Towne et al., 2011). Las citoquinas IL-1 tienen diferentes funciones, pueden actuar como agonistas del receptor con actividad proinflamatoria (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36); como antagonistas de los receptores con actividad antiinflamatoria (IL-1Ra, IL-36Ra e IL-38) o como citoquinas antiinflamatorias (IL-37) (Mantovani et al., 2019).

Los receptores IL-1R (IL-1R1/10) tienen generalmente 1 o 3 dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina y un dominio de señalización intracelular TIR. Tras la unión del ligando, el receptor dimeriza con un correceptor por sus dominios TIR y recluta a MyD88 que se une a las proteínas quinasas IRAK y TRAF6 (Cao et al., 1996; Muzio et al., 1997), promoviendo la activación de varios factores de transcripción, que incluyen a NF- κ B, la proteína activadora-1, MAPK, y factores reguladores del interferón (Dinarello, 2018).

Las citoquinas IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra se unen al receptor IL-1R1 con diferentes afinidades, al unirse IL-1 β o IL-1 α ocurre un cambio conformacional en IL-1R1, el cual se une con el correceptor IL-1R3, formando un complejo capaz de reclutar a MyD88 que promueve la activación de NF- κ B y la expresión de genes proinflamatorios. Sin embargo,

cuando IL-1Ra se une a IL-1R1, se produce un cambio conformacional diferente impidiendo la unión a IL-1R3 y evitando así la transducción de la señal (Højen et al., 2019; Wang et al., 2010). La citoquina IL-1 β también puede unirse al receptor IL-1R2, esta proteína carece de dominio TIR; por tanto, cuando el ligando se une a IL-1R2 recluta a IL-1R3, pero en este caso no hay transducción de la señal (Fields et al., 2019). También existen versiones solubles de IL-1R2 e IL-1R3, que surgen tras una escisión proteolítica, estas se unen específicamente a IL-1 β e IL-1 α y las neutralizan (Smith et al., 2003; Zheng et al., 2013). Por otro lado, la citoquina IL-18 se une al receptor IL-1R5 y al correceptor IL-1R7 promoviendo vías de señalización proinflamatorias. La proteína de unión a IL-18 (IL-18BP) se une a IL-1R5 impidiendo la interacción con IL-18 y neutralizando así su actividad (Krumm et al., 2008; Novick et al., 1999).

IL-1 α

La citoquina IL-1 α se expresa de forma constitutiva en numerosos tipo celulares como las células mesenquimales, queratinocitos, células epiteliales, células del tracto gastrointestinal y en astrocitos cerebrales. Las células mieloides también producen IL-1 α , pero no es constitutiva. La forma precursora de IL-1 α (pro-IL-1 α) es activa y tiene doble función, puede liberarse tras la muerte celular uniéndose a IL-1R1 iniciando así una señal proinflamatoria, o intracelularmente, la pro-IL-1 α puede desplazarse al núcleo, actuando como un factor de transcripción. En las células apoptóticas, IL-1 α permanece fuertemente unida al ADN, mientras que, en las necróticas permanece en el citosol y se libera al espacio extracelular como un DAMP, desencadenando la inflamación (Cohen et al., 2010, 2015; Kurt-Jones et al., 1985), aunque también puede liberarse por piroptosis (Aizawa et al., 2020). La forma precursora de IL-1 α puede sufrir una maduración proteolítica por varias proteasas, como calpaína, granzima B, elastasa, quimasa y trombina, aumentando así su actividad y su liberación de las células (Afonina et al., 2011; Burzynski et al., 2019; Carruth et al., 1991; Tsuchiya et al., 2021). Esta citoquina está involucrada en la actividad antiviral del IFN- γ (Hurgin et al., 2007) y sirve como iniciador del proceso inflamatorio desencadenando la inflamación local, la cual conlleva a una respuesta infamatoria sistémica mediada por IL-1 β (Rider et al., 2011).

IL-1 β

La citoquina IL-1 β solo se produce en las células mieloides, y no se expresa de manera constitutiva. La transcripción de IL-1 β es un factor limitante para su producción, ya que esta ocurre tras la activación de receptores TLR mediante agentes patógenos, o mediante la señalización de las citoquinas TNF- α , IL-18, IL-1 α y la propia IL-1 β

(Dinarello, 2018). Dicha citoquina, se encuentra en el citoplasma como un precursor (pro-IL-1 β) inactivo, el cual requiere un procesamiento proteolítico por la caspasa-1 para obtener la forma madura y activa, aunque también se ha descrito que catepsina D y caspasa-8 pueden procesarla (Bossaller et al., 2012; Mizushima et al., 2019; Thornberry et al., 1992). Esta citoquina se libera de las células por distintas rutas no-convencionales como exocitosis de lisosomas, por microvesículas desprendidas de la membrana plasmática, autofagia o piroptosis. Además, está relacionada con el desarrollo de un gran número de patologías inflamatorias, como las enfermedades autoinflamatorias del síndrome periódico asociado a criopirina (CAPS) o la fiebre mediterránea familiar (FMF), o también en enfermedades infecciosas como la sepsis (Agostini et al., 2004; Chae et al., 2011; Martínez-García et al., 2019).

IL-18

La citoquina IL-18, a diferencia de IL-1 β , se produce constitutivamente en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas, incluidos monocitos, macrófagos, queratinocitos y células mesenquimales. Como ocurre con IL-1 β , IL-18 se sintetiza como un precursor inactivo (pro-IL-18) en el citoplasma, y requiere un procesamiento proteolítico por parte de la caspasa-1 para obtener una citoquina biológicamente activa (Dinarello et al., 2013). Se han descrito otras proteasas capaces de escindir IL-18, como la caspasa-8 tras la activación del receptor Fas (Bossaller et al., 2012), la proteinasa 3 producida principalmente por neutrófilos (Sugawara et al., 2001), las quimasas (Omoto et al., 2006) y la granzima B (Omoto et al., 2010). IL-18 es una potente citoquina proinflamatoria con acción pleiotrópica según su entorno, de manera que en presencia de IL-12 e IL-15 es capaz de inducir la producción de IFN- γ en células Th1, macrófagos y células NK (Munder et al., 1998; Yoshimoto et al., 1998), mientras que en presencia de IL-3, induce IL-4 e IL-13 en basófilos y mastocitos (Yoshimoto et al., 1999). Además, está relacionada con numerosas patologías inflamatorias y autoinmunes, ya que se han encontrado niveles altos de IL-18 en pacientes con lupus eritematoso sistémico (Novick et al., 2010), sepsis, el síndrome CAPS (Brydges et al., 2013) o el síndrome de activación macrofágica, entre otros.

IL-1Ra

IL-1Ra es un antagonista del receptor IL-1R1, y como tal, actúa como un inhibidor competitivo bloqueando la actividad de IL-1 α e IL-1 β . Fue la primera citoquina natural descrita que funciona como un antagonista específico del receptor, se descubrió por primera vez en sobrenadantes de monocitos humanos (Arend et al., 1985) y en orina de

niños con artritis juvenil sistémica crónica (Prieur et al., 1987). Esta citoquina presenta 4 isoformas, de las cuales solo una se secreta, y el resto son intracelulares, aunque estas pueden liberarse tras muerte o daño celular y unirse a IL-1R1. IL-1Ra tiene un gran papel en la regulación de los efectos de IL-1, de hecho, en la enfermedad de deficiencia del antagonista del receptor de la IL-1 (DIRA) los recién nacidos desarrollan una inflamación multisistémica grave debido a la actividad descontrolada de IL-1 α e IL-1 β (Aksentijevich et al., 2009). Además, se ha comprobado que ratones deficientes para IL-1Ra, muestran respuestas inflamatorias excesivas. Por otro lado, la proteína recombinante de IL-1Ra, anakinra, se usa para el tratamiento de numerosas enfermedades (Cavalli & Dinarello, 2018) como artritis reumatoide, gota y pericarditis recurrente idiopática, o enfermedades autoinflamatorias (Rynne et al., 2006).

2. Los inflamomas

El concepto de inflamoma fue descrito por primera vez hace 20 años de la mano de Tschopp (Martinon et al., 2002). Los inflamomas son complejos multiproteicos citosólicos que desempeñan un papel importante en la defensa del huésped modulando la respuesta inflamatoria. Estos complejos están diseñados para activar caspasas inflamatorias como la caspasa-1, la cual escinde proteolíticamente las citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18 a su forma madura, provocando una forma rápida de muerte celular llamada piroptosis. Se han descrito diversos inflamomas, los cuales constan principalmente de un sensor, un adaptador y un componente efector. El ensamblaje se inicia cuando el sensor del inflamoma detecta señales PAMPs, DAMPs, HAMPs o los cambios intracelulares que inducen estas señales (Angosto-Bazarra et al., 2021).

2.1 Componentes de los inflamomas

Los componentes del inflamoma se expresan tanto en células inmunitarias como no inmunitarias favoreciendo así la detección de patógenos y señales de peligro. La identidad del complejo de inflamoma se designa por el sensor que se activa, tras esto, la mayoría de los sensores reclutan una proteína adaptadora denominada proteína asociada a la apoptosis con dominio CARD o ASC, y la proteína efectora cisteín-proteasa caspasa-1. El sensor activado junto a ASC y caspasa-1 forman un inflamoma funcional.

Las proteínas que actúan como sensores de inflamoma pertenecen principalmente a la familia de los receptores NLRs, como NLRP1, NLRP3, NLRP6, y NLRC4. Recientemente se ha demostrado que otros NLRs también son capaces de

formar inflamasomas como NLRP7, NLRP9, NLRP10 y NLRP12 (Próchnicki et al., 2023; Radian et al., 2015). Dentro del grupo de inflamasomas que no pertenecen a la familia de sensores NLR, encontramos a los receptores ALR y más en concreto su componente AIM2. Este, a diferencia de las proteínas NLR, no contiene un dominio NACHT que permita la oligomerización. En su lugar, AIM2 utiliza el ADN que se une a su dominio HIN como una plataforma de oligomerización, eliminando las interacciones autoinhibitorias entre los dominios HIN y PYD (Hornung et al., 2009). Otros sensores que dan lugar a la formación de inflamasomas son pirina y CARD8 (Latz et al., 2013).

La proteína ASC actúa como proteína adaptadora y vincula los sensores de inflamasoma activados a la molécula efectora pro-caspasa-1, así como amplifica la activación de la propia caspasa-1. ASC se codifica por el gen *PYCARD*, y se compone de dos dominios conservados, un dominio N-terminal PYD y un dominio C-terminal CARD, los cuales permiten uniones homotípicas (Dick et al., 2016; Sborgi et al., 2015). ASC se expresa constitutivamente en numerosos tipos celulares, aunque su expresión puede ser modulada, y se localiza en el citosol y núcleo celular. Tras la activación del sensor por diferentes señales PAMPs y DAMPs, se produce el reclutamiento de ASC. En general, el dominio PYD de ASC se une al dominio PYD de los sensores NLRP mediante interacciones homotípicas PYD-PYD (Hoss et al., 2017). Esto conduce a la formación de filamentos helicoidales, mediante el reclutamiento priónico de nuevas moléculas de ASC, dando lugar a oligómeros de ASC (Dick et al., 2016; Sborgi et al., 2015). Los dominios CARD libres de los filamentos de ASC reclutan a la proteína efectora pro-caspasa-1 mediante su dominio CARD dando lugar a uniones homotípicas CARD-CARD, lo que origina la activación autocatalítica de caspasa-1 y la consecuente liberación de citoquinas proinflamatorias (Boucher et al., 2018). Tras la piroptosis, los oligómeros de ASC también se liberan de las células propagando la señal, ya que pueden ser fagocitados por los macrófagos y formar nuevos inflamasomas (Baroja-Mazo et al., 2014; Franklin et al., 2014).

Los sensores NLRC4, NLRP1 y CARD8 son una excepción a este proceso, ya que pueden reclutar directamente a pro-caspasa-1, a través de sus dominios CARD. Sin embargo, se ha demostrado que el reclutamiento de ASC en NLRC4 aumenta la activación de caspasa-1 (Ball et al., 2020; Dick et al., 2016).

Por otra parte, la proteína efectora principal del inflamasoma es caspasa-1 (Boucher et al., 2018; Martinon et al., 2002), sin embargo, se han descrito otras caspasas inflamatorias efectoras como la caspasa-11 en ratón (Kayagaki et al., 2015) y sus homólogos en humano las caspasas 4 y 5 (Viganò et al., 2015). Todas ellas se

expresan como zimógenos monoméricos y se activan dentro de los inflamasomas. Constan de un dominio N-terminal CARD y un dominio C-terminal compuesto por dos subunidades catalíticas, una grande (20 kDa) y una pequeña (10 kDa) (Ross et al., 2022; Van Opendenbosch & Lamkanfi, 2019).

Como se mencionó previamente, tras la formación del oligómero de ASC, se reclutan numerosos monómeros de pro-caspasa-1. Estos experimentan procesos de dimerización y autoprosesamiento, ambos inducidos por proximidad, lo que da lugar a la formación de dos especies de dímeros predominantes, una especie p46 de longitud completa y una especie transitoria p33/p10. En esta última se produce otro autoprosesamiento adicional, el cual origina el tetrámero compuesto por dos subunidades p20 y dos subunidades p10, conocido como p20/p10. Esta es la forma activa que se libera del inflamasoma y desempeña un papel catalítico en la cascada de señalización inflamatoria. Sin embargo, con el tiempo, el tetrámero p20/p10, tiende a volverse inestable, perdiendo así su actividad catalítica. Este proceso de inestabilidad conduce a la regulación y la limitación de la respuesta inflamatoria mediada por la caspasa-1 (Boucher et al., 2018). También se han descrito procesos similares de activación para las caspasas-11, 4 y 5 (Ross et al., 2022).

2.2 Mecanismos efectores de los inflamasomas

Una vez que la caspasa-1 está activa, desencadena el procesamiento proteolítico de varios sustratos. Por un lado, escinde las citoquinas proinflamatorias pro-IL-1 β y pro-IL-18 a sus respectivas formas maduras, las cuales están involucradas en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Y, por otra parte, también procesa a GSDMD induciendo la muerte celular por piroptosis (Shi et al., 2015).

El término piroptosis consta de "piro" (fuego) y "ptosis" (muerte celular programada) y fue descrito en 2001. Este es un tipo de necrosis programada mediada por las proteínas de la familia de las gasderminas (GSDM), y se caracteriza por producir hinchazón celular, ruptura de membranas y liberación del contenido celular (Broz et al., 2020).

La familia GSDM se compone de 6 miembros en humanos: GSDMA, GSDMB, GSDMC, GSDMD, GSDME y PJVK. Se ha comprobado que todos esos miembros, excepto PJVK, tienen dos dominios: un dominio N-terminal y un dominio C-terminal unidos por un péptido flexible. Tras la activación, estas proteínas desencadenan la piroptosis mediante su dominio N-terminal, no obstante, la escisión proteolítica que

activa estos dominios es realizada por distintas proteasas (Angosto-Bazarra, Alarcón-Vila, et al., 2022; Dai et al., 2023).

El miembro GSDMD es el más estudiado, y es sustrato directo de las caspasas inflamatorias (caspasa 1, 4, 5 y 11), aunque, también se ha descrito que la caspasa-8 puede escindirla (Liu et al., 2016; Shi et al., 2015). Esta proteína contiene un dominio N-terminal (GSDMD^{NT}) formador de poros y un dominio C-terminal represor (GSDMD^{CT}). En condiciones normales, GSDMD^{NT} se une a GSDMD^{CT} a través de interacciones intramoleculares y la proteína permanece autoinhibida. Una vez que las caspasas se activan, escinden la proteína en una secuencia consenso dentro de la región de unión (FLTD en humanos y LLSD en ratón) liberando al dominio GSDMD^{NT} (p30) que dará lugar a la posterior formación de poros de membrana (Ding et al., 2016; Wang et al., 2020). Tras la liberación, el fragmento GSDMD^{NT} se une directamente a lípidos de membrana cargados negativamente, como son los fosfatos de fosfatidilinositol, fosfatidilserina y cardiolipina, y se inserta en la membrana formando poros con un diámetro interior de 10-20 nm por el que se libera las citoquinas IL-1 β e IL-18 maduras (Ding et al., 2016; He et al., 2015; Liu et al., 2016; Sborgi et al., 2016). Tras la permeabilización de la membrana y la consecuente presión osmótica, las células sufren piroptosis liberando el contenido intracelular, donde destacan las proteínas HMGB1, lactato deshidrogenasa (LDH), galectina-3, IL-1 α y los oligómeros de ASC que propagan la señal inflamatoria (Phulphagar et al., 2021). La formación de poros de GSDMD no siempre conduce a piroptosis ya que este daño puede repararse por el complejo de clasificación endosomal necesario para el transporte III (ESCRT-III) (Rühl et al., 2018).

Recientemente se ha descrito que la proteína transmembrana Ninjurin-1 (NINJ1) es esencial en la piroptosis ya que media la ruptura de la membrana plasmática, tras la formación del poro de GSDMD (Kayagaki et al., 2021).

2.3 Tipos de inflamomas

Los distintos sensores dan lugar a una amplia gama de inflamomas entre los cuales NLRP3 es uno de lo más estudiados, (este se abordará con más detalle en el apartado 3). A continuación, se discutirán otros inflamomas relevantes.

NLRP1

NLRP1 fue el primer inflamoma que se describió, en humanos consta de varios dominios: un dominio N-terminal PYD, seguido de los dominios centrales NACHT, LRR y función para encontrar (FIIND), y un dominio CARD C-terminal (Martinon et al., 2002). Sin embargo, en ratón se encuentran tres isoformas: NLRP1A, NLRP1B y NLRP1C las

cuales carecen del dominio PYD. Se ha demostrado que la toxina letal del ántrax producida por *Bacillus anthracis* es capaz de activar NLRP1B (Boyden & Dietrich, 2006). Esta toxina produce una escisión en el extremo N-terminal y una autoproteólisis en la región FIIND, de manera que el extremo C-terminal queda libre para la unión con caspasa-1 y la formación del inflamasoma (Chui et al., 2019; Sandstrom et al., 2019). Además, recientemente se ha descrito que NLRP1 humano se expresa principalmente en células epiteliales y puede activarse en respuesta a varias proteasas virales que inducen la degradación del dominio N-terminal y liberación del dominio CARD, que oligomeriza y se une a ASC para activar a caspasa-1 (Tsu et al., 2021). Por otro lado, también se ha descrito que NLRP1 humano se activa por la radiación ultravioleta B, la cual induce la respuesta al estrés ribotóxica mediada por la quinasa ZAK α . Esta enzima junto a p38, fosforilan la región de unión de NLRP1, induciendo la activación del inflamasoma (Robinson et al., 2022).

NLRC4

NLRC4 contiene tres dominios funcionales: LRR, NACHT y CARD, este sensor detecta componentes bacterianos, como la flagelina bacteriana y las proteínas del sistema de secreción tipo III (SST3) (Zhao et al., 2011). La interacción de NLRC4 con sus ligandos no es directa, en su lugar, las proteínas NAIP reconocen estos ligandos y se asocian con NLRC4. Tras la unión, se produce un cambio conformacional en NLRC4 que induce la formación del inflamasoma junto a ASC y caspasa-1. En ratones, se expresan cuatro proteínas NAIP, NAIP1 y NAIP2 reconocen proteínas del SST3, mientras que NAIP5 y NAIP6 reconocen la flagelina bacteriana. A diferencia de los ratones, en humanos solo se expresa una proteína NAIP (Rayamajhi et al., 2013; Yang et al., 2018). Por otro lado, NLRC4 puede unirse directamente mediante su dominio CARD a caspasa-1 provocando la piroptosis, sin embargo, la liberación de las citoquinas IL-18 e IL-1 β es dependiente de la formación de oligómeros de ASC (Angosto-Bazarra et al., 2021; Dick et al., 2016; Mariathasan et al., 2004).

NLRP6

NLRP6 contiene tres dominios funcionales: LRR, NACHT y PYD, compartiendo una gran homología con NLRP3. Este presenta funciones dependientes e independientes de los inflasomas, y se encarga de regular la homeostasis y la inflamación intestinal. NLRP6 detecta numerosos estímulos como LPS, el ácido lipoteicoico, el ARN vírico y la microbiota comensal, sin embargo, hay otros compuestos que lo modulan, como la taurina que promueve la formación del inflamasoma, mientras que la espermina y la histamina la inhiben (Angosto-Bazarra et al., 2022; Elinav et al.,

2011; Wang et al., 2015). Además, se ha descrito que el ácido lipoteicoico se une a los dominios LRR de NLRP6 promoviendo la formación del inflamasoma no canónico, induciendo la activación de la caspasa-11 en lugar de la caspasa-1 (Hara et al., 2018). En cuanto a la función independiente de inflamasoma, NLRP6 muestra un papel esencial en la inmunidad antiviral ya que reconoce ARN bicatenario vírico induciendo la vía de señalización de IFN. Recientemente se ha descrito que tras la activación con ARN bicatenario y ácido lipoteicoico de NLRP6, se produce una separación de fases líquido-líquido, donde el reclutamiento de ASC solidifica estos condensados y promueve la unión de caspasa-1 (Shen et al., 2021).

Pirina

El inflamasoma pirina desempeña un papel fundamental en la defensa contra infecciones bacterianas. La proteína pirina humana consta de múltiples dominios, incluyendo PYD, bZIP, B-Box, hélice superenrollada (CC) y B30.2, mientras que la pirina de ratón carece del dominio C-terminal B30.2 (Xu et al., 2014). Esta proteína detecta la inactivación de la enzima RhoA GTPasa por toxinas bacterianas, como la toxina B de *Clostridium difficile* (TcdB). En condiciones normales RhoA, activa las quinasas PKN1 y PKN2, las cuales fosforilan los residuos Ser242 y Ser208 de pirina, esto permite la unión de la proteína 14-3-3, que mantiene a pirina en un estado inactivo (Gao et al., 2016; Masters et al., 2016). La exposición a TcdB disminuye la actividad de RhoA y conduce a la desfosforilación de la pirina, lo que resulta en su separación de la proteína 14-3-3. Esta disociación permite que la pirina reclute la proteína ASC, dando lugar a la formación del inflamasoma. La modificación descrita de RhoA no se limita a TcdB, ya que otras toxinas bacterianas, como la toxina C3 (*Clostridium botulinum*), la toxina pertussis (*Bordetella pertussis*), así como la toxina TecA (*Burkholderia cenocepacia*) pueden afectar la actividad de esta GTPasa y activar pirina (Schnappauf et al., 2019).

3. Inflamasoma NLRP3

El inflamasoma NLRP3 (también denominado criopirina) es el más estudiado hasta la fecha, debido a que se activa en respuesta a una gran variedad de estímulos y a que participa de forma importante en la respuesta inflamatoria asociada a distintas patologías. Por tanto, NLRP3 está involucrado en el desarrollo de numerosas enfermedades, incluyendo el cáncer, sepsis, arterioesclerosis, gota, enfermedad de Alzheimer, diabetes tipo 2, amiloidosis y las enfermedades autoinflamatorias, (estas últimas se explicarán más en detalle en el apartado 5).

3.1 Estructura de NLPR3

Como se ha mencionado anteriormente, NLPR3 pertenece a la familia de los receptores NLR, esta proteína se compone de varios dominios: un dominio N-terminal PYD, un dominio central NACHT, un dominio C-terminal LRR, y un dominio de unión entre NACHT y PYD. A su vez, el dominio NACHT se divide en varios subdominios: dominio asociado a NACHT específico para peces (FISNA), dominio de unión a nucleótidos (NBD), dominio helicoidal 1 (HD1), dominio helicoidal alado (WHD), y dominio helicoidal 2 (HD2). Además, tiene dos motivos, Walker A, que permite la unión de ATP, y Walker B, con actividad ATPasa, siendo ambos necesarios para la oligomerización de NLPR3 (Andreeva et al., 2021; Fu & Wu, 2023; Xiao et al., 2023) (Figura 3).

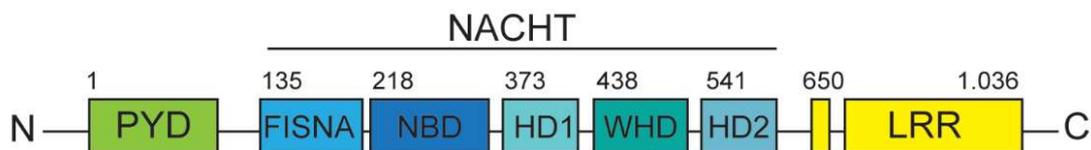


Figura 3. Dominios del sensor NLPR3. Organización de los diferentes dominios de NLPR3 desde el extremo N-terminal al C-terminal.

En relación con la estructura tridimensional de NLPR3, hasta la fecha la mayoría de los estudios se habían centrado en el estado inactivo de NLPR3. Sin embargo, el estado activo solo se había predicho en base a la estructura conocida de NLRC4. Recientemente se ha descrito la estructura en estado inactivo y activo de la proteína completa de NLPR3 (Andreeva et al., 2021; Xiao et al., 2023).

En estado inactivo, el ADP se une al dominio NACHT de NLPR3, este sensor se localiza principalmente cerca de las membranas formando una estructura de doble anillo de 12 a 16 unidades. Esta estructura se encuentra unida por interacciones LRR-LRR, y en el interior de ese anillo se encuentra el dominio PYD. Esta conformación protege a los dominios PYD de reclutar a ASC y la transducción de la señal (Andreeva et al., 2021; Keuler et al., 2022). Cuando NLPR3 se activa, sufre un cambio conformacional formando un disco compuesto por 10-11 unidades, junto a la quinasa 7 relacionada con NIMA (NEK7) y ASC, en este estado, NLPR3 se une a ATP. En la conformación activa, NEK7 se une al dominio LRR y promueve la apertura de la estructura inactiva. En el interior del disco se encuentran los dominios NACHT y PYD de todas las subunidades NLPR3, estos últimos se combinan para formar el inicio de un filamento de PYD que

recluta a ASC por su dominio PYD, promoviendo el reclutamiento de caspasa-1 y la propagación de la señal (Fu & Wu, 2023; Xiao et al., 2023) (**Figura 4**).

La unión a NEK7 es específica de NLRP3 ya que no se encuentra en otros inflammasomas, y es condicionante para la formación del complejo NLRP3-ASC (He, et al., 2016; Shi et al., 2016).

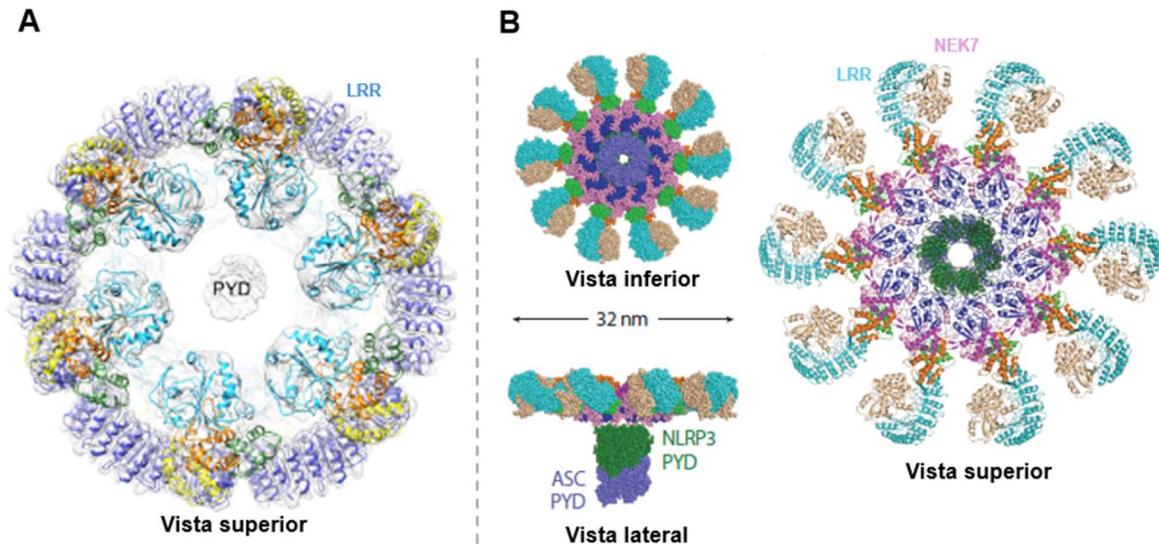


Figura 4. Modelos de conformación en 3D de NLRP3. (A) Conformación inactiva de NLRP3, estructura de jaula de doble anillo de 12 a 16 unidades. (B) Conformación activa de NLRP3 junto a NEK7 en diferentes puntos de vista. Imagen adaptada de (Andreeva et al., 2021; Fu & Wu, 2023).

3.2 Mecanismos de activación

El mecanismo de activación del inflammasoma NLRP3 ha sido objeto de estudio de numerosos trabajos debido a la gran variedad de estímulos que pueden activarlo, como infecciones bacterianas, víricas y fúngicas, así como en la inflamación estéril mediada por DAMPs y por HAMPs. Hasta la fecha se han propuesto varias rutas de activación: la vía canónica, la vía no canónica del inflammasoma y la vía alternativa recientemente descrita (Kelley et al., 2019).

Activación canónica del inflammasoma NLRP3

La vía canónica de activación del inflammasoma NLRP3 está muy caracterizada, se conforma de dos señales claramente diferenciadas, una primera señal de cebado y una segunda señal de activación del receptor NLRP3.

NLRP3 se expresa constitutivamente en células inmunitarias, sin embargo, los niveles de esta proteína son insuficientes para producir su activación, por ello se

necesita una primera señal de cebado, la cual tiene dos funciones: regular positivamente la expresión de los componentes del inflamasoma NLRP3, y regular las modificaciones postraduccionales de NLRP3 (He et al., 2016; Juliana et al., 2012). La expresión de NLRP3 se induce tras la activación de PRRs por señales PAMPs o DAMPs, como es el caso de LPS que se une a TLR4, la activación de los receptores intracelulares NOD1 o NOD2, o tras el reconocimiento de citoquinas como TNF- α o IL-1 β . Esto desencadena la activación de la ruta de señalización NF- κ B que promueve la transcripción de NLRP3, IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Bauernfeind et al., 2009; Qiao et al., 2012). Además, se han descrito otros elementos que influyen en el proceso de cebado, como las proteínas apoptóticas caspasa-8 y FADD (dominio de muerte asociado al receptor Fas) o los metabolitos succinato e itaconato (Gurung et al., 2014; Hoyle et al., 2022; Tannahill et al., 2013). En cuanto a la regulación postraduccional, se han visto implicados numerosos procesos que producen la activación de NLRP3, incluida la ubiquitinación, la fosforilación y la sumoilación, los cuales se explicarán más en detalle en el apartado 3.3 Mecanismos de regulación de NLRP3.

Tras la señal de cebado y las consecuentes modificaciones postraduccionales de NLRP3, una segunda señal es necesaria para la activación de esta proteína. Se ha demostrado que una gran variedad de DAMPs, PAMPs y HAMPs pueden activarlo. Sin embargo, es poco probable que NLRP3 pueda detectar estos estímulos directamente, siendo más factible que detecte el estrés celular causado por los estímulos, los cuales promueven principalmente 4 vías de activación: desregulación del flujo iónico, disfunción mitocondrial, producción de especies reactivas de oxígeno y daño lisosomal (Kelley et al., 2019).

Diversos estímulos desencadenan modificaciones en el flujo iónico, que incluyen la liberación de potasio (K^+), la movilización de calcio (Ca^{2+}), el flujo de cloro (Cl^-) y la entrada de sodio (Na^+), los cuales están relacionados con la activación del inflamasoma NLRP3. La disminución del K^+ intracelular se considera un desencadenante común en la activación del inflamasoma NLRP3 (Muñoz-Planillo et al., 2013; Petrilli et al., 2007). Se ha descrito que estímulos como el ATP extracelular, que se une al receptor purinérgico P2X7, toxinas que crean poros en la membrana como melitina, o ionóforos de K^+ como la nigericina, promueven la salida de K^+ de la célula (Ferrari et al., 2006). NLRP3 reconoce esta disminución de K^+ intracelular por su dominio FISNA, produciendo un cambio conformacional en el estado inactivo de NLRP3 y promoviendo así su activación (Tapia-Abellán et al., 2021). No obstante, también se han identificado estímulos de activación de NLRP3 independientes de la salida de K^+ , como el

imiquimod, que inhibe el complejo I de la cadena de transporte de electrones y genera un aumento de especies reactivas de oxígeno mitocondriales (mtROS) que activan NLRP3 (Groß et al., 2016; Swanson et al., 2019).

Además, se ha observado que los lisosomas desempeñan un papel en la activación del inflamasoma NLRP3. La fagocitosis de partículas de cristales de urato monosódico (MSU), colesterol, calcio o β -amiloide, o de partículas como sílice, producen la ruptura de los lisosomas, liberando su contenido al citoplasma. Este proceso desencadena la activación de NLRP3, donde la cathepsina B, la salida de K^+ y la acidificación parecen estar también involucrados (Hornung et al., 2008; Martinon et al., 2006).

Las ROS y la disfunción mitocondrial también están relacionadas con la activación del inflamasoma NLRP3. De hecho, un estudio reveló que las mtROS generadas tras el bloqueo de la mitofagia, producía la activación de NLRP3 (Zhou et al., 2011). De manera similar, también se demostró que tras la estimulación con LPS y ATP, se generaba un aumento de mtROS y la translocación citosólica del ADN mitocondrial (ADNmt) que era dependiente del inflamasoma NLRP3 (Nakahira et al., 2011). Además, otro estudio reveló que el ADNmt oxidado era necesario para la activación del inflamasoma NLRP3 (Shimada et al., 2012). De igual modo, se han descrito elementos mitocondriales como la cardiolipina, la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS) y la mitofusina 2, que pueden asociarse con NLRP3 (Ichinohe et al., 2013; Iyer et al., 2013; S. Park et al., 2013).

En la activación de NLRP3 los orgánulos también juegan un papel importante. En condiciones normales NLRP3 se asocia con el retículo endoplasmático, una vez activado se asocia con las mitocondrias (Zhou et al., 2011). Recientemente se ha descrito que la interacción de NLRP3 con lípidos cargados negativamente, como el fosfatidilinositol-4-fosfato, en la red trans-Golgi dispersa (dTGn) es necesaria para la formación del inflamasoma (Chen & Chen, 2018; Pandey et al., 2021; Schmacke et al., 2022).

Como se ha indicado previamente, tras la señal de activación, NLRP3 sufre un cambio conformacional asociándose a NEK7 y ASC, lo que conduce al posterior reclutamiento de caspasa-1. Esta procesará las citoquinas IL-1 β e IL-18 a su forma madura, y a GSDMD, que desencadenará la piroptosis con la intervención de NINJ1, liberando así otras alarminas y proteínas como LDH o galectina-3 (**Figura 5**) (Boucher et al., 2018; Broz et al., 2010; Phulphagar et al., 2021; Shi et al., 2016).

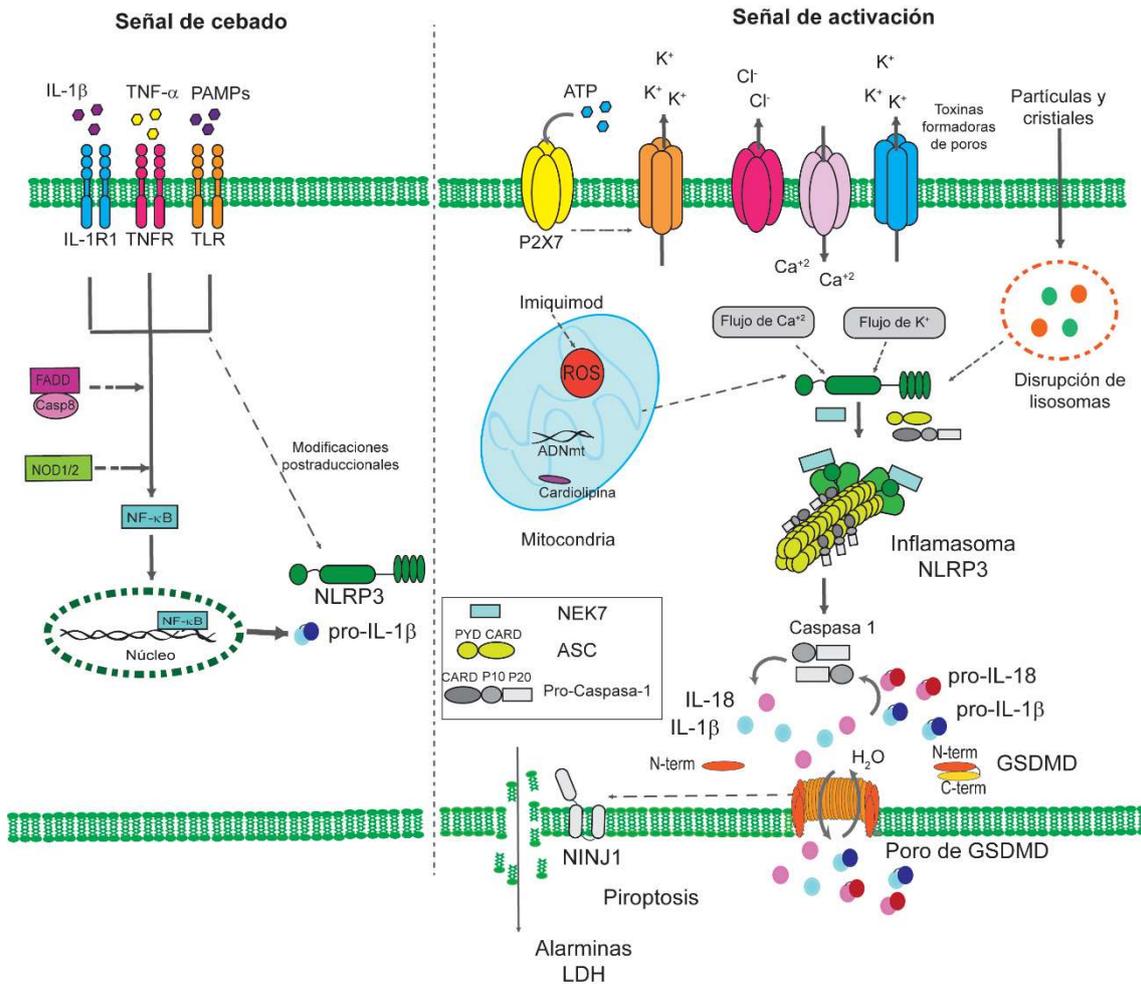


Figura 5. Modelo de activación canónica del inflammasoma NLRP3. La activación de NLRP3 depende de dos señales. La primera señal (señal de cebado, izquierda) produce la transcripción *NLRP3* e *IL1B* mediante la activación de NF-κB. Numerosos estímulos PAMPs, DAMPs o HAMPs producen la segunda señal (señal de activación, derecha) promoviendo la activación del inflammasoma NLRP3 junto a las proteínas ASC, caspasa-1 y NEK7. La activación de caspasa-1 produce la escisión de las citoquinas a su forma madura y de GSDMD. La formación del poro de GSDMD^{NT} produce la salida de las citoquinas y la entrada de agua que conlleva a la hinchazón de la célula, la cual induce la oligomerización de NINJ1 que termina lisando la membrana. Finalmente se produce la muerte por piroptosis.

Activación no canónica del inflammasoma NLRP3

A diferencia de lo que ocurre en la vía canónica, en la activación no canónica del inflammasoma las caspasas inflamatorias -11, -4 y -5 desempeñan una doble función actuando tanto como sensores como efectores. Estas caspasas reconocen directamente las moléculas de LPS internalizadas por las células, donde su motivo lípido A interacciona con el dominio CARD de caspasa-11. Esta interacción, promueve la activación de caspasa-11 que junto a LPS da lugar al inflammasoma no canónico. Este

inflammasoma tiene la capacidad de escindir la proteína GSDMD, con la consecuente formación de poros y salida de K^+ . El descenso de K^+ intracelular activa a su vez al inflammasoma NLRP3 y provoca la maduración de las citoquinas IL-1 β e IL-18 (Hagar et al., 2013; Kayagaki et al., 2013, 2015; Viganò et al., 2015) (**Figura 6**). Recientemente se han descrito otros estímulos que promueven la activación no canónica, como son los fosfolípidos oxidados que se unen al dominio catalítico de caspasa-11; o el glicolípido lipofosfoglicano de *Leishmania* que también promueve la activación de caspasa-11, aunque su mecanismo no está del todo descrito (de Carvalho et al., 2019; Zanoni et al., 2016). Además, en humanos se ha demostrado que NLRP11 es necesario para el reconocimiento de LPS intracelular y la consecuente formación del inflammasoma no canónico de caspasa-4. Por otro lado, se ha descrito que caspasa-4 es capaz de madurar a IL-18 (Rojas-Lopez et al., 2023; Shi et al., 2023). Es de destacar que el inflammasoma NLRP6 también activa caspasa-11 (Hara et al., 2018).

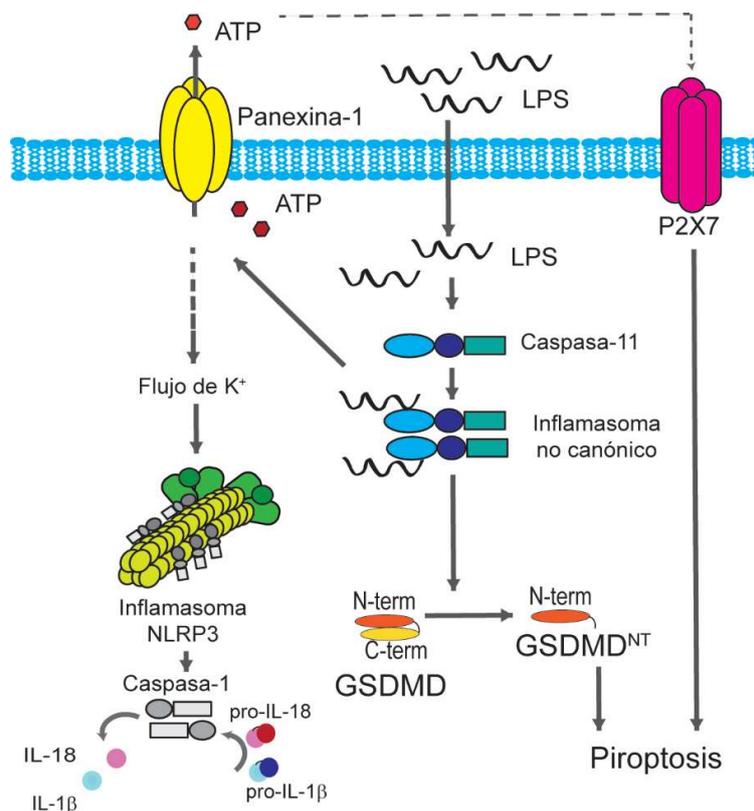


Figura 6. Modelo de activación no canónica del inflammasoma NLRP3. El LPS intracelular activa a caspasa-11 y produce la formación del inflammasoma no canónico. La caspasa-11 escinde GSDMD, originando la piroptosis y promoviendo la salida de K^+ con la consecuente la activación de NLRP3.

Vía alternativa de activación del inflamasoma NLRP3

Otra vía de activación que se ha observado en monocitos humanos, pero no se produce en el modelo de ratón, es la denominada vía alternativa del inflamasoma. A diferencia de la vía canónica, un único estímulo prolongado es suficiente para originar el inflamasoma NLRP3. Tras la activación de TLR4 por LPS, se inducen las rutas de señalización de NF- κ B y FADD-caspasa-8, promoviendo la activación de NLRP3 y originando un inflamasoma alternativo junto a las proteínas ASC y caspasa-1. Este, es capaz de producir la liberación de IL-1 β , independientemente de la piroptosis y la salida celular de K⁺ (Gaidt et al., 2016; Gaidt & Hornung, 2017).

3.3 Mecanismos de regulación de NLRP3

NLRP3 está altamente regulado evitando así una activación aberrante del inflamasoma, ya que su activación incontrolada es una de las principales causas de enfermedades autoinmunes y trastornos metabólicos. Además de la regulación a nivel transcripcional, el inflamasoma NLRP3 también sufre numerosas PTMs, las cuales modulan tanto la señal de cebado como la señal de activación. Dentro de estas PTMs tienen gran importancia los procesos de ubiquitinación, fosforilación y sumoilación (estos se explicarán más en detalle). Sin embargo, también se han descrito otros procesos como la acetilación y la nitrosilación (Barry et al., 2018; Juliana et al., 2012; Swanson et al., 2019).

Ubiquitinación y deubiquitinación

La ubiquitinación es un proceso por el cual las proteínas son marcadas con ubiquitina para ser degradadas por el proteosoma, aunque también produce otros eventos. El proceso inverso es la deubiquitinación y está orquestado por las deubiquitininasas (DUBs). NLRP3 está fuertemente regulado por ambos procesos, un balance entre ellos hará que NLRP3 este activo o reprimido (Juliana et al., 2012; Komander & Rape, 2012; Song et al., 2016; Wan et al., 2019).

En general, en las células sin señal de cebado NLRP3 se encuentra ubiquitinado, evitando así una activación no deseada. En este proceso participan numerosas enzimas ligasas E3, las cuales tienen la capacidad de unir cadenas de poliubiquitina K63 o K48 a NLRP3, como es el caso de la ligasa E3 TRIM31 (proteína que contiene el motivo tripartito 31) que interacciona con el dominio PYD de NLRP3 promoviendo la poliubiquitinación ligada a K48 y la consecuente degradación en el proteosoma; o el caso de la proteína Cullin 1, la cual interactúa con el dominio PYD y produce la

poliubiquitinación ligada a K63, evitando la formación del inflamasoma NLRP3 (Akther et al., 2021; Song et al., 2016; Wan et al., 2019).

Cuando las células se exponen a una señal de cebado, como la activación de TLR4 por LPS, se desencadenan cascadas de señalización que provocan la rápida eliminación de las cadenas de ubiquitina de NLRP3, favoreciendo así la activación del inflamasoma. Estos eventos son coordinados por diversas DUBs, siendo una enzima particularmente relevante en este proceso BRCC3 (subunidad del complejo que contiene BRCA1/BRCA2) en ratón y su homólogo humano BRCC36. Esta proteína se une a NLRP3 y deubiquitina su dominio LRR, siendo esencial para la posterior oligomerización y activación del inflamasoma (Juliana et al., 2012; Py et al., 2013; Ren et al., 2019) (**Figura 7**).

No solo la señal de cebado está involucrada en los eventos de deubiquitinación, la señal de activación también induce la acción de DUBs sobre NLRP3. Como ocurre con USP7 (peptidasa específica de ubiquitina 7) y USP47, la delección de estos genes origina una disminución en la activación del inflamasoma (Palazón-Riquelme et al., 2018). Se han encontrado otras enzimas que están implicadas en el proceso de deubiquitinación de NLRP3 como son UCHL5 (ubiquitin C-terminal hidrolasa L5) y USP14 (Hai et al., 2022; Ramachandran et al., 2021). Además, recientemente se ha descrito un proceso de ubiquitinación necesario para la activación de NLRP3 y la formación del complejo NLRP3-NEK7 mediante la enzima ligasa E3 MARCH5, la cual produce la poliubiquitinación ligada a K27, sobre los residuos K324 y K430 de NLRP3 (Park et al., 2023). Todos estos fenómenos revelan la importancia de este mecanismo en la regulación de NLRP3.

Fosforilación y desfosforilación

La fosforilación y desfosforilación de diferentes residuos de aminoácidos se ha descrito como un gran mecanismo regulador, donde numerosas quinasas y fosfatasas controlan el inflamasoma NLRP3. Tras la activación con LPS se produce la fosforilación de Ser198 en NLRP3 humano, la cual esta mediada por JNK1 (quinasa c-Jun N-terminal 1). Esta fosforilación facilita la auto-asociación de NLRP3 y promueve la unión de BRCC3 con la consecuente deubiquitinación (Ren et al., 2019; Song et al., 2017; Swanson et al., 2019).

Por otro lado, en las células sin tratar, es decir, sin señal de cebado, se han encontrado numerosos residuos fosforilados a lo largo de los diferentes dominios de NLRP3 que tienen principalmente una acción represora, como la fosforilación en

humanos de Ser5 y Tyr32 en el dominio PYD impidiendo la unión NLRP3-ASC; o la fosforilación de Ser806 y Tyr861 en el dominio LRR. Tras la señal de activación, se produce la desfosforilación de estos residuos mediante distintas enzimas, promoviendo la activación de NLRP3, de manera que PP2A (proteína fosfatasa 2A) desfosforila Ser5, PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa) desfosforila Tyr32, CSNK1A1 (isoforma alfa de la caseína quinasa I) desfosforila a Ser806 y PTPN22 (proteína tirosina fosfatasa no receptora tipo 22) desfosforila Tyr861. Además, se ha descrito que la fosforilación de Ser295 en el dominio NACHT puede ser represora o activadora dependiendo de la acción de PKA (proteína quinasa A) o PKD (proteína quinasa D), respectivamente (Huang et al., 2020; Mortimer et al., 2016; Niu et al., 2021; Spalinger et al., 2016; Stutz et al., 2017; Zhang et al., 2017) (**Figura 7**).

Sumoilación

La sumoilación es otro tipo de modificación postraduccional que produce la unión covalente de la proteína SUMO (del inglés *Small Ubiquitin-like Modifier*) en residuos de lisina. Este proceso puede ser llevado a cabo por 4 proteínas distintas en humanos (SUMO1-4) y ocurre de manera similar a la ubiquitinación, ya que está regulada por un conjunto especializado de 3 enzimas: E1 (de activación), E2 (de conjugación) y E3 (de ligación). El proceso inverso es la desumoilación y es llevado a cabo por isopeptidasas específicas, denominadas SENP (sentrina/proteasas específicas de SUMO) (Pichler et al., 2017; Zangiabadi & Abdul-Sater, 2022).

En relación con NLRP3, se ha demostrado que SUMO puede regular positiva o negativamente esta proteína. Se ha descrito que en ausencia de señal de cebado NLRP3 está unido a la proteína SUMO mediante la acción de la ligasa SUMO E3 MAPL (proteína ligasa unida a mitocondria), suprimiendo la activación del inflammasoma. Tras la estimulación, las proteasas SENP6 y SENP7 median la desumoilación y promueven la activación NLRP3 (Barry et al., 2018). Otro estudio mostró que la sumoilación por ligasa SUMO E3 TRIM28 (proteína que contiene el motivo tripartito 28) potencia la activación del inflammasoma NLRP3, ya que evita su ubiquitinación y posterior degradación (Qin et al., 2021) (**Figura 7**).

A pesar de los numerosos procesos que regulan NLRP3, la formación del inflammasoma no depende solo de ellos, ya que las proteínas ASC y caspasa-1 también experimentan procesos de regulación postraduccional.

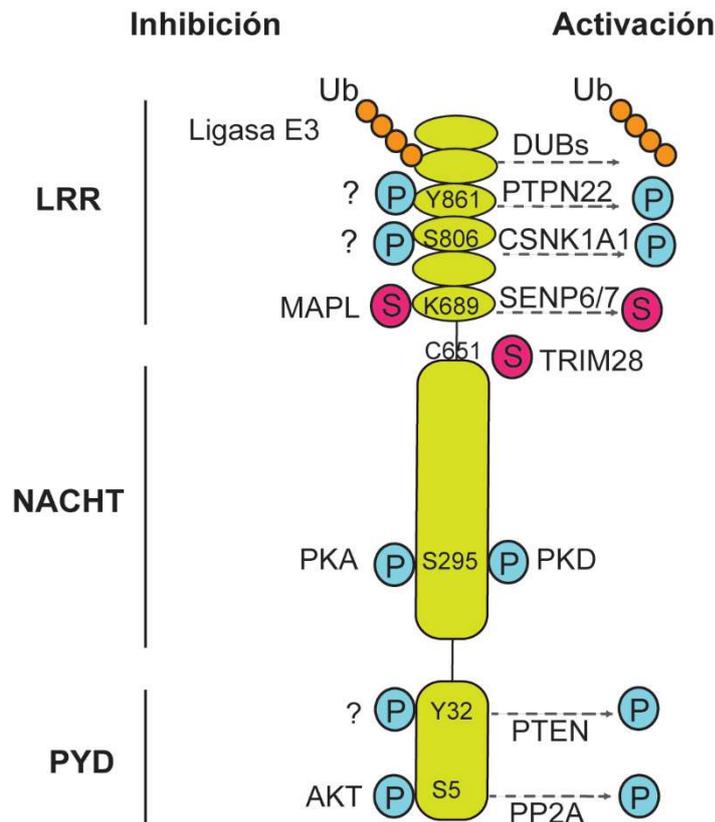


Figura 7. Modificaciones postraduccionales de NLRP3. Representación de las distintas modificaciones: ubiquitinación (Ub), fosforilación (P) y sumoilación (S). A la izquierda se indica las modificaciones que inhiben y a la derecha las que activan.

4. Inmunometabolismo

4.1 Rutas metabólicas

El metabolismo es una pieza clave para el correcto funcionamiento de las células de cualquier organismo, y se divide en dos procesos, catabolismo y anabolismo, ambos esenciales para la homeostasis. El catabolismo utiliza grandes moléculas de carbohidratos, lípidos y proteínas, para obtener energía la cual se empleará en otras actividades celulares, mientras que el anabolismo utiliza la energía liberada del catabolismo para sintetizar componentes celulares esenciales.

Una de las rutas principales del metabolismo es la glicólisis, donde se produce la conversión anaeróbica de una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato. Esta ruta ocurre en el citosol celular e implica 10 reacciones, las cuales se pueden dividir en 2 fases: una fase es en la que se invierte 2 moléculas de ATP (reacciones 1-5) y la otra fase es donde se obtienen 4 moléculas de ATP (reacciones 6-10), de manera que en el cómputo final de esta ruta se obtienen 2 moléculas de ATP y 2 NADH. En presencia de oxígeno, el piruvato ingresa en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) ubicado dentro

de las mitocondrias para producir ATP, mientras que en ausencia de oxígeno el piruvato se reduce a lactato. Además, la glicólisis tiene 3 pasos reguladores clave catalizados por la hexoquinasa, la fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa (**Figura 8**). En condiciones de hipoxia, las células reducen la dependencia de la fosforilación oxidativa mitocondrial y utilizan la glicólisis para mantener una producción de ATP suficiente, de manera que se produce una regulación positiva transcripcional de los transportadores de glucosa y las enzimas glicolíticas mediante la acción del factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) (Chandel, 2021; Jurica et al., 1998; Kierans & Taylor, 2021).

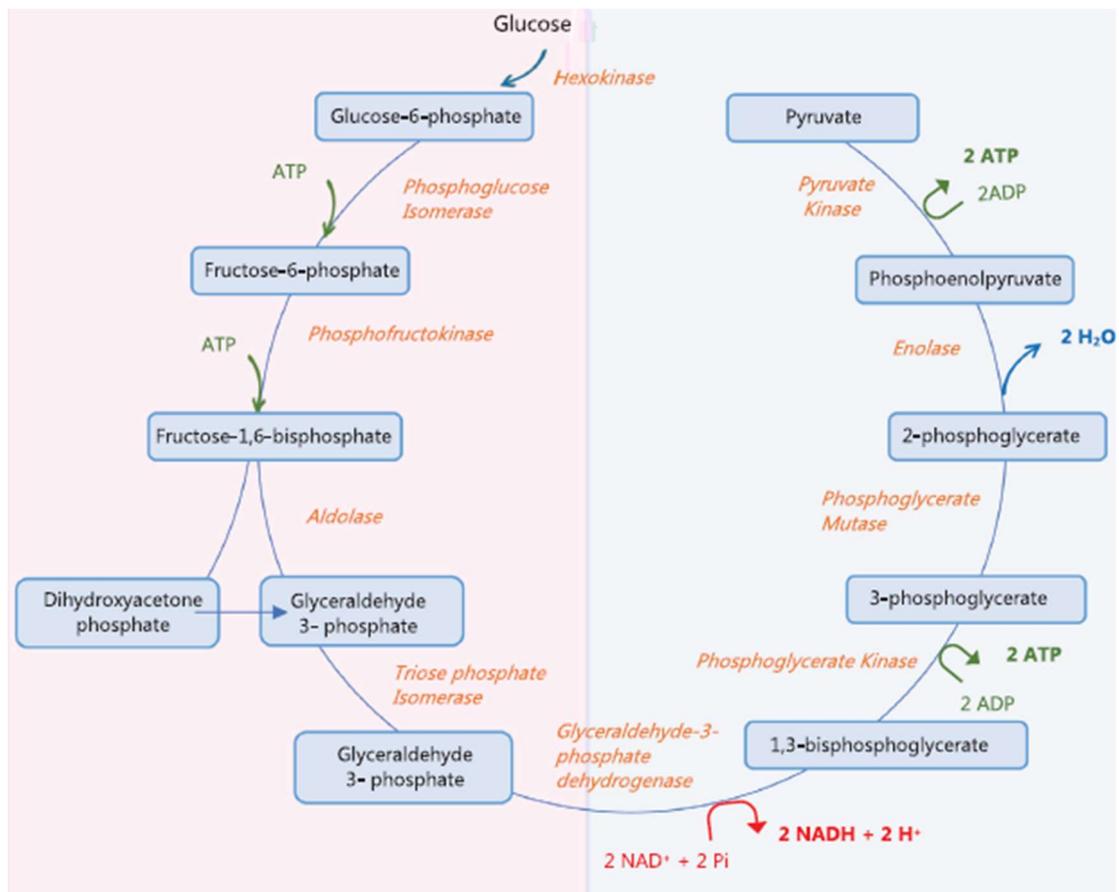


Figura 8. Esquema de la vía de la glicólisis. Representación de las 10 reacciones de la glicólisis, las 5 primeras reacciones invierten 2 moléculas de ATP (rosa) y las 5 siguientes producen 4 moléculas de ATP (azul). Imagen adaptada de (Chandel, 2021).

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos ocurre en presencia de oxígeno en la matriz mitocondrial y utiliza como sustrato el acetil-coenzima A (CoA) que se origina de la descarboxilación del piruvato por la enzima piruvato deshidrogenasa, o por la degradación de aminoácidos y ácidos grasos. Este ciclo se compone de 8 reacciones

que producen finalmente 3 moléculas NADH y 1 FADH₂, los cuales servirán de sustrato de la cadena de transporte de electrones (ETC) para producir ATP (**Figura 9**). Es de destacar que varios intermediarios de la glicólisis y del TCA también pueden ingresar en vías anabólicas o viceversa (Choi et al., 2021; Maurer et al., 2021).

En la mitocondria también ocurre la fosforilación oxidativa, la cual utiliza las moléculas NADH y FADH₂ generadas en el TCA y las oxida para obtener ATP mediante la ETC. Esta cadena está formada por los complejos I, II, III, IV y V, en ella se produce la oxidación de NADH y FADH₂ los cuales son sustrato del complejo I (NADH deshidrogenasa) y el complejo II (succinato deshidrogenasa, SDH) respectivamente. Esto produce la transferencia de electrones al complejo III (ubiquinona), que a su vez los traspasa al complejo IV (citocromo c oxidasa). Los complejos I, III, y IV liberan H⁺ al espacio intermembrana mitocondrial, generando así un potencial de membrana. Estos H⁺ vuelven a la matriz mediante el complejo V (ATPsintasa) produciendo ATP. La tasa de producción de ATP por cada molécula de glucosa son 36 ATP (Chandel, 2021b).

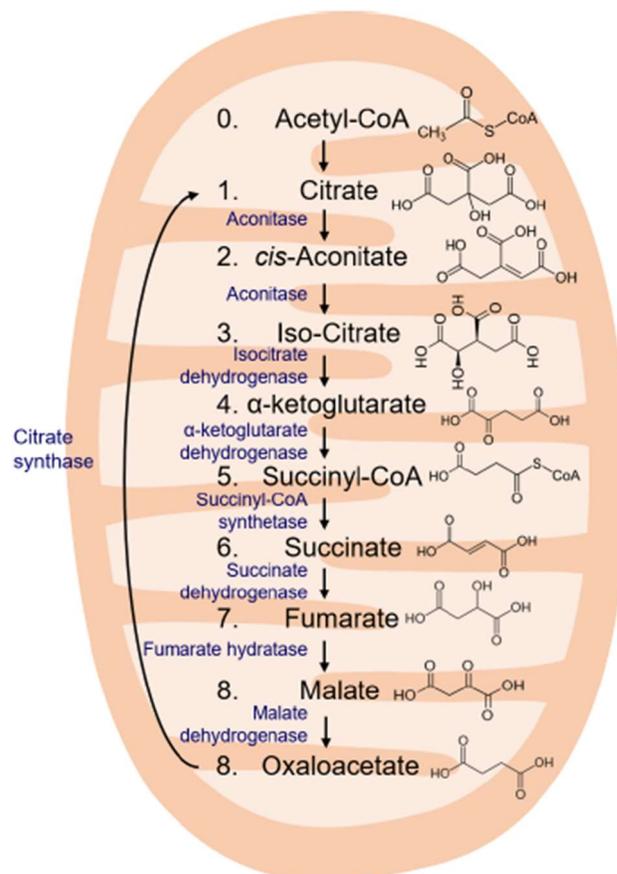


Figura 9. Esquema del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Representación de las 8 reacciones del TCA. Imagen adaptada de (Choi et al., 2021).

Otra vía importante para el metabolismo de la glucosa es la ruta de las pentosas fosfato (PPP), la cual ocurre en el citosol y es esencial para la proliferación y supervivencia celular. Esta ruta se divide en dos ramas, la oxidativa y la no oxidativa. En la vía oxidativa se utiliza la glucosa-6-fosfato generada en el primer paso de la glicólisis, convirtiéndola en ribosa-5-fosfato y 2 moléculas de NADPH, estos dos metabolitos son vitales para la producción de ácidos nucleicos y para el control del estrés oxidativo. En cambio, en la vía no oxidativa, se produce la interconversión entre moléculas de ribosa 5-fosfato y los intermediarios de la glicólisis, fructosa 6-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato. Estas reacciones reversibles son catalizadas por las enzimas: ribulosa-5-fosfato epimerasa (*RPE*), ribosa-5-fosfato isomerasa (*RPI*), transaldolasa (*TALDO*) y transcetolasa (*TKT*). Las dos ramas de las PPP funcionan dependiendo de los requisitos celulares (Ge et al., 2020; TeSlaa et al., 2023).

Otros procesos de gran relevancia son la ruta de oxidación de ácidos grasos (FAO) o β -oxidación, la síntesis de ácidos grasos (FAS) y el metabolismo de aminoácidos. FAO es clave para la obtención de ATP, ya que de una molécula de ácido graso se obtienen numerosos acetil-CoA que finalmente se utilizarán en la fosforilación oxidativa, mientras que, FAS utiliza productos derivados de otras vías metabólicas, en particular la glicólisis, el ciclo del TCA y la vía de las pentosas fosfato, para generar moléculas complejas que contienen lípidos, los cuales son esenciales para el crecimiento y la proliferación celular. En cuanto a los aminoácidos, estos adquieren numerosas funciones importantes, como la glutamina y el aspartato, que están involucrados en la síntesis de purinas y pirimidinas, el glutamato que actúa como intermediario de TCA convirtiéndose en α -cetoglutarato, la valina y la leucina que también están involucrados en la síntesis de ácidos grasos, o la arginina y triptófano que ayudan a mantener la proliferación celular (O'Neill et al., 2016; Qian et al., 2018).

4.2 Metabolismo en macrófagos

Un campo emergente de investigación es el inmunometabolismo, el cual combina dos disciplinas históricamente distintas, la inmunología y el metabolismo, pero que están estrechamente interconectadas. Este campo pretende definir las alteraciones que ocurren en los metabolitos y en las rutas metabólicas durante la activación de las células inmunitarias frente diferentes estímulos. Al conjunto de cambios en el metabolismo de una célula en un momento y estímulo específico, se le conoce como reprogramación metabólica. En definitiva, comprender bien el inmunometabolismo puede tener implicaciones beneficiosas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inmunidad y el metabolismo, como la diabetes y la obesidad. Dentro

de las rutas es de destacar la importancia de la glicólisis, la ruta de las pentosas fosfato, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la fosforilación oxidativa, las rutas de oxidación y síntesis de ácidos grasos y el metabolismo de los aminoácidos (Mathis & Shoelson, 2011).

La glicólisis es crucial para la función de las células inmunitarias, a pesar de que la cantidad de ATP generado en la glicólisis es menor que en la fosforilación oxidativa, esta vía puede activarse rápidamente mientras que la respiración mitocondrial es un proceso más complejo y probablemente más lento. Además, una alta tasa de glicólisis produce un incremento de los intermediarios de esta vía que promueven un crecimiento celular rápido, dando así soporte al TCA, las PPP, la síntesis de aminoácidos, incluyendo serina, glicina y alanina, y la producción de acetil-CoA para la síntesis de lípidos. De manera que un aumento en la glicólisis se considera como un cambio metabólico característico de la mayoría de las células inmunitarias que se activan rápidamente en respuesta a la estimulación de PRRs o receptores de citoquinas (Jiang et al., 2016; Kierans & Taylor, 2021; Xie et al., 2016).

Por otra parte, en la ruta de las pentosas fosfato se produce NADPH que está involucrado en la producción de ROS y en la generación antioxidantes, como el glutatión, ambos son esenciales durante las infecciones. Además, se ha demostrado que esta vía está aumentada en macrófagos activados con LPS (Haschemi et al., 2012).

El TCA y la fosforilación oxidativa también se han estudiado ampliamente en células inmunitarias, mostrando diferencias entre los macrófagos M1 y M2, esto se discutirá en el siguiente apartado (Mills et al., 2016; Tannahill, et al., 2013). Por otro lado, la oxidación de ácidos grasos tiene funciones clave en la regulación de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, de hecho, se encuentra una dependencia de esta ruta en células inmunitarias que no tienen una naturaleza inflamatoria (como los macrófagos M1). Sin embargo, la síntesis de ácidos grasos parece regular positivamente la generación y función de células inmunitarias proinflamatorias, de manera que macrófagos tratados con LPS muestran un incremento de la síntesis de ácidos grasos (Berod et al., 2014; Feingold et al., 2012). En cuanto a los aminoácidos, se ha descrito que la glutamina está relacionada con la producción de citoquinas IL-1 y de óxido nítrico en macrófagos estimulados con LPS (Bellows & Jaffe, 1999). Además, se ha demostrado que la arginina tiene un papel clave en la función inflamatoria, de manera que genera óxido nítrico en macrófagos M1, a través de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) el cual participa en la actividad citotóxica y antimicrobiana de los macrófagos (Rath et al., 2014). La arginina también se asocia con una respuesta

inmunitaria más tolerante, relacionada con la cicatrización de heridas, a través de la vía de la arginasa (Pesce et al., 2009).

Reprogramación metabólica en macrófagos M1 y M2

La reprogramación metabólica de los macrófagos es esencial para el desarrollo de un fenotipo M1 o M2, que dependerá principalmente del estímulo al que se enfrenten. Por lo general, las citoquinas IL-4 e IL-13 promueven una polarización de los macrófagos a M2 (antiinflamatorios) y se caracterizan por un aumento de la respiración mitocondrial, la producción de citoquinas antiinflamatorias y una alta expresión de la enzima arginasa-1. Para satisfacer sus necesidades metabólicas, estas células sufren un aumento tanto en la absorción de lípidos exógenos como en FAS, la cual respalda FAO y la actividad mitocondrial. Además, los macrófagos M2 presentan un TCA intacto, el cual permite la generación de intermediarios necesarios para la glicosilación de receptores asociados a M2, como el receptor de manosa, y muestran también un incremento de la fosforilación oxidativa. Recientemente se ha descrito que la glicólisis también es necesaria para el fenotipo M2 (Haschemi et al., 2012; Pesce et al., 2009; Rath et al., 2014; Wculek et al., 2022) (**Figura 10**).

En cambio, la estimulación con agonistas de TLR como LPS o la acción de IFN- γ promueven una polarización de los macrófagos a M1 (proinflamatorios). Estos sufren una reprogramación metabólica similar al efecto Warburg que presentan las células cancerígenas, ya que se caracteriza por un aumento de la glicólisis que conlleva a un aumento de la producción de lactato y piruvato, y una disminución del TCA (Palsson-McDermott et al., 2015; Warburg, 1956). Además, los macrófagos M1 tienen aumentada la ruta de las PPP con la consecuente producción de NADPH y la ruta FAS. También se produce un aumento de la expresión de la enzima iNOS y de la producción de citoquinas proinflamatorias y de ROS (Feingold et al., 2012; Haschemi et al., 2012; Qian et al., 2018; Rath et al., 2014) (**Figura 10**).

En los macrófagos M1, la glicólisis juega un papel central para el desarrollo de las funciones proinflamatorias. Se ha descrito en la literatura numerosos estudios que involucran las enzimas glicolíticas con el desarrollo de la inflamación como es el caso de piruvato quinasa M2 (PKM2), que induce la expresión de IL-1 β y la activación del inflammasoma NLRP3 a través de la actividad de HIF1 α (Palsson-McDermott et al., 2015).

Otra enzima que se asocia a la inflamación es la hexoquinasa, la inhibición de esta enzima por 2-deoxi-D-glucosa (2-DG) reduce la liberación de IL-1 β en macrófagos estimulados con LPS (Tannahill et al., 2013). También se han visto implicadas las enzimas gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) la cual regula la secreción

de TNF- α (Millet et al., 2016), la enolasa 1 (ENO1) que contribuye en la producción de citoquinas inflamatorias (Bae et al., 2012) y la enzima 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa 3 (PFKFB3) que promueve la glicólisis y la capacidad antiviral de los macrófagos (Jiang et al., 2016). En esta reprogramación es importante destacar el papel de HIF1 α ya que regula numerosos eventos, como el aumento de expresión del transportador de glucosa 1 (GLUT1) (Freemerman et al., 2014), la sobreactivación de la isoenzima piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1) y lactato deshidrogenasa, y también regula las enzimas PKM2 y PFKFB3 (Marrocco & Ortiz, 2022) (**Figura 10**).

La polarización de los macrófagos a M1 resulta en una reducción del TCA, esto se debe principalmente a que el ciclo del TCA sufre interrupciones en dos procesos, uno en la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH) que convierte el isocitrato en α -cetoglutarato, y otro en la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) que convierte el succinato en fumarato, lo que conlleva a la acumulación de citrato y succinato (Tannahill et al., 2013).

El citrato es necesario para la producción de mediadores proinflamatorios como óxido nítrico. Además, este se convierte en acetil-CoA, el cual es esencial para la producción de ácidos grasos, lípidos y prostaglandinas que promueven la señal inflamatoria. Por otro lado, la acumulación de citrato también aumenta la expresión de la enzima cis-aconitato descarboxilasa 1 (ACOD1), la cual convierte aconitato (un derivado del citrato) en itaconato (Bailey et al., 2019; Braverman & Stanley, 2017; Wu et al., 2020). Este juega un papel muy importante en las células ya que compite con el succinato inhibiendo la enzima SDH (complejo II de ETC), originando una disminución de la respiración mitocondrial. La consecuente acumulación de succinato conduce a un transporte inverso de electrones sobre el complejo I, lo que induce la producción de ROS, favoreciendo así la estabilización de HIF1 α , que promueve la liberación de IL-1 β y la activación del inflamasoma NLRP3 (Bailey et al., 2019; Mills et al., 2016; Tannahill et al., 2013). Por otro lado, el succinato también actúa como alarmina, se libera de las células y es reconocido por otros macrófagos por el receptor de succinato 1 (SUCNR1, también denominado GPR91), manteniendo así la inflamación y la secreción de IL-1 β dependiente de HIF1 α (Cordes et al., 2016; Littlewood-Evans et al., 2016; Tannahill et al., 2017).

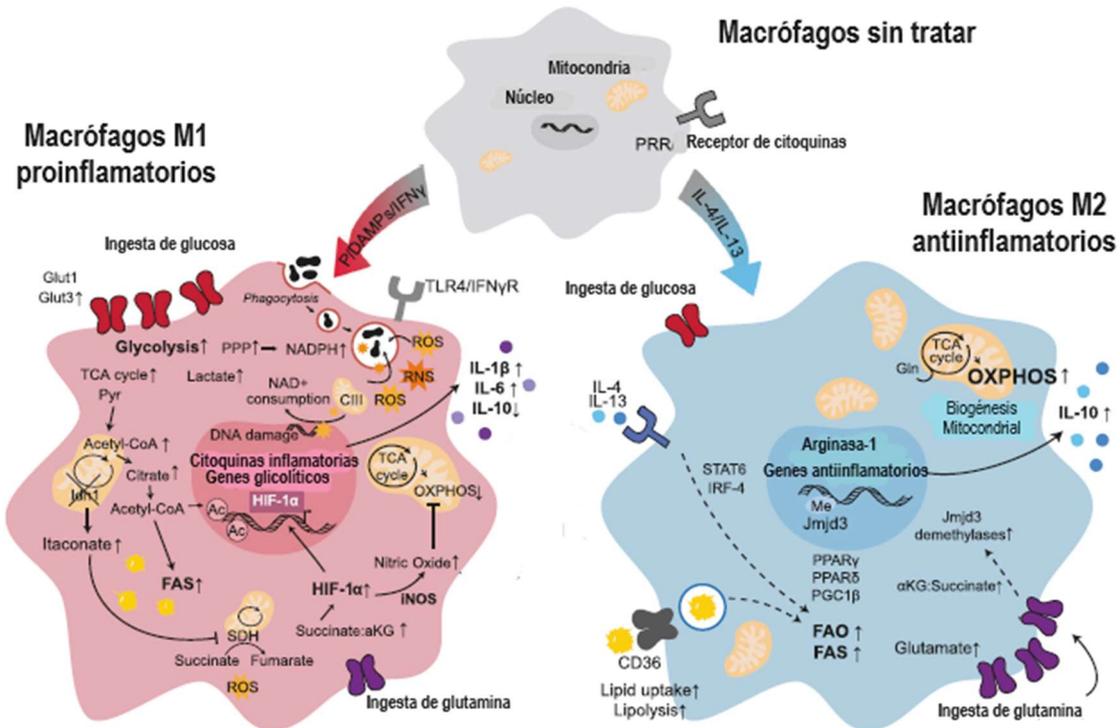


Figura 10. Reprogramación metabólica de los macrófagos a M1 o M2. Estímulos como LPS e IFN- γ promueven la polarización de los macrófagos a M1 (proinflamatorios, rosa) aumentando la glicolisis, PPP y FAS, produciendo así una disrupción del TCA y la fosforilación oxidativa. Esto conlleva a la transcripción de genes inflamatorios, glicolíticos y de HIF1 α . Las citoquinas IL-4 e IL-13 promueven la polarización de los macrófagos a M2 (antiinflamatorios, azul), aumentando FAO, FAS y la fosforilación oxidativa. Esto conlleva a la transcripción de genes antiinflamatorios. Imagen adaptada de (Wculek et al., 2022).

Itaconato

Recientemente se ha descrito que los macrófagos estimulados con LPS incrementan la producción de itaconato, este es un inmunomodulador que tiene una acción principalmente antiinflamatoria. La estructura del itaconato es similar al succinato, esto le permite inhibir por competitividad la enzima SDH. Debido al gran interés que genera este metabolito, se han desarrollado derivados más electrófilos que permiten una mayor permeabilización en la membrana, como son el 4-octilitaconato (4-OI) y el dimetil-itaconato (DI). Estos derivados se usan comúnmente en ensayos *in vitro* e *in vivo*, no obstante, esas modificaciones pueden generar otras propiedades diferentes al itaconato endógeno (Cordes et al., 2016; Swain et al., 2020) (Figura 11).

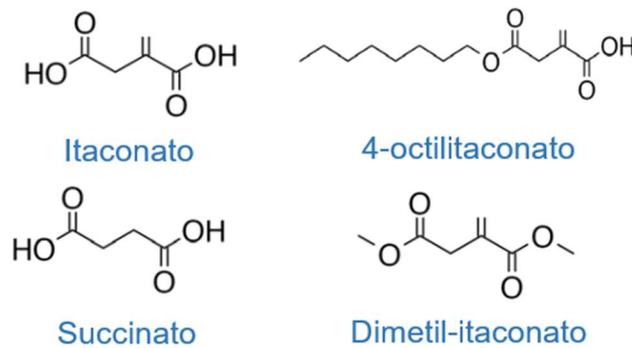


Figura 11. Estructuras moleculares de succinato, itaconato y sus derivados.

El itaconato a parte de inhibir SDH, también participa en otros procesos como la inhibición de la glicólisis en múltiples niveles la cual limitará la inflamación (Cordes et al., 2016). Se ha descrito que este metabolito alquila residuos de cisteínas de varias enzimas como aldolasa A (ALDOA), lactato deshidrogenasa A (LDHA) y GAPDH, reduciendo así su actividad (Liao et al., 2019; Qin et al., 2019). Además, promueve la activación de factores de transcripción con actividad antiinflamatoria como NRF2 (factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2). Este es un factor de transcripción antioxidante y su translocación al núcleo promueve la reducción de: ROS, la activación del inflammasoma y la secreción de citoquinas proinflamatorias, como IL-1 β (Kobayashi et al., 2016; Mills et al., 2018). El itaconato también aumenta la expresión de ATF3 (factor de transcripción dependiente de AMPc 3), otro factor de transcripción antiinflamatorio que reduce la producción de la citoquina proinflamatoria IL-6 (Bambouskova et al., 2018). Otro objetivo de este metabolito es el propio NLRP3, el itaconato alquila la cisteína 548 (C548) de este sensor de manera que bloquea la interacción NEK7-NLRP3, evitando así su oligomerización (Hoofman et al., 2020).

5. Enfermedades autoinflamatorias

El término autoinflamación fue descrito por primera vez en 1999, desde entonces se han descubierto un amplio número de enfermedades hereditarias que comprenden las enfermedades autoinflamatorias (McDermott et al., 1999). Estas se originan principalmente por una activación descontrolada de la inflamación y del sistema inmunitario innato. Además, se caracterizan por tener una baja prevalencia en la población y por producir episodios recurrentes de fiebre e inflamación estéril. Estas enfermedades suelen ser causadas por mutaciones genéticas y dependiendo de su origen, se clasifican en enfermedades autoinflamatorias poligénicas o monogénicas,

siendo estas últimas las más descritas y las que se explicarán en más detalle por su importancia para esta Tesis (Nigrovic et al., 2020).

Las enfermedades autoinflamatorias monogénicas presentan mutaciones de pérdida de función en genes que suprimen la inflamación, o mutaciones de ganancia de función en genes que propagan la inflamación, lo que resulta en una activación exacerbada. Se pueden clasificar en varias categorías según la vía inflamatoria implicada: inflamomasopatías, relacionadas con la familia IL-1, interferonopatías tipo I o relacionadas con la señalización TNF o NF- κ B, entre otros. Destacando las inflamomasopatías, ya que es el grupo mejor caracterizado. Estas surgen por mutaciones de ganancia de función en genes sensores del inflamoma, lo que conlleva a una sobreproducción de citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18 (Sönmez & Özen, 2017).

Dentro de las inflamomasopatías hay que destacar la fiebre mediterránea familiar (FMF). Este es el primer síndrome que se describió y el más frecuente, a pesar de ello, su prevalencia depende de la localización geográfica, siendo mayor en las regiones cercanas al Mediterráneo. Este síndrome surge por variantes patogénicas en el gen de pirina (*MEFV*), la herencia es autosómica recesiva, sin embargo, se han observado casos de transmisión autosómica dominante. Este gen contiene 10 exones, la mayoría de las mutaciones asociadas a FMF se encuentran en los exones 2, 3, 5 y 10, siendo las más frecuentes M694V, M680I, V726A, M694I en el exón 10 y E148Q en el exón 2 (Aldea et al., 2004; Ozdogan & Ugurlu, 2019; Touitou, 2001). Los pacientes con FMF presentan síntomas desde la niñez, con episodios que duran de 2 a 3 días, y van asociados a fiebre, dolor abdominal y/o torácico, serositis, artritis, mialgia, erupción erisipeloides, llegando a desarrollar incluso amiloidosis. Otras variantes en *MEFV* dan lugar a un síndrome menos frecuente, el síndrome autoinflamatorio asociado a pirina con dermatosis neutrofílica (PAAND). A diferencia de FMF, estas variantes se encuentran en la región conservada de pirina que constituye el punto unión de esta proteína con la proteína inhibitoria 14-3-3 (Moghaddas et al., 2017). Dentro del grupo de inflamomasopatías también se han descrito variantes patogénicas en otros sensores como NLRP3, que da lugar al síndrome periódico asociado a criopirina (CAPS), el cual se explicará más en detalle en el apartado 5.1 debido a su importancia para esta Tesis (Agostini et al., 2004; Dodé et al., 2002) (**Tabla 1**).

Como se ha mencionado, a parte de las inflamomasopatías también se conocen otras enfermedades autoinflamatorias, como las relacionadas con miembros de la familia IL-1, estas surgen por variantes en genes que no codifican sensores, como el

síndrome de deficiencia de IL-1Ra (DIRA) donde el gen *IL1RN* está afectado, originando así una sobreproducción de IL-1 β (Aksentijevich et al., 2009; Nigrovic et al., 2020), o la deficiencia del antagonista del IL-36R (DITRA) por variantes patogénicas en el gen *IL36RN*. Otro tipo son las interferonopatías tipo I, estas producen un aumento del IFN tipo I como consecuencia de alteraciones en genes que están involucrados en procesos de señalización de ácidos nucleicos o que tienen relación con los proteosomas, como el síndrome Aicardi-Goutières. Otras enfermedades son las asociadas con la señalización de TNF o NF- κ B, que dan lugar a los síndromes de haploinsuficiencia de A20 (HA20), síndrome de Blau y el síndrome periódico asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAPS) (Gattorno et al., 2019; Lachmann et al., 2014; Zhou et al., 2016). Por otro lado, también se ha descrito la enfermedad de deficiencia de adenosina desaminasa 2 (DADA2) como consecuencia de variantes patogénicas en el gen *CECR1* (Zhou et al., 2014) y las actinopatías inflamatorias como consecuencia de alteraciones en diferentes proteínas del citoesqueleto.

Tabla 1. Resumen de las principales inflamasomopatías.

Inflamasomopatía	Gen	Mecanismo	Herencia
Autoinflamación con artritis y disqueratosis (NAIAD)	<i>NLRP1</i>	Activación de NLRP1	AD
FMF	<i>MEFV</i>	Activación de pirina	AR o AD
PAAND	<i>MEFV</i>	Activación de pirina	AD
Síndrome de artritis piógena estéril, pioderma gangrenoso y acné (PAPA)	<i>PSTPIP1</i>	Activación de pirina	AD
Hiperinmunoglobulinemia D con fiebre periódica (HIDS)	<i>MVK</i>	Activación de pirina	AR
Síndrome autoinflamatorio-fiebre periódica-enterocolitis del lactante (AIFEC)	<i>NLRC4</i>	Activación de NLRC4	AD
Síndrome autoinflamatorio familiar por frío 4 (FCAS4)	<i>NLRC4</i>	Activación de NLRC4	AD
CAPS	<i>NLRP3</i>	Activación de NLRP3	AD
Síndrome autoinflamatorio familiar por frío 2 (FCAS2)	<i>NLRP12</i>	Activación de NLRP12	AD

Abreviaturas: AR: autosómica recesiva. / AD: autosómica dominante

A parte de estas enfermedades autoinflamatorias, se han descrito variantes patogénicas en numerosos genes implicados en otros procesos celulares, sin embargo, estos tienen una prevalencia muy baja en la población.

5.1 Síndrome periódico asociado a criopirina

El síndrome CAPS es una inflamasomopatía, y como tal, se caracteriza por una liberación exacerbada de la citoquina IL-1 β . Este síndrome es de herencia autosómica dominante, y surge por variantes patogénicas en el gen *NLRP3* de ganancia de función, existiendo así una correlación genotipo-fenotipo bastante consistente (Agostini et al., 2004; Dodé et al., 2002). La mayoría de los pacientes presentan variantes monoalélicas heterocigotas en línea germinal, aunque también se han descrito variantes somáticas (Rowczenio et al., 2017). Por lo general, la aparición temprana de una variante somática da lugar a una presentación de la enfermedad más temprana, ya que tendrá más células afectadas que una aparición somática tardía. Hasta la fecha, se han descrito 264 variantes de *NLRP3*, de las cuales 100 son patogénicas o probablemente patogénicas, según la base de datos Infevers (<https://infevers.umai-montpellier.fr/web/search.php>, 1 de diciembre, 2023), la mayoría se localizaban en el dominio NACHT, aunque también se han descrito algunas en el dominio LRR.

El síndrome CAPS incluye tres fenotipos dependiendo de la severidad de la enfermedad que son, el síndrome autoinflamatorio familiar por frío (FCAS) es el fenotipo más leve, el síndrome de Muckle-Wells (MWS) es el fenotipo intermedio y la enfermedad inflamatoria multisistémica de inicio neonatal/ síndrome articular, cutáneo y neurológico crónico infantil (NOMID/CINCA), que es el fenotipo más severo (Dodé et al., 2002; Feldmann et al., 2002; Levy et al., 2015). Al principio estos fenotipos se consideraban como patologías diferentes, sin embargo, en la actualidad este síndrome se entiende como un espectro continuo. Por otro lado, también se han descrito variantes de baja penetrancia, las cuales pueden estar presentes en individuos sanos asintomáticos, siendo las más frecuentes V198M, R488K y Q703K (Kuemmerle-Deschner et al., 2017)

Este síndrome se considera una enfermedad rara ya que presenta una prevalencia muy baja en la población, la cual oscila entre 1 y 3 casos por millón de habitantes. Además, se han encontrado diferencias geográficas en la distribución de los fenotipos, de manera que el fenotipo FACS es más común en América del Norte, mientras que en Europa es más común MWS (Cuisset et al., 2011; Welzel & Kuemmerle-Deschner, 2021). En cuanto a los pacientes NOMID/CINCA, estos son menos comunes ya que la mayoría de los casos son de *novo* y debut temprano. No

obstante, la incidencia de este síndrome puede estar subestimada debido a la complejidad de su diagnóstico (Welzel & Kuemmerle-Deschner, 2021).

El síndrome CAPS es una enfermedad inflamatoria multisistémica, por tanto, los pacientes presentan una gran variedad de manifestaciones clínicas las cuales suelen aparecer a una edad temprana, rara vez los síntomas aparecen en la edad adulta, lo más probable en este caso es que se deba a una variante somática. Algunos síntomas se asocian a un fenotipo concreto, mientras que otros aparecen en todos. Los síntomas característicos de los 3 fenotipos son principalmente fiebre, mialgias y afectaciones cutáneas, musculoesqueléticas, oculares y del sistema nervioso central en diversos grados (Booshehri & Hoffman, 2019). Sin embargo, la duración de los episodios inflamatorios es diferente, en FCAS suele ser menos de 1 día, mientras que en los otros fenotipos suele ser más persistentes. Además, los pacientes con MWS y NOMID/CINCA suelen presentar amiloidosis y pérdida auditiva. Y solo los pacientes NOMID/CINCA muestran síntomas más severos como artritis, una afectación importante neurológica (meningitis, papiledema y convulsiones) y rasgos dismórficos (Houx et al., 2015; Kitley et al., 2010; Levy et al., 2015). Por otro lado, los individuos con variantes de baja penetrancia presentan síntomas atípicos a los CAPS, como afecciones gastrointestinales (Kuemmerle-Deschner et al., 2017).

En cuanto al mecanismo molecular que origina esta inflamación, todavía no está del todo descrito. Por ello, esta Tesis se centrará en describir los mecanismos que están detrás de la activación de NLRP3 en las variantes patogénicas asociadas al síndrome CAPS. A pesar de esto, son numerosos los estudios *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* tanto en modelo de ratón como humano que han pretendido elucidar el mecanismo de activación. A diferencia de lo que ocurre en condiciones normales donde dos señales son necesarias para la activación de NLRP3, las variantes patogénicas solo requieren una señal y más en concreto la señal de cebado. Se han descrito numerosos estudios donde células de pacientes CAPS tratadas únicamente con LPS activan NLRP3, con la consecuente formación de oligómeros de ASC, activación de caspasa-1, piroptosis y liberación de IL-1 β , entendiéndose como un inflamasoma hipersensible (Coll et al., 2015; Corcoran et al., 2020; Tapia-Abellán et al., 2019). Sin embargo, pacientes CAPS y modelos animales que expresan NLRP3 con variantes CAPS presentan respuestas inflamatorias sistémicas espontáneas en ausencia de infección (Bonar et al., 2012).

Por otro lado, las variantes R260W, T348M, D303N y A439T, se describieron como patogénicas en el estudio de Dode de 2002, estas mostraban distintos grados de severidad, más tarde se identificó el fenotipo de estas, asociándose a R260W con un

fenotipo FCAS/MWS, T348M y A439T con el fenotipo MWS y la variante D303N con un fenotipo NOMID/CINCA, desde entonces son numerosos los estudios que han utilizado estas variantes para entender mejor el síndrome CAPS (Bonar et al., 2012; Dodé et al., 2002; Villalba et al., 2016; Zhou et al., 2022). También se ha descrito que no todas las variantes responden de la misma manera a los mismos estímulos, como la variante L353P que está asociada a FCAS, la cual produce liberación de IL-1 β cuando las células se exponen a 32°C, no obstante, esto no ocurre en variantes MWS y NOMID/CINCA (Rosengren et al., 2007). Todos estos avances sugieren que todavía queda mucho por descubrir sobre el funcionamiento de las variantes de NLRP3 asociadas a CAPS.

El tratamiento para el síndrome CAPS, o incluso otras enfermedades autoinflamatorias, se basa principalmente en bloqueantes de IL-1 β . Dentro de este grupo encontramos la anakinra, la cual ha mostrado un gran éxito en los pacientes. Este tratamiento fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) en 2001 como terapia para la artritis reumatoide y más tarde para el síndrome CAPS. Anakinra es la proteína recombinante del antagonista del receptor IL-1Ra y por tanto es un inhibidor competitivo de la unión tanto de IL-1 β como de IL-1 α al receptor IL-1RI. A pesar de su éxito, este fármaco tiene contraindicaciones ya que se suministra con inyecciones diarias debido a su corta vida, lo que comúnmente origina reacciones en la zona de administración (Broderick & Hoffman, 2022; Chang et al., 2014; Kuemmerle-Deschner et al., 2011).

Otros tratamientos bloqueantes de IL-1 β utilizados en el síndrome CAPS son Rinolcept, el cual fue aprobado por la FDA en 2008, este es un recombinante del receptor soluble IL-1R, y Canakinumab que fue aprobado en 2009, este es un anticuerpo monoclonal que bloquea a IL-1 β (Hoffman et al., 2008; Walker et al., 2021). A diferencia de anakinra, estos fármacos tienen la ventaja de que se suministran con inyecciones semanales o bimestrales en los pacientes. Además, durante los episodios inflamatorios, como alivio sintomático, se pueden usar los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y los corticoides.

A pesar de que se recomienda el tratamiento con anti-IL-1 para todos los fenotipos CAPS, es importante diagnosticarlos específicamente y adaptar el tratamiento.

6. Estrategias terapéuticas dirigidas al inflammasoma NLRP3

Debido a la implicación de inflammasoma NLRP3 en el desarrollo de numerosas enfermedades, incluyendo entre ellas el síndrome CAPS, la proteína NLRP3 se ha

convertido en un objetivo muy prometedor para el desarrollo de nuevas terapias. Estas estrategias buscan inhibir la activación del inflamasoma NLRP3 y se centran en los diferentes pasos que conducen a su activación. En este sentido, se han desarrollado moléculas que pretenden bloquear diversos puntos del proceso, como la transcripción tras la señal de cebado, las modificaciones postraduccionales como la deubiquitinación, la liberación de IL-1 β e incluso la propia proteína NLRP3. Además, también se consideran dianas terapéuticas las proteínas ASC, caspasa-1 y GSDMD. No obstante, los inhibidores específicos de NLRP3 son considerados la mejor opción para el tratamiento de enfermedades relacionadas con este inflamasoma. Hasta la fecha, se han descrito varias moléculas que actúan como inhibidores de NLRP3, los cuales no afectan la activación transcripcional de NLRP3 y pro-IL-1 β .

Dentro de estos inhibidores específicos se encuentran las sulfonilureas. Inicialmente estos compuestos fueron desarrollados para inhibir el procesamiento de IL-1 β . Uno de los primeros inhibidores descritos fue la gliburida, un fármaco inicialmente desarrollado como tratamiento para la diabetes tipo 2. Sin embargo, fue más tarde cuando la molécula MCC950 (también conocida como CRID3), fue descrita como un inhibidor específico de NLRP3, siendo esta molécula la más caracterizada hasta la fecha (Coll et al., 2015; Perregaux et al., 2001).

En 2015, el estudio de Coll y colaboradores identificó la molécula MCC950 como un potente y selectivo inhibidor de NLRP3. Esta molécula bloqueaba específicamente la activación del inflamasoma canónico y no canónico de NLRP3, y la secreción de IL-1 β , ya que previene la oligomerización de ASC en macrófagos humanos y de ratón, sin afectar a la transcripción consecuente de la señal de cebado. Por el contrario, no tiene ningún efecto sobre la activación del inflamasoma AIM2 o NLRC4, demostrando así su especificidad. Además, en ensayos *in vivo* en modelos de ratón con el fenotipo MWS y en ensayos *ex vivo* en muestras de pacientes MWS, el MCC950 disminuye la liberación de IL-1 β , IL-18 y la activación de caspasa-1 (Coll et al., 2015). En cuanto al mecanismo de acción, el MCC950 se une al motivo Walker B dentro del dominio NACTH de NLRP3, bloqueando así la hidrólisis de ATP y la formación del inflamasoma (Coll et al., 2019). De igual modo, el MCC950 es capaz de cerrar la conformación “abierta” de la proteína NLRP3 activa, tanto en NLRP3 silvestre como en variantes autoinflamatorias asociadas a CAPS (Tapia-Abellán et al., 2019). Desde entonces son numerosos los estudios que han demostrado la acción beneficiosa de MCC950 en diferentes patologías donde el inflamasoma NLRP3 tiene gran relevancia, llegando incluso a un ensayo clínico en fase II para la artritis reumatoide. Sin embargo, en este ensayo se encontraron indicios de hepatotoxicidad ya que aumentó la concentración de enzimas hepáticas en sangre,

disminuyendo así la posibilidad de la aplicación clínica de MCC950 (Mangan et al., 2018). Por este motivo, numerosas estrategias de búsqueda de nuevos inhibidores se basan en realizar ligeras modificaciones de MCC950, de hecho, el derivado Inzomelid, ha completado los ensayos de fase I en pacientes adultos con síndrome CAPS ([ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04015076) Identificador: NCT04015076).

Además de MCC950, se han descrito otros inhibidores específicos de NLRP3 que también inhiben su actividad ATPasa, como es el caso de CY-09, una glitazona que se une directamente al motivo Walker A de NLRP3. También se ha descrito el inhibidor OLT1177, cuyo ensayo clínico se encuentra en fase II para la artritis gotosa aguda. Este es una molécula de β -sulfonil nitrilo que a pesar de saber que bloquea la actividad de la ATPasa NLRP3, su mecanismo de acción no está del todo descrito. Tanto CY-09 como OLT1177, tienen un efecto antiinflamatorio y actúan independientemente de la señal de cebado o del flujo de salida de K^+ (Jiang et al., 2017; Marchetti et al., 2018; Yang et al., 2019; Zhang et al., 2021). Otras moléculas que son capaces de bloquear la actividad ATPasa, son las sulfonamidas y más en concreto los compuestos JC-21 y JC-171 o los derivados de acrilato como INF4E e INF39 que son dos inhibidores irreversibles de NLRP3 (Cocco et al., 2017; Guo et al., 2017; Shi et al., 2021).

Por otro lado, también se han encontrado inhibidores con mecanismos de acción independientes de la actividad ATPasa de NLRP3, como Tranilast, este compuesto es un análogo del triptófano e inicialmente descrito como un antialérgico, más tarde se comprobó que se unía al dominio NACHT de NLRP3, inhibiendo así la oligomerización con ASC (Huang et al., 2018; Saeedi-Boroujeni et al., 2021). La oridonina también se ha relacionado con la inhibición de NLRP3, este es el componente bioactivo de *Rabdosia Rubescens* y se une covalentemente a C279 en el dominio NACTH impidiendo la interacción con NEK7 (He et al., 2018; Zhao et al., 2017). Además, se han descrito otras moléculas que bloquean NLRP3, como las vinilsulfonas y más en concreto Bay 11-7082 o la partenolida, las acilhidrazonas como EMD638683, o algunos medicamentos NSAIDs como los derivados de fenamato, diclofenaco y ácido mefenámico (Daniels et al., 2016; Juliana et al., 2010).

Como se ha mencionado anteriormente, el subproducto del TCA denominado itaconato, es capaz de inhibir la activación de NLRP3 bloqueando la interacción NEK7-NLRP3. Este hallazgo sugiere que el desarrollo de derivados de esta molécula podrían ser buenos candidatos para la búsqueda de nuevos tratamientos. De hecho, su derivado 4-octilitaconato, se ha comprobado que tiene una mayor eficacia en la inhibición de

NLRP3. Estos descubrimientos abren la puerta a posibles nuevas terapias (Hooftman et al., 2020; Lampropoulou et al., 2016; Swain et al., 2020).

A pesar de que la búsqueda de terapias se centra en inhibidores específicos de NLRP3, se han desarrollado numerosas moléculas que tienen como objetivo otras dianas relacionadas con la activación del inflamasoma NLRP3. Con este fin, se describieron dos inhibidores de caspasa-1, VX-740 y VX-765, los cuales alcanzaron sin éxito ensayos clínicos de fase II (Boxer et al., 2010; Cornelis et al., 2007). Por otro lado, dos medicamentos ya aprobados por la FDA, el dimetilfumarato y disulfiram, se han descrito que pueden bloquear a GSDMD (Hu et al., 2020; Place & Kanneganti, 2021). Además, cada vez es más evidente la implicación de las modificaciones postraduccionales en la activación de NLRP3, por lo que limitar la deubiquitinación de NLRP3 o aumentar su degradación, podrían ser interesantes dianas para el desarrollo de nuevos fármacos.

Es importante destacar que los pacientes con síndrome CAPS carecen de tratamientos efectivos, ya que su terapia se basa en bloqueantes de IL-1 β . Por este motivo, el objetivo principal de esta Tesis es esclarecer el mecanismo de activación y regulación de las variantes patogénicas de NLRP3 asociadas a dicho síndrome. Esto permitiría allanar el camino hacia posibles nuevas terapias. Además, esta Tesis también se enfoca en la identificación de nuevos inhibidores que podrían ser utilizados como tratamientos novedosos para enfermedades donde el inflamasoma NLRP3 tiene una función crucial.

OBJETIVOS

En esta Tesis se han propuesto los siguientes objetivos:

1. Determinar y caracterizar la activación del inflamasoma NLRP3 con variantes patogénicas asociadas al síndrome CAPS.
2. Estudiar el efecto de inductores de NF- κ B en la activación de NLRP3 con variantes patogénicas asociadas a CAPS.
3. Estudiar la implicación de las deubiquitinasas en la activación de NLRP3 con variantes asociadas a CAPS.
4. Elucidar la función del inflamasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS en el inmunometabolismo de células mieloides.
5. Caracterizar el efecto de 4-octilitaconato en la activación del inflamasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS.
6. Identificar nuevos inhibidores de NLRP3 que sirvan de terapia para el síndrome CAPS.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

Los reactivos que se han usado en esta Tesis se encuentran resumidos en la siguiente tabla donde se indica su concentración o dilución de uso, la referencia y la casa comercial (**Tabla 2**).

Tabla 2. Listado de reactivos utilizados en los distintos ensayos.

Compuesto	Concentración/ Dilución	Referencia	Compañía
LPS serotipo 055:B5	1 µg/ml	L6529	Sigma-Aldrich
LPS serotipo 0111:B4	100 ng/ml	tIrl-3pelps	Invivogen
MCC950	10 µM	5.38120	Sigma-Aldrich
Doxiciclina	0.25, 0.5 y 1 µg/ml	D5207	Sigma-Aldrich
MSU	200 µg/ml	ALX-400-047	Enzo Life
ATP	5 Mm	11140965001	Sigma-Aldrich
Pam3CSK ₄	1 µg/ml	Tlrl-pms	Invivogen
Proteína IL-1Ra recombinante de ratón	100 ng/ml	HY-P72566	MedChemExpress
Proteína S100A9 recombinante de ratón	500 ng/ml	2065-S9	R&D Systems
Proteína IL-6 recombinante de ratón	500 ng/ml	RMIL6I	Invitrogen
Ácido Palmítico	1 Mm	P0500-25G	Sigma-Aldrich
Albúmina de Suero bovino (BSA)	10%	A8806	Sigma-Aldrich
Proteína S100A9 recombinante de humano	500 ng/ml	9254-s9	R&D Systems
Proteína IL-6 recombinante de humano	500 ng/ml	7270-IL/CF	R&D Systems
Proteína IL-1Ra recombinante de ratón	100 ng/ml	HY-P72566	MedChemExpress
Piruvato	10 mM	L064-100	Biowest
2-Desoxi-D-glucosa	0.1, 0.5 y 1 mM	14325	Cayman Chemical
Nigericina	10 µM	N7143	Sigma-Aldrich
PR-619	10 µM	16276	Cayman Chemical
b-AP15	5 µM	11324	Cayman Chemical

MATERIALES Y MÉTODOS

G5	5 µM	21006	Cayman Chemical
4-octilitaconato	50,100 y 200 µM	SML2338	Sigma-Aldrich
DMEM alto en glucosa	-	L0102	Biowest
Opti-MEM+ GluatMax	-	51985034	Gibco
Suero Bovino Fetal (FBS)	10%	S181-500	Biowest
Normocina	100 µg/ml	Ant-nr	Invivogen
Zeocina	200 µg/ml	Ant-zn	Invivogen
G418	1.5 mg/ml	329400010	Acros organic
Puomicina	6 µg/ml	P7255	Sigma-Aldrich
Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS)	1:10	14200-069	Gibco
Dimetil sulfóxido (DMSO)	10%	WAK-DMSO- 10	Wak-Chemie Medical GmbH
Penicilina/ Estreptomicina	-	DE17-602E	Lonza

1.2 Soluciones

Tampón E total

El tampón E total (ET) consiste en: HEPES 10 mM (Sigma-Aldrich), D-Glucosa 13 mM (PanReac AppliChem), CaCl₂ 2 mM (Sigma-Aldrich), MgCl₂ 2 mM (Sigma-Aldrich), KCl 2 mM (PanReac AppliChem) y NaCl 147 mM (PanReac AppliChem). El pH se ajustó a 7.4.

Tampón de lisis

El tampón de lisis consiste en: 50 mM Tris-HCl (pH=8.0), 150 mM NaCl, 2% Triton X-100, suplementado con 100 µl/ml del cóctel de inhibidor de proteasas, el cual inhibe las proteasas de serina, cisteína, las proteasas ácidas y las aminopeptidasas (P8340, Sigma-Aldrich).

Tampón fosfato salino

El tampón fosfato salino (PBS) está compuesto por NaCl (13.7 mM), KCl (2.7 mM), Na₂HPO₄ (0.01 M) y KH₂PO₄ (1.8 mM). Por último, el pH se ajustó a 7.4.

Tampón TBS-T

El tampón Tris salino, se preparó con Tris (50 mM), NaCl (150 mM) y 0.05% Tween.

Palmitato-BSA conjugado

El ácido palmítico se conjugó con BSA para formar palmitato-BSA, ya que este era más soluble para cultivo celular. Para formar palmitato-BSA se preparó una solución de NaOH 0.1M y una solución de BSA al 10%. Luego, se disolvió 0.1 gramos de ácido palmítico en NaOH 0.1M a 70°C y se conjugó con BSA al 10% a 55°C durante 10 min, para obtener una concentración final de 100 mM. Posteriormente, se ajustó el pH a 7.4, se filtró en una membrana de 0.22 µm y se hicieron alícuotas que se almacenaron a -20°C (Peng et al., 2018).

2. Muestras biológicas

2.1 Macrófagos inmortalizados de ratón

Se han empleado macrófagos inmortalizados de ratón deficientes en *Nlrp3* (*Nlrp3^{-/-}*), los cuales expresan bajo un sistema Tet-On inducible por doxiciclina (Clonotech Laboratories), NLRP3 silvestre humano o una de las distintas variantes patogénicas de NLRP3 utilizadas en esta Tesis (p.D303N, p.R260W o p.T348M). (Figura 12).

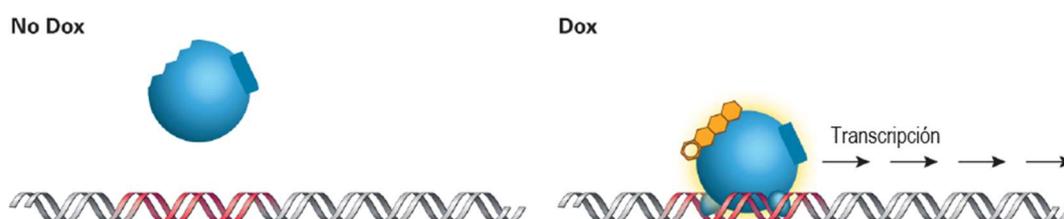


Figura 12. Esquema del sistema inducible por doxiciclina. El gen de interés está bajo el control de un promotor. En presencia de doxiciclina, la proteína transactivadora se une al promotor y promueve la transcripción del gen de interés. Imagen adaptada del protocolo Retro-X™ Tet-On® 3G Inducible Expression System (Clonotech Laboratories).

A continuación, se detalla el protocolo seguido para la obtención de los macrófagos de interés:

Las células Gryphon (Allele Biotechnology) se cultivaron con una densidad de 5×10^6 en un frasco T75 con medio DMEM alto en glucosa suplementado con 10% FBS durante 3 días a 37°C con 5% CO₂. Una vez la confluencia fue la adecuada, se

MATERIALES Y MÉTODOS

levantaron y se plaquearon 2×10^6 células/pocillo en una placa de 6 pocillos en medio DMEM alto en glucosa sin FBS durante 24 h. Pasadas las 24 h, se transfectaron con los vectores pRetroX-TRE3G que expresaban NLRP3 silvestre o las distintas variantes, usando Lipofectamina 2000 (Life Technologies) según las indicaciones del fabricante. Después de 24h de transfección, se retiró el medio y se añadió medio fresco. Pasadas 24 h, se recogió el sobrenadante con los retrovirus de segunda generación.

En paralelo a las células Gryphon, se cultivaron los macrófagos inmortalizados *Nlrp3^{-/-}* de ratón que contienen de forma estable el plásmido pRetroX-Tet3G. Estos se sembraron a una densidad de 5×10^6 en un frasco T75, en medio DMEM alto en glucosa suplementado con 10% FBS y antibiótico G418. Una vez obtenida la confluencia adecuada (85-95%), se plaquearon 0.4×10^6 células/pocillo en 1 ml de medio en una placa de 6 pocillos y se incubaron durante 24h. Sobre estas se añadieron cuidadosamente en cada pocillo 2 ml del sobrenadante con retrovirus obtenido de la transfección de las células Gryphon, y se incubaron durante 2 días para facilitar la transducción. Pasados los dos días, se retiró el sobrenadante y se añadió medio nuevo, esta vez, en presencia de los antibióticos puromicina y G418, para así seleccionar aquellas células que habían sido transducidas durante 3 días.

Una vez seleccionados los macrófagos transducidos con NLRP3 humano y sus variantes, o con retrovirus vacíos, se expandieron para poder utilizarlos en los distintos ensayos. Estos macrófagos se sembraron a una confluencia de 0.5×10^6 células/pocillo en 500 μ l de DMEM alto en glucosa en placas de 24 pocillos, y se trataron con distintas concentraciones de doxiciclina (0.25, 0.5 y 1 μ g/ml) para inducir la expresión de NLRP3 silvestre o sus variantes patogénicas, en presencia o ausencia de MCC950, ATP, MSU, LPS, Pam3CSK₄, S100A9, IL-6, palmitato o nigericina en diferentes concentraciones y tiempos de incubación, según se indica en las leyendas de las figuras. Estos macrófagos también se trataron con piruvato (10 mM), con 4-OI (50, 100 y 200 μ M), con los inhibidores de deubiquitinasa G5 (5 μ M), PR-619 (10 μ M) y b-AP15 (5 μ M), o con el inhibidor de la glicólisis 2-DG (0.1, 0.5 o 1 mM). Tras las incubaciones, se recogieron los sobrenadantes celulares y se centrifugaron a 600 xg durante 5 min a 4°C, obteniendo sobrenadantes libres de células, los cuales se utilizaron para la detección de distintas citoquinas y LDH. También se recogieron los extractos celulares, los cuales se lisaron en 25 μ l de tampón de lisis, durante 30 min en hielo y se centrifugaron a 13,000 xg durante 10 min a 4 °C, estos se utilizaron para detectar y cuantificar proteínas mediante la técnica de Western blot.

2.2 Células Raw-blue

Las células Raw-blue (cat. raw-sp, Invivogen) son una línea celular derivada de los macrófagos de ratón Raw 264.7 que expresan un gen reportero de fosfatasa alcalina embrionaria (SEAP) bajo el control del promotor del gen NF- κ B.

Las células Raw-Blue se cultivaron en medio DMEM alto en glucosa con FBS al 10% suplementado con normicina 100 μ g/ml y zeocina 200 μ g/ml a 37°C y 5% de CO₂, según las instrucciones del fabricante.

Para los ensayos realizados en esta Tesis, las células se sembraron en placas de 24 pocillos con una confluencia de 3.5×10^5 células/pocillo en 500 μ l de DMEM alto en glucosa más 10% de FBS y se incubaron durante 16 horas a 37°C y 5% de CO₂. Tras las 16 horas, se retiró el medio y se hizo un lavado con PBS, después se añadió 500 μ l/pocillo de DMEM alto en glucosa suplementado con ATP (5 mM), MSU (200 μ g/ml), LPS (100 ng/ml), Pam3CSK₄ (1 μ g/ml), S100A9 (500 ng/ml), IL-6 (500 ng/ml), o palmitato (1 mM) durante 4 horas. Además, las células se trataron con LPS (100 ng/ml) en presencia o ausencia de inhibidores de deubiquitinasa: G5 (5 μ M), PR-619 (10 μ M) y b-AP15 (5 μ M) durante 6 horas. Tras las diferentes incubaciones, se recogieron los sobrenadantes celulares, los cuales se centrifugaron a 600 xg durante 5 min a 4 °C y se obtuvieron sobrenadantes libres de células.

2.3 Muestras humanas

Recogida de muestras humanas

Las muestras de plasma y datos de humanos incluidos en este estudio se almacenaron en el Biobanco en Red de la Región de Murcia, BIOBANC-MUR, integrado en el Registro Nacional de Biobancos (B.0000859), tras el previo consentimiento informado de cada individuo. Estos se procesaron siguiendo los procedimientos operativos estándar con la correspondiente aprobación del Comité Ético del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia, España). Las muestras de sangre completa de donantes sanos ($n=9$) y de pacientes con síndrome periódico asociado a criopirina (CAPS) portadores de las variantes patogénicas de NLRP3 p.R260W ($n=1$), p.D303N ($n=1$), p.T348M ($n=1$) y p.A439T ($n=4$) en heterocigosis, se recogieron en tubos anticoagulados con EDTA. En el momento de la toma de muestra, los pacientes estaban bajo el tratamiento de bloqueantes de IL-1 (**Tabla 3**). En otros experimentos también se recogió muestras de sangre completa de individuos sanos ($n=4$) y de pacientes con fiebre mediterránea familiar (FMF) portadores de la variante patogénica

de *MEFV* p.M694I ($n=4$) en homocigosis, los cuales se encontraban en tratamiento en el momento de la toma de muestra (**Tabla 3**).

Tabla 3. Datos demográficos y clínicos de los individuos inscritos en esta Tesis.

	Donantes sanos	CAPS	FMF
N	13	7	4
Edad en años media (rango) \pm SD p valor	39.15 (23-59) \pm 12.01	51.85 (20-73) \pm 17.45 $p=0.07$	58.25 (47-77) \pm 14.36 $p=0.02$
Sexo, N (%)			
Hombre	4 (30.76)	5 (71.4)	2(50%)
Mujer	9 (69.23)	2 (28.6)	2(50%)
p valor		$p= 0.08^{ns}$	$p=0.48^{ns}$
Datos clínicos (solo pacientes CAPS o FMF)			
Variante de NLRP3, N (%)			
p.D303M	-	1 (14.3)	-
p.R260W	-	1 (14.3)	-
p.T348M	-	1 (14.3)	-
p.A439T	-	4 (57.1)	-
Variante de MEFV, N (%)			
p.M694I	-	-	4 (100%)
Fenotipo Clínico, N (%) (CAPS)			
MWS	-	6 (85.7)	-
MWS/CINCA	-	1 (14.3)	-
Tratamiento, N (%)			
Canakinumab	-	3 (43.9)	1 (25)
Anakinra	-	4 (57.1)	3 (75)
Colchicina	-		

Abreviaturas: CAPS: síndrome periódico asociado a criopirina; CINCA: Síndrome articular, cutáneo y neurológico crónico infantil; MWS: Síndrome de Muckle-Wells; FMF: fiebre mediterránea familiar; SD: desviación estándar; *ns*: no hay diferencia significativas ($p>0.05$). Se ha utilizado la prueba de Chi-cuadrado para el sexo y la prueba T para la edad.

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes y donantes sin enfermedad autoinflamatoria, se aislaron de la sangre completa mediante una separación en gradiente de densidad. La sangre completa se diluyó con PBS en una relación 1:1, luego se agregaron 15 ml de Ficoll (Histopaque-1077; Sigma-Aldrich, densidad 1.077 g/ml) en la cámara inferior de tubos de 50 ml (SepMate-50; StemCell) y la sangre diluida se agregó con cuidado sobre el Ficoll en la cámara superior de estos tubos. Después se centrifugó a 1,200 xg durante 10 min y se obtuvieron cuatro fases: (i) eritrocitos y células polimorfonucleares (capa inferior), (ii) Ficoll (capa intermedia sin células), (iii) PBMCs (capa intermedia con células de interés) y (iv) plasma (capa superior) (**Figura 13**).

El plasma se recogió y se almacenó en el Biobanco, mientras que la capa de PBMCs se extrajo mediante una pipeta Pasteur y se transfirió a un tubo de 50 ml al que se le añadió PBS hasta 50 ml. Luego las células se centrifugaron nuevamente a 300 xg durante 8 minutos, repitiendo este proceso dos veces más. Después de eso, se cuantificaron las PBMCs utilizando una cámara Bürker. Las células sobrantes se volvieron a centrifugar 433 xg durante 5 minutos, se resuspendieron en FBS más 10% de DMSO en critotubos (Corning), los cuales se congelaron a -80°C durante 24 h en un recipiente de congelación Mr. Frosty (Thermo Scientific™) que contenía etanol. Tras esta incubación se congelaron finalmente en N₂.

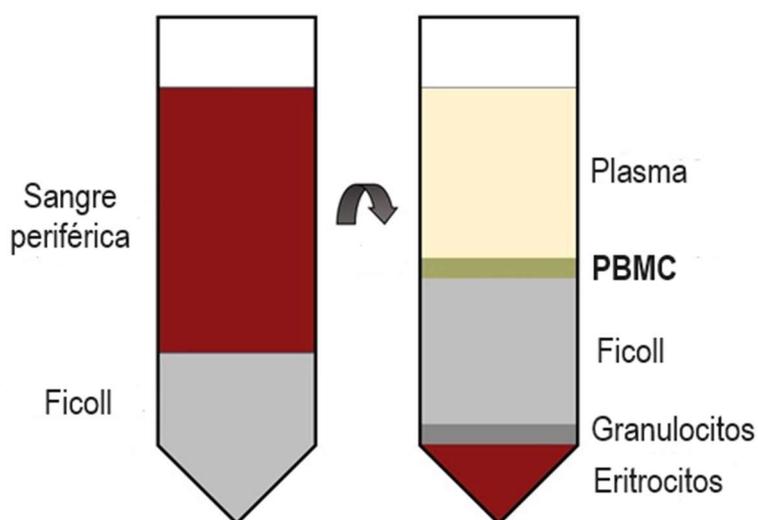


Figura 13. Separación en gradiente de densidad de sangre completa. El Ficoll permite una separación por gradiente de densidad. Tras la centrifugación se observan distintas capas: granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y eritrocitos, Ficoll, PBMCs y plasma (de abajo a arriba). Imagen adaptada de Ibian Technologies.

Estimulación de PBMCs

Las PBMCs se sembraron a una confluencia de 0.5×10^6 células/pocillo en placas de 24 pocillos con 500 μ l de medio Opti-MEM y se incubaron a 37°C con 5 % de CO₂. Las células se estimularon con LPS (100 ng/ml), Pam3CSK₄ (1 μ g/ml), proteína S100A9 recombinante de humano (500 ng/ml), proteína IL-6 recombinante de humano (500 ng/ml), palmitato (1 mM) y MCC950 (μ M) durante 2, 4 y 6 horas. En los experimentos en los que se usaron las muestras de pacientes FMF, las PBMCs se trataron con LPS (1.6 μ g/ml) durante 3 horas. Después de la estimulación, se recogieron los sobrenadantes celulares y se centrifugaron a 600 xg durante 5 min para obtener sobrenadantes libres de células.

Purificación de monocitos

Para el ensayo de metabolómica no dirigida se utilizaron monocitos, estos se asilaron de PBMCs previamente extraídas, mediante una selección positiva con anticuerpos anti-CD14 utilizando el kit MagniSort™ Human CD14 Positive Selection (Thermofisher) según las instrucciones del fabricante. Para ello, las PBMCs aisladas de la sangre se resuspendieron en 500 μ l de PBS suplementado con FBS (3%) y EDTA (10 mM) obteniendo una suspensión celular de hasta 1×10^7 células/100 μ l. La suspensión de PBMCs se trasladó a un tubo de citometría de flujo (BD), a esta se le añadió el anticuerpo-CD14 humano biotinilado (20 μ l/100 μ l de suspensión celular), el cual se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Después se les añadió hasta 4 ml PBS suplementado, se centrifugó a 300 xg durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Tras la centrifugación, las células se resuspendieron nuevamente en 500 μ l de PBS suplementado y se incubó junto a las perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina (300 μ l/100 μ l de suspensión celular) durante 10 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se añadieron hasta 2.5 ml de PBS suplementado, se insertó el tubo en el imán y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Tras la incubación se decantó el sobrenadante sin sacar el tubo del imán desechando así las células CD14-, mientras que las CD14+ quedaban unidas por el campo magnético. Las células restantes se resuspendieron en el PBS suplementado y este proceso se repitió hasta un total de 3 veces. En el último paso, las células se resuspendieron en 500 μ l de Opti-MEM y se cuantificaron. De este proceso se obtuvieron monocitos purificados con una pureza del 80-92%. Los monocitos se cultivaron con una confluencia de 2×10^6 en 1 ml de Opti-MEM en tubos de centrifuga de 15 ml a 37°C con 5% de CO₂. Estos se estimularon en presencia o ausencia de LPS (500 ng/ml) durante 2 h.

2.4 Células HEK293T

Para los ensayos BRET, citometría de flujo y microscopía de fluorescencia se utilizaron las células HEK293T (CRL-11268, *American Type Culture Collection*, ATCC) o las células HEK293T que expresan de forma estable NLRP3 humano (silvestre o con la variante p.D303N) unido a la proteína fluorescente amarilla (YFP) (Hafner-Bratkovič et al., 2018; Tapia-Abellán et al., 2019).

Estas células se cultivaron con medio DMEM /F-12 (1:1) (Lonza) suplementado con 10% de FBS, 2 mM GlutaMAX (Life Technologies) y 1% de penicilina-estreptomicina, en presencia del antibiótico G418 (0.3 mg/ml), a 37°C con 5% de CO₂. Para las transfecciones, se sembraron 7x10⁵ células/pocillo en 1 ml de medio en placas de 12 pocillos y se utilizó como agente transfectante Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según indicaban las instrucciones del fabricante. En las transfecciones de los ensayos BRET, se hizo una mezcla con 1 µg de ADN en 50 µl de Opti-MEM (tubo A) y otra mezcla con 3 µl de Lipofectamina 2000 en 50 µl de Opti-MEM (tubo B), ambos se incubaron 5 min. Tras esto, se mezcló el tubo A sobre el B y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Esta mezcla se añadió sobre las células cuidadosamente, las cuales se incubaron durante 24h a 37°C con 5% de CO₂. En cambio, para los ensayos de citometría de flujo se hizo una co-transfección de 0.1 µg de plásmido ASC-RFP y 0.1 µg de plásmido YFP-NLRP3-Luc o plásmido YFP-NLRP3 D303N-Luc.

Para los ensayos BRET y de citometría de flujo se utilizaron plásmidos creados previamente en el laboratorio que contenían NLRP3 humano silvestre o la variante p.D303N. Ambos contenían en su extremo C-terminal la proteína luciferasa (Luc) mientras que en su extremo N-terminal YFP. En citometría de flujo, además se usó el plásmido ASC que estaba unido a la proteína roja fluorescente (RFP).

Para los ensayos de microscopía se utilizaron las HEK293T que expresaban de forma estable NLRP3-YFP silvestre o la variante p.D303N, incubadas en presencia o ausencia de MCC950 (10 µM) o 4-OI (100 µM) durante 24h a 37°C con 5% de CO₂.

2.5 Macrófagos derivados de médula ósea

Para obtener los macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) de ratón, se sacrificaron ratones (C57BL/6) con CO₂ de los cuales se diseccionó la tibia y el fémur. La extracción de médula ósea fue mediante irrigación utilizando una jeringuilla con medio de diferenciación: DMEM alto en glucosa, 15 % FBS, 25 % de sobrenadante celular de la línea L929 (contiene M-CSF), 1% penicilina/ estreptomicina, 1% glutamina. La suspensión celular resultante se cultivó en placas Petri p150 (CellStar) en un volumen

de 20 ml a 37° C con 5% de CO₂. Dos días después, se agregaron 20 ml de medio de diferenciación y se volvió a incubar a 37°C con 5% de CO₂. Tras 6 días, las células se habían diferenciado a macrófagos y estaban listas para su uso. Para ello, se descartó el sobrenadante y se recogieron las células con la ayuda de un rascador manual y PBS frío. Esta suspensión se centrifugó a 400 xg durante 5 min y las células se resuspendieron en medio de sincronización (DMEM alto en glucosa, 20% de FBS y 1% penicilina/estreptomicina). Para los ensayos, se sembraron las células a una confluencia de 0.5x10⁶ o 2x10⁶ por pocillo en placas 24 y 6 pocillos respectivamente, con medio de sincronización a 37° con 5% de CO₂ durante 24h. Tras la incubación, las células se trataron con LPS (1 µg/ml) durante 4h. Transcurrido el tiempo, las células se lavaron con PBS atemperado, y se trataron con las diferentes moléculas análogas al MCC950 diluidas en ET durante 10 min a 37° C y 5% CO₂ a las concentraciones que se indican en las leyendas de las figuras. Sobre este sobrenadante, las células se trataron en presencia o ausencia de nigericina (5 µM) o ATP (3 mM) ambos durante 30 min. En otros experimentos las BDMDs se trataron con LPS (1 µg/ml) durante 4h, el sobrenadante se descartó, y se estimularon con sílice (50 µg/ml) diluido en Opti-MEM durante 6h. Una vez finalizadas las respectivas incubaciones, se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 600 xg durante 5 min a 4°C, obteniendo sobrenadantes libres de células, los cuales se utilizaron para la detección de citoquinas y LDH.

3. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es una técnica que sirve para detectar y cuantificar proteínas en función de una interacción antígeno-anticuerpo altamente específica. Las muestras que suelen usarse en esta técnica son: plasma, suero, lisados tisulares, lisados celulares o sobrenadantes celulares. En esta Tesis se usaron los sobrenadantes libres de células en los siguientes kits de ELISA tipo sándwich (**Tabla 4**) (**Figura 14**).

En primer lugar, se recubrió una placa de 96 pocillos con un anticuerpo primario (anticuerpo de captura, dilución 1:250) que reconoce la citoquina que queremos detectar, este anticuerpo se diluyó en un tampón que proporciona el propio kit y se incubó durante 16 horas a 4°C (dependiendo del Kit ELISA, tenemos que recubrir la placa con anticuerpo de captura o el kit tiene la placa recubierta *per se*, **Tabla 4**). Luego se lavó la placa con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo, se agregó el tampón de bloqueo (200 µl/pocillo) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, se volvió a lavar, se agregaron las muestras diluidas y se incubó la placa

MATERIALES Y MÉTODOS

durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiraron las muestras, se lavó la placa para eliminar el exceso de muestra, y se utilizó un anticuerpo primario de detección para unirse a nuestra citoquina de interés (dilución 1:250). Tras la incubación, la placa se lavó para eliminar el exceso de anticuerpo de detección y se añadió el anticuerpo conjugado con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP)-avidina (dilución 1:100) durante 30 min a temperatura ambiente. Tras la incubación y el lavado del anticuerpo secundario, se añadió como sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (100 µl/pocillo), el cual se incubó durante 10-30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Luego se agregaron 50-100 µl de solución de parada (H₂SO₄ 2N), y se midió la absorbancia a 450 nm y 620 nm en un lector de placas Synergy Mx (BioTek).

Tabla 4. Kits ELISA que se han utilizado en esta Tesis.

Kit ELISA	Placa Pretratada	Dilución de las muestras	Referencia/ Compañía
Cistatina B de ratón	Si	1:100	orb565550 (Biorbyt)
Catepsina B de ratón	Si	1:2	ab119585 (Abcam)
CD206 (MMR) de ratón	Si	1:2	orb546630 (Biorbyt)
CD14 de ratón	No	1:20	D4982 (R&D Systems)
Anexina A1 de ratón	Si	1:2	ab264613 (Abcam)
HMGB1 de ratón/rata	Si	Sin diluir	ARG81310096 (ARIGO)
P2RX7 de ratón	Si	1:2	OKEH05605 (Aviva System Biology)
IL-1β de ratón	No	1:5	88-7013-22 (Invitrogen)
TNF-α de ratón	No	1:4	88-7324-22 (Invitrogen)
IL-18 de ratón	Si	1:2	BMS618-3 (Invitrogen)
IL-1α de ratón	Si	1:2	MLA00 (R&D Systems)
IL-1β de humano	Si	Sin diluir	BMS224INST (Invitrogen)
TNF-α de humano	Si	1:10	DTA00D (R&D Systems)
Galectina-3 de humano	Si	Sin diluir	7620 (MBL)
IL-18 de humano	Si	Sin diluir	BMS279-4 (Invitrogen)

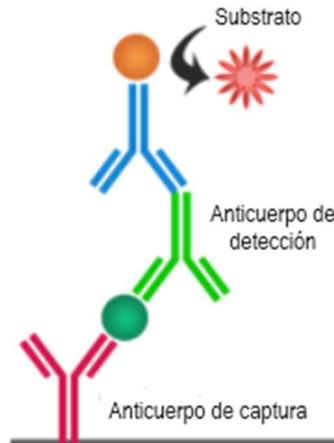


Figura 14. Representación de ELISA tipo sándwich. El anticuerpo de captura (en rojo) unido a la placa y el anticuerpo de detección (en verde) se unen específicamente a la proteína de interés formando un sándwich. Otro anticuerpo con la enzima detecta el sándwich (en azul), el cual en presencia de sustrato produce un cambio medible, normalmente colorimétrico. Imagen adaptada de la web Abyntek.

4. Western blot

La técnica de Western blot sirve para detectar, cuantificar, conocer el tamaño y la expresión de proteínas específicas en una muestra biológica. En esta técnica las proteínas se separan por tamaño en una electroforesis, después se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o PVDF, y mediante un anticuerpo de interés podemos detectar si la proteína está presente o no en esa muestra.

Preparación de las muestras

Tras las respectivas estimulaciones, las células se lisaron en tampón de lisis durante 30 min en hielo y se centrifugaron a 13,000 xg durante 10 min a 4°C. La cantidad de proteína se cuantificó en los lisados celulares mediante el ensayo de Bradford (Sigma-Aldrich), y los resultados se midieron en un lector de placas Synergy Mx (BioTek) a 595 nm. También se recogieron los sobrenadantes celulares que se centrifugaron a 600 xg durante 5 min a 4 °C, y estos mismos se concentraron usando una columna 10 kDa (UFC501024, Merk-Millipore). Posteriormente, los lisados celulares y los sobrenadantes concentrados se desnaturalizaron con tampón Laemmli diluido 1:1 (Sigma-Aldrich) y se calentaron a 95°C durante 5 min, cargándose finalmente 40 µg de proteína por calle para los lisados celulares o de 0.5 a 1 ml de sobrenadantes concentrados en los pocillos de un gel de acrilamida.

Preparación del gel de acrilamida

Para la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida se preparó una solución de acrilamida/bisacrilamida 19:1 (Sigma Aldrich) combinada con agua destilada obteniendo así geles de separación al 12%. El gel separador contenía Tris-HCl 3M (pH 8.8) permitiendo el movimiento de las proteínas a través del gel en función de su tamaño, mientras que la fase concentradora se añadió encima de la fase separadora, esta contenía Tris-HCl a 0.5 M (pH 6.8), y mantenía la muestra en un estado de baja conductividad. A estos geles se le agregó dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% para proporcionar una carga negativa a las proteínas, permitiendo así su movimiento a través del gel del cátodo al ánodo dependiendo únicamente del tamaño de la proteína. Luego se agregó al gel persulfato de amonio al 20% (Sigma-Aldrich) y tetrametiletilendiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich) para iniciar la reacción de polimerización.

Los geles de poliacrilamida se prepararon con un espesor de 1.5 mm para sobrenadantes y 0.75 mm para lisados celulares utilizando el sistema Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad). Después de 30 min de incubación y solidificación del gel de separación, se añadió gel concentrador con peines de 10 pocillos de electroforesis Mini-PROTEAN (Bio-Rad). Una vez solidificado, se retiraron los peines, se colocó el gel en la cubeta de electroforesis Mini-PROTEAN y se cargaron las muestras.

Electroforesis y transferencia de proteínas

Las muestras se cargaron en los diferentes pocillos de gel junto a un marcador de peso molecular (BenchMark, Life Technologies). La electroforesis se realizó a 200 V durante 50 min utilizando una fuente de alimentación de Bio-Rad.

Tras la electroforesis, los geles se colocaron sobre una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad), se envolvieron con papel de filtro Whatman® y almohadillas de espuma, y se colocaron en casetes de soporte (Bio-Rad). La transferencia se realizó a voltaje constante 350 mA durante 1 hora en frío utilizando una fuente de alimentación de Bio-Rad.

Marcaje con anticuerpos y detección bioluminiscente

Las membranas de nitrocelulosa ya transferidas se bloquearon con leche al 5% diluida en el tampón TBS con Tween al 0.05% (T-TBS) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Tras la incubación, los anticuerpos primarios se diluyeron en leche al 5% con T-TBS y se incubaron 16 horas a 4°C (**Tabla 5**). A continuación, la membrana se lavó 3 veces con T-TBS durante 10 min cada lavado en agitación, para eliminar los anticuerpos no unidos, y se incubó con un anticuerpo secundario conjugado

con HRP diluido 1:5000 en leche al 5% con T-TBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron de nuevo y se revelaron usando el reactivo ECL Plus (Cytiva) en un ChemiDoc Imaging System (BioRad).

Tabla 5. Anticuerpos y diluciones utilizadas en la técnica de Western Blot.

Anticuerpo/ especificidad	Dilución	Tipo de anticuerpo	Referencia/ Compañía
anti-NLPR3 (ratón, humano)	1:1000	Monoclonal, clon Cryo-2	AG-20B-0014 (Adipogen)
anti-Caspasa-1(p20) (ratón)	1:1000	Monoclonal, clon Casper-1	AG-20B-0042 (Adipogen)
anti-GSDMD (ratón)	1:2500	Monoclonal, clon EPR19828	ab209845 (Abcam)
anti-IL-1 β (ratón, humano)	1:1000	Policlonal	sc-7884 (Santa Cruz)
anti- β -actina-(HRP) (ratón, rata, humano)	1:10000	Monoclonal, clon C4	sc-47778 (Santa Cruz)
anti-IgG-(HRP) (conejo)	1:5000	Policlonal	NA9340V (Cytiva)
anti-IgG-(HRP) (ratón)	1:5000	Policlonal	NA9341V (Cytiva)

5. Microscopía

5.1 Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica de inmunomarcaje utilizada para detectar proteínas a través de anticuerpos que han sido conjugados con fluoróforos, esto permite evaluar la localización y los niveles de expresión de proteínas de interés en el microscopio de fluorescencia.

En esta Tesis, se ha utilizado la inmunofluorescencia para analizar la activación del inflammasoma NLRP3 a través de la formación de oligómeros de ASC. Para ello, se utilizaron las células de macrófagos inmortalizados de ratón *Nlrp3*^{-/-} que expresaban NLRP3 silvestre o la variante patogénica p.D303N. Estas células se plaquearon sobre cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina (Corning) con una confluencia de 10⁵ células/cubreobjeto en placas de 24 pocillos.

Tras la estimulación, las células se lavaron una vez con PBS estéril (Gibco), se fijaron durante 15 min a temperatura ambiente con paraformaldehído al 4% (Electron Microscopy Sciences) y se lavaron nuevamente con PBS cuatro veces. Posteriormente, las células se bloquearon con BSA al 0.5 % (Sigma-Aldrich) y se permeabilizaron con Tritón-X100 al 0.1% (Sigma-Aldrich) durante 40 min a temperatura ambiente. A continuación, las células se incubaron durante 16 horas a 4°C con el anticuerpo policlonal primario de conejo anti-ASC (N-15)-R (sc-22514-R, Santa Cruz, 1:500). Para eliminar el exceso de anticuerpo, las células se lavaron tres veces durante 10 min cada una y luego se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario anti-conejo alexa-647 (1:800, A31573, Life Technologies). Nuevamente, las células se lavaron tres veces durante 10 minutos cada una, para eliminar el exceso de anticuerpo secundario y los núcleos se tiñeron con DAPI (1:10000) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con medio de montaje (Dako). Las imágenes se adquirieron con un microscopio Nikon Eclipse Ti equipado con un objetivo Plan Fluor de 20×S (apertura numérica, 0.45) y una cámara digital Sight DS-QiMc (Nikon) equipada con filtros de excitación/emisión de 387 nm/447 nm, 543 nm/593 nm (Semrock). El software que se utilizó para adquirir las imágenes fue el NIS-Elements AR (Nikon) y las imágenes se analizaron con ImageJ (Institutos Nacionales de Salud de EE. UU.). La cuantificación de los oligómeros de ASC en macrófagos se realizó en 4 campos de visión por condición y en $n=3$ experimentos diferentes, contando al menos un total de 1100 células por condición.

5.2 Microscopía de fluorescencia en HEK293T

La microscopía de fluorescencia se utilizó para analizar la presencia de un patrón punteado de NLRP3 como indicador de su activación (Tapia-Abellán et al., 2019). Para ello, se sembraron 2×10^6 de células HEK293T que expresaban de forma estable NLRP3 silvestre o la variante p.D303N, ambas fusionadas a la YFP, en una placa de 6 pocillos. Tras esto, las células se trataron con MCC950 (10 μ M) o 4-OI (100 μ M) durante 24 horas a 37°C con 5% CO₂.

Las imágenes se adquirieron con un microscopio Nikon Eclipse Ti equipado con un objetivo 20× S Plan Fluor (apertura numérica, 0.45) y una cámara digital Sight DS-QiMc (Nikon) empleando los filtros de excitación/emisión de 472 nm/520 nm (Semrock). El software que se utilizó para capturar las imágenes fue NIS-Elements AR (Nikon) y las imágenes se analizaron con ImageJ (Institutos Nacionales de Salud de EE. UU.). La cuantificación se realizó en 4 campos de visión por condición y en $n=3$ experimentos diferentes, contando al menos un total de 1800 células por condición.

6. Citometría de flujo

6.1 Detección de oligómeros de ASC en monocitos humanos

La sangre completa de los individuos sanos y pacientes con CAPS o FMF se usó para medir la formación de oligómeros de ASC intracelular en los monocitos humanos. En primer lugar, se puso 50 µl de sangre de cada individuo en tubos de citometría de flujo (BD) de poliestireno con 450 µl de medio RPMI 1640 (Lonza) suplementado con FBS 10% y Glutamax 2 mM. La sangre diluida se estimuló con LPS (100 ng/ml), Pam3CSK₄ (1 µg/ml), proteína S100A9 recombinante de humano (500 ng/ml), proteína IL-6 recombinante de humano (500 ng/ml), palmitato (1 mM) y/o MCC950 (10 µM) durante 2, 4 y 6 horas. La sangre también se estimuló con los inhibidores de deubiquitinasa G5 y b-AP15 (ambos a 5 µM) en ausencia o presencia de LPS (100 ng/ml) durante 6 horas. En los experimentos en los que se usaron las muestras de pacientes FMF, la sangre diluida se estimuló con LPS (1.6 µg/ml) durante 3 horas.

Tras la estimulación, los tubos se centrifugaron a 600 xg durante 3 min, y los sobrenadantes se desecharon. Las células se resuspendieron en 100 µl de tampón de citometría (PBS con 1% de FCS y 0.1% de azida de sodio) con el anticuerpo de superficie anti-CD14 monoclonal de ratón conjugado con FITC (clon M5E2, 557153, BD Biosciences, 1:10), y se incubaron durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Tras la incubación, los tubos se lavaron con 500 µl de tampón de citometría, se centrifugaron a 600 xg durante 3 min y los sobrenadantes se descartaron nuevamente. Luego, las células se fijaron con 500 µl de BD FACS Lysing Solution (diluido 1:10) durante 10 min en oscuridad y en frío. Tras la incubación, los tubos se centrifugaron 600 xg durante 3 min, se lavaron con tampón de citometría y se centrifugaron a 600 xg durante 3 min nuevamente.

A continuación, las células se marcaron para la detección de oligómeros de ASC, para ello las células se resuspendieron en 250 µl de tampón de permeabilización (PBS con 3 % de FBS, 0.1 % de azida sódica y 0.1 % de saponina). Sobre este, se añadieron 250 µl de una dilución 1:500 de anticuerpo anti-ASC monoclonal de ratón conjugado con PE (clon HASC-71,653903, Biolegend) obteniendo así una dilución final de 1:1000, los tubos se incubaron 45 min en oscuridad a temperatura ambiente. Tras esta, los tubos se centrifugaron a 600 xg durante 3 min y finalmente, las células se resuspendieron en 500 µl de tampón de citometría.

La presencia de oligómeros de ASC en los monocitos se midió según el procedimiento TOFIE (evaluación del inflamasma en tiempo de vuelo) previamente

descrito (Sester et al., 2015), utilizando el citómetro de flujo FACS Canto (BD Biosciences) y el software FCS express (De Novo Software) con la ayuda de Laura Hurtado-Navarro (Hurtado-Navarro et al., 2022). Las células se seleccionaron mediante 3 cuadrantes, en el primer cuadrante se seleccionaron las células de un solo núcleo (del inglés *singletes*) desechando también las células muertas y obteniendo así las PBMCs mediante los parámetros de dispersión frontal (FSC) de altura y área, en el segundo cuadrante se seleccionaron los monocitos mediante el anticuerpo específico anti-CD14-FITC del total de PBMCs, por último, en el tercer cuadrante se seleccionaron aquellos monocitos que tenían oligómeros de ASC, mediante el anticuerpo específico anti-ASC-PE.

6.2 Detección de oligómeros de ASC en HEK293T

La citometría de flujo también se utilizó para medir los oligómeros de ASC-RFP en las células HEK293T co-transfectadas como se ha indicado en la sección 2.4. Tras 24h de incubación, se midieron los oligómeros mediante TOFIE donde se seleccionaba la población de células doble positivas (ASC-RFP y NLRP3-YFP), con una expresión baja de ambos para evitar así la oligomerización inespecífica.

Las células HEK293T se analizaron por citometría de flujo utilizando LSRFortessa (BD Biosciences), y el software FCS express (De Novo Software) con la ayuda de Laura Hurtado-Navarro (Hurtado-Navarro et al., 2022).

7. Ensayo de lactato deshidrogenasa

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) es una proteína tetramérica citoplasmática de la glicólisis que puede aparecer en los sobrenadantes celulares como marcador de la permeabilización de la membrana plasmática y de muerte celular necrótica, como ocurre durante la piroptosis. Para detectar el LDH se utilizó el kit de detección de citotoxicidad (Roche) según las instrucciones del fabricante. La actividad de LDH se determinó mediante una prueba enzimática, donde primero NAD^+ se reduce a NADH/H^+ por la conversión de lactato a piruvato catalizada por LDH, y después el catalizador diaforasa transfiere 2H^+ de NADH/H^+ a la sal de tetrazolio de color amarillo que se reduce a formazán produciendo un cambio de color a rojo (**Figura 15**).

La cantidad de LDH se cuantificó en sobrenadantes libres de células, los cuales se diluyeron 1:4 en tampón ET. Como control positivo se utilizaron los lisados celulares de las células no tratadas diluidas 1:20 en el mismo tampón. Sobre las muestras se añadió 100 μl de reactivo de detección y la reacción se leyó en un lector de placas

Synergy Mx (BioTek) a 492 nm y corregido a 620 nm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

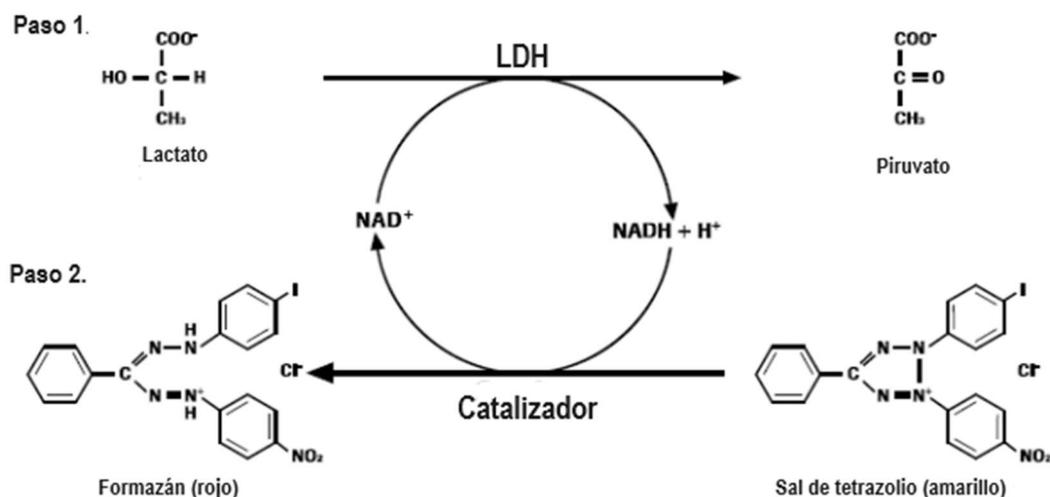


Figura 15. Representación del método de detección de LDH. Imagen adaptada del protocolo del kit de citotoxicidad de Roche.

8. Determinación de L-lactato

Para medir la glicólisis se cuantificó la presencia de L-lactato. En este ensayo también se evaluó la reducción de formazán dependiente de la enzima LDH la cual oxida el lactato a piruvato y NADH, de manera que la cantidad de L-Lactato detectado es directamente proporcional a la tasa glicolítica de las células. Para cuantificarlo, se usaron los sobrenadantes libres de células utilizando el kit de ensayo glicolítico (BA0086, Assay Genie) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se midieron en un lector de placas Synergy Mx (BioTek) a 565 nm.

9. Ensayo reportero de NF- κ B

Para determinar la activación de NF- κ B se usaron los sobrenadantes libres de células procedentes de las células Raw-blue (apartado 2.2). Estas tienen la capacidad de liberar al medio proteína fosfatasa alcalina embrionaria (SEAP) cuando hay una activación de NF- κ B.

La SEAP se midió mediante un ensayo enzimático colorimétrico utilizando el reactivo QUANTI-Blue™ (rep-qbs, Invivogen). En este ensayo la solución QUANTI-Blue™ cambia de color rosa a azul-púrpura en presencia de SEAP. Para ello, se utilizaron 20 μ l de los sobrenadantes que se mezclaron con 180 μ l de la solución

QUANTI-Blue™ en una placa de 96 pocillos incubada durante 4 horas a 37°C. Finalmente, la reacción se leyó en el lector de placas Synergy Mx (BioTek) a 622 nm.

10. Determinación de la expresión de ARNm

Para la determinación de la expresión génica se aisló el ARN total de las células mediante el kit RNeasy (74104, Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, tras la incubación, las células se lavaron una vez con PBS, sobre ellas se añadieron 350 µl de tampón de lisis que contenía el propio kit suplementado con 2-mercaptoetanol al 1%, y se extrajo el lisado celular usando un rascador. A continuación, se obtuvo el ARN de la muestra utilizando una columna de membrana de sílice y eliminando el ADN mediante ADNasa (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por último, las muestras de ARN se cuantificaron en un lector de absorbancia NanoDrop 2000 (ThermoFisher).

El siguiente paso fue convertir el ARN total en ADN complementario (ADNc) mediante una reacción de transcripción inversa utilizando el kit iScript cDNA Synthesis (1708891, BioRad). Para la conversión a ADNc, se usaron los siguientes compuestos: 1000 ng de ARN, 4 µl de mezcla de iScript reaction mix, la cual contiene cebadores aleatorios que permite la transcripción de todo el ARN, 1 µl de la enzima transcriptasa inversa y agua hasta un volumen final de 20 µl. La reacción se llevó a cabo en el termociclador Prime Thermal Cycler (Techne) con el siguiente protocolo: 25°C durante 5 min, 46°C durante 20 min y 95°C durante 1 min y luego se enfrió a 4°C.

Por último, se midió la expresión de determinados genes mediante PCR cuantitativa (qPCR), para ello se utilizó el compuesto intercalante SYBER GREEN (SYBR Premix ExTaq, Takara) y los cebadores KiCqStart prediseñados (Sigma-Aldrich) de los siguientes genes de ratón: *Il1b*, *Tnf*, *Il18*, *Pycard*, *Gsdmd*, *Nlrp3*, *Nek7* y *Casp1*, la expresión génica se normalizó con *Gapdh* como control endógeno. La reacción se llevó a cabo en un termociclador iCycler MyiQ thermocycler (Bio-Rad) con el siguiente protocolo: 95°C durante 10 seg, y 40 ciclos a 95°C durante 10 seg seguido de 60°C durante 20 seg, finalmente la reacción se enfrió a 4°C.

Para determinar los niveles de expresión de los genes de interés se hizo una cuantificación relativa de los mismos. Este método compara el valor del umbral de ciclo (C_t) de un gen objetivo con otro de referencia (en este caso *Gapdh*) mediante el empleo de la siguiente fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{tratamiento}) - \Delta Ct (\text{control})$$

$$\text{Expresión génica relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

11. Análisis de transcriptoma

Los datos de secuenciación de ARN se obtuvieron de la base de datos GEO (del inglés *Gene Expression Omnibus*) de NCBI. En este estudio se usaron 3 repositorios, uno de ellos contenía datos de células sanguíneas de donantes sanos pediátricos ($n=5$) y de pacientes CAPS portadores de la variante patogénica NLRP3 p.G569R (NOMID/CINCA) que se encontraban en episodio inflamatorio ($n=7$), y de estos mismos pacientes con la enfermedad inactiva tras el tratamiento con anakinra (GSE57253) (Canna et al., 2014). Para el análisis de expresión génica diferencial de genes inflamatorios y metabólicos se utilizó el paquete DESeq2 (R studio, Posit, PBC). El segundo repositorio, contenía datos de secuenciación de PBMCs de donantes sanos ($n=26-30$) tratadas *in vitro* en ausencia o presencia de LPS (10 ng/ml) durante 4 h (GSE42606) (Smeekens et al., 2013), el análisis de expresión génica diferencial para genes inflamatorios se llevó a cabo utilizando la herramienta GEO2R con el paquete Limma (R studio, Posit, PBC). El tercer repositorio, contenía datos de células sanguíneas de donantes sanos ($n=6$); pacientes CAPS con enfermedad activa ($n=3$) con las siguientes variantes de NLRP3, dos p.G569R y uno p.L632F; y pacientes FMF con enfermedad activa ($n=2$) con las siguientes variantes de MEFV, p.M694V/p.E148Q y p.M694del (GSE17732) (Stojanov et al., 2011). Para el análisis de expresión génica diferencial se utilizó la herramienta GEO2R con el paquete Limma (R studio, Posit, PBC).

Para el estudio de transcriptómica se utilizó el ARN total de macrófagos inmortalizados de ratón *Nlrp3*^{-/-} que expresaban NLRP3 silvestre o NLRP3 p.D303N, tratados o no con doxiciclina (1 µg/ml), LPS (100 ng/ml) y MCC950 (10 µM) durante 16 h. El ARN total se extrajo utilizando el kit RNeasy (74104, Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la extracción, el ARN total se cuantificó con Qubit RNA BR Assay (Invitrogen) y su integridad se analizó con TapeStation 4200 (Agilent Technologies) donde todas las muestras mostraban un índice de integridad de RIN >8. Para la síntesis de ADNc y la generación de librerías se utilizó el kit Stranded mRNA Prep (Illumina) siguiendo las instrucciones del fabricante, estas se secuenciaron en NextSeq 2000 Sequencing Systems (Illumina). Para obtener el análisis de expresión génica diferencial entre dos grupos, los resultados de secuenciación se analizaron utilizando el paquete DESeq2 (R studio, Posit, PBC). Además, para representaciones de varios grupos, todos los datos se normalizaron utilizando la función vst de DESeq2.

El análisis de enriquecimiento GO (ontología de genes) se llevó a cabo utilizando la herramienta DAVID v2021 (Huang et al., 2009; Sherman et al., 2022), la cual utiliza el método Benjamini-Hochberg para obtener valores de p ajustados. En este caso, se consideraron que los grupos de genes con un valor p ajustado <0.05 se enriquecían significativamente. Los datos generados en este estudio están depositados en GEO, con el número de acceso GSE246713.

12. Detección de metabolismo a tiempo real

La técnica de Seahorse (Agilent Technologies) permite analizar el metabolismo a tiempo real en células vivas, midiendo el consumo de oxígeno (OCR) y la acidificación del medio (ECAR).

El ensayo de Seahorse se utilizó para evaluar la glicólisis, la respiración mitocondrial y la producción de ATP en macrófagos inmortalizados de ratón *Nlrp3^{-/-}* que expresaban NLRP3 silvestre o la variante patogénica p.D303N. Para ello, se sembraron 2.5×10^5 células/pocillo en una placa Seahorse de 96 pocillos adherente (Agilent Technologies). Las células se cultivaron en DMEM alto en glucosa (Biowest) sin FBS y se trataron con doxiciclina (1 $\mu\text{g/ml}$), LPS (100 ng/ml) y MCC950 (10 μM), IL1Ra (100 ng/ml) o 2-DG (0.1, 0.5 y 1 mM) durante 4h o 16h a 37°C y 5% de CO_2 , según se indica en las leyendas de las figuras. Tras la incubación, se descartó el medio y las células se incubaron con 180 μl de medio DMEM Seahorse suplementado con glucosa 5 mM , piruvato 1 mM y glutamina 2 mM (Agilent Technologies) durante 45 min a 37°C y sin CO_2 . Para determinar la glicólisis, la respiración mitocondrial y la producción de ATP se usaron los siguientes kits: *Glycolytic Rate Assay* (103344-100, Agilent Technologies), *ATP real-time rate assay* (103592-100, Agilent Technologies), y *Cell Mito-Stress* (103015-100, Agilent Technologies) según las instrucciones del fabricante. La lectura se realizó en un XF96e Analyzer (Agilent Technologies) con el software Wave versión 2.6 (Agilent Technologies). Para normalizar los datos obtenidos de OCR y ECAR con el número de células, los núcleos se tiñeron con una solución de Hoechst a 3 mM (B2261, Sigma-Aldrich) (**Figura 16**).

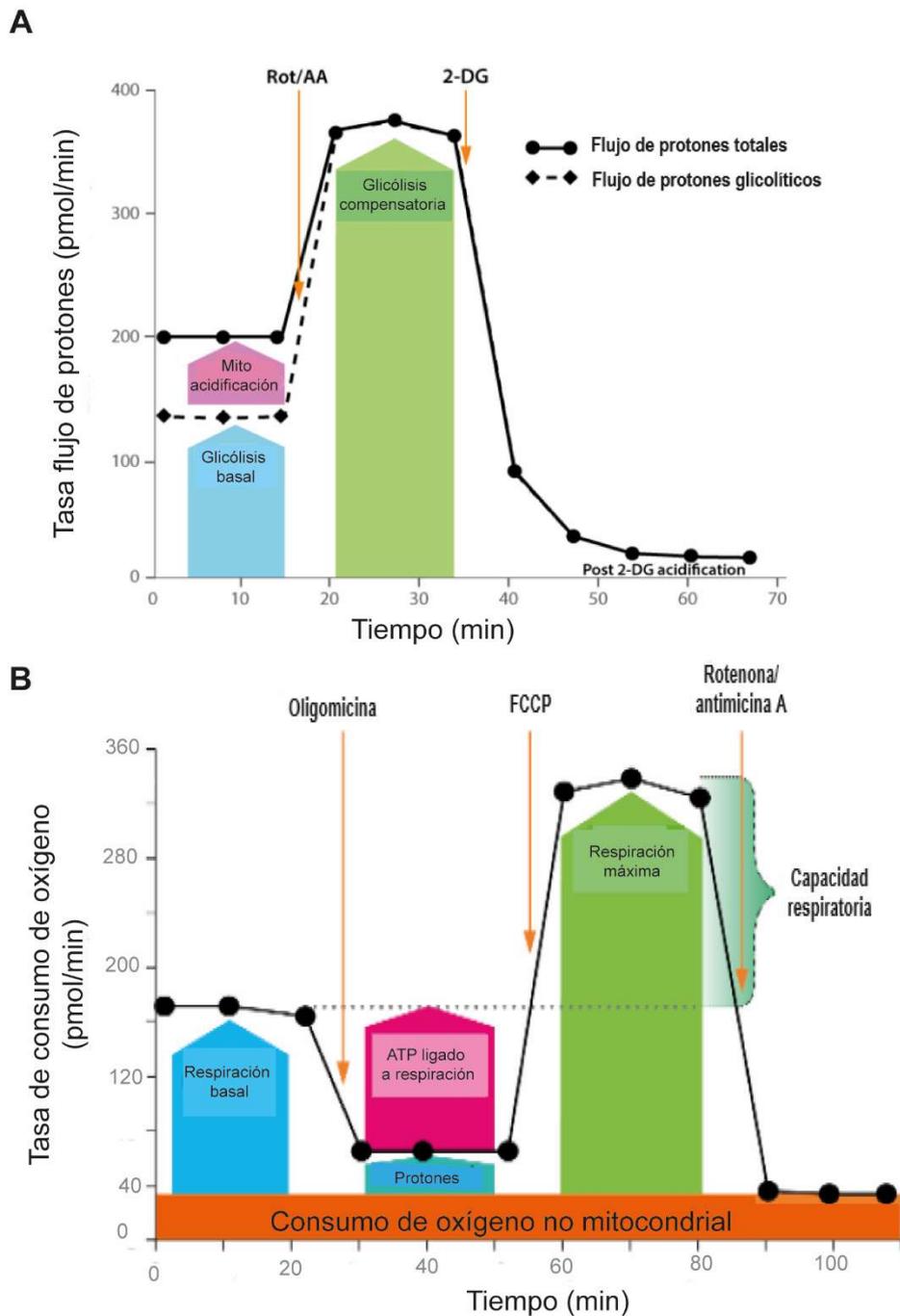


Figura 16. Representación de los resultados de Seahorse. (A) Representación del kit *Glycolytic Rate Assay*, sirve para medir la capacidad glicolítica, en este se inyectan los inhibidores rotenona/antimicina A (Rot/AA) que bloquean el complejo I y III de ECT, y 2-DG que bloquea a hexoquinasa. Aquí se obtienen resultados de la glicólisis basal y compensatoria una vez que se bloquea la mitocondria. **(B)** Representación del kit *Cell Mito-Stress*, sirve para medir la respiración mitocondrial, en este se inyectan los inhibidores oligomicina que bloquea la ATPsintasa, FCCP que bloquea el flujo de protones, y por último Rot/AA. Aquí se obtienen varios parámetros siendo los más relevantes para esta Tesis la respiración basal y la respiración máxima. Imagen adaptada la guía del Kit *Glycolytic Rate Assay* y *Cell Mito-Stress* (Agilent Technologies).

13. Estudio metabolómico

13.1 Estudio metabolómico no dirigido

Procesamiento de las muestras

En el estudio metabólico se utilizaron monocitos purificados de donantes sanos ($n=4$) y de pacientes CAPS portadores de la variante de NLRP3 p.A439T ($n=4$) tratados o no con LPS (500 ng/ml) durante 2h. También se utilizaron macrófagos inmortalizados de ratón *Nlrp3*^{-/-} que no expresaban o expresaban NLRP3 con la variante patogénica p.D303N, estos fueron tratados con doxiciclina (1 µg/ml) durante 16h y luego con LPS (100 ng/ml) durante 4h. En ambos casos, se realizó en paralelo un cultivo control sin células. Tras la estimulación, las células se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 2 ml (monocitos) u 800 µl (macrófagos) de metanol (PanReac AppliChem) para obtener metabolitos polares. Las muestras se homogeneizaron en un vórtex durante 1 min y luego se centrifugaron durante 10 min a 6000 xg y 4 °C (Thermo Scientific). El sobrenadante resultante se filtró a través de un filtro de PVDF de 0.22 µm antes de la inyección en el sistema UPLC-ESI-QTOF-MS (cromatografía líquida de alto rendimiento-ionización por electroespray-cuadrupolo tiempo de vuelo-espectrometría de masas).

Análisis metabolómico UPLC-ESI-QTOF-MS

Los análisis se realizaron con un sistema Agilent 1290 Infinity LC system acoplado a 6550 *Accurate-Mass Quadrupole time-of-flight* (QTOF) (Agilent Technologies) utilizando una interfaz de electroespray (Jet Stream Technology). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna C18 de fase reversa (Poroshell 120, 3× 100 mm, tamaño de poro de 2.7 µm) a 30 °C, utilizando agua con ácido fórmico al 0.1 % (Fase A) y acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1 % (Fase B) como fases móviles con un caudal de 0.4 ml/min. Se utilizó el siguiente gradiente: 0-10 min, 1-18% fase-B; 10-16 min, 18-38 % fase B; 16-22 min, 38-95 % fase B. Finalmente, el contenido de la fase B alcanzó las condiciones iniciales (1%) durante 1 min y luego se reequilibró la columna durante 5 min. El analizador de masas se usó en las siguientes condiciones: temperatura del gas 180°C, gas de secado 12 l/min, presión del nebulizador 45 psig, temperatura del gas envolvente 350°C, flujo del gas envolvente 11 L/min, voltaje capilar 3500 V, boquilla voltaje 250 V, voltaje del fragmentador 350 V y voltaje de radiofrecuencia octapolar 250 V.

Los datos se adquirieron en el rango m/z de 50-1700 a una velocidad de 2 espectros/s y en polaridades negativas y positivas. Los archivos de los datos sin

procesar se adquirieron mediante el sistema UPLC-ESI-QTOF-MS y se exportaron al software MZmine (Versión 2.53, © 2005-2015 MZmine Development Team) para crear una matriz de datos. Los datos sin procesar generados de ambas polaridades se preprocesaron por separado mediante un conjunto de parámetros por lotes que incluye la detección de masas, el generador de cromatogramas y el algoritmo de deconvolución y alineación. Luego, MZmine fusionó las matrices de datos y las exportó a Mass Profiler professional (MPP, Agilent technologies) y a la plataforma en línea Metaboanalyst 5.0 (www.metaboanalyst.ca). Las matrices de datos se procesaron incluyendo la transformación logarítmica y el escalado automático antes del análisis univariante y multivariante. Se realizó el análisis de componentes principales (PCA) multivariante para estudiar la variación de los datos y evaluar las tendencias de los grupos. Por otro lado, el análisis univariante se realizó mediante el software MPP después de la evaluación del análisis multivariante. El tratamiento de datos a través del software MPP incluyó filtros por frecuencia de la matriz de datos para reducir la variabilidad de la muestra dentro de cada grupo de estudio. Para filtrar entidades significativas a lo largo de las diferentes muestras y grupos, se utilizaron análisis estadísticos de ANOVA y prueba T sobre la matriz de datos. La lista final de entidades se utilizó para la identificación de metabolitos con bases de datos de acuerdo con la masa exacta y, por lo tanto, logrando el nivel 2 de identificación. Los datos se depositaron en la base de datos MetaboLights con el número de acceso MTBLS7872 (Sumner et al., 2007; Van den Berg et al., 2006). Las muestras se procesaron y se analizaron en con la ayuda Carlos Javier García Hernández-Gil (CEBAS-CSIC).

13.2 Estudio metabolómico dirigido

El estudio metabolómico dirigido se usó para evaluar metabolitos concretos de la glicólisis, como son el ácido láctico y el ácido pirúvico (Sigma-Aldrich), y para detectar metabolitos del TCA, como son el ácido cítrico, ácido málico, ácido fumárico, ácido succínico y ácido cetoglutárico (Sigma-Aldrich). Para ello se utilizaron muestras de macrófagos inmortalizados de ratón *Nlrp3*^{-/-} que expresaban NLRP3 silvestre o la variante patogénica p.D303N, estos fueron tratados en presencia o ausencia de doxiciclina (1 µg/ml) y MCC950 (10 µM) durante 16h. Además, como control se realizó en paralelo un cultivo sin células. Tras la estimulación, las células se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 800 µl de metanol (PanReac AppliChem) para obtener metabolitos polares. Las muestras se homogeneizaron en un vórtex durante 1 min y luego se centrifugaron durante 10 min a 6000 xg y 4 °C (Thermo Scientific). El sobrenadante resultante se filtró a través de un filtro de PVDF de 0.22 µm antes de la inyección en el sistema UPLC-ESI-QTOF-MS.

El sistema UPLC-ESI-QTOF-MS utilizado para el enfoque dirigido fue el mismo que para el no dirigido, excepto la columna de fase reversa. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Acquity C18 UPLC HSS T3 1.8 μm 2.1×100 mm a 22 °C, utilizando agua con 0.1% de ácido fórmico (Fase A) y 95% de acetonitrilo/1% de agua con 0.1% de ácido fórmico (Fase B) como fases móviles con un caudal de 0.45 ml/min. Se utilizó el siguiente gradiente: 0–2 min, 0% fase B; 2–4 min, 0–15 % fase B; 4–10 min, 15–45 % fase B; 10–13 min, 45–100 % fase B; 13–20 min, 100 % fase B; 20–25 min, 0% fase B; 25–35 min, fase B. El analizador de masas se utilizó en modo negativo bajo las siguientes condiciones: temperatura del gas 150 °C, gas de secado 15 l/min, presión del nebulizador 35 psig, temperatura del gas envolvente 400 °C, flujo del gas envolvente 12 l/min, voltaje capilar 3500 V, boquilla voltaje de 500 V, voltaje del fragmentador de 100 V y voltaje de radiofrecuencia octapolo de 750 V. Los datos se adquirieron en el rango m/z de 50-1200 a una velocidad de 3.5 espectros/s en modo negativo. Los archivos de datos sin procesar fueron adquiridos por el sistema UPLC-ESI-QTOF-MS y se exportaron al software MassHunter Qualitative Analysis (Versión 10.0, Agilent Technologies).

14. Transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia

La transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) es una técnica que sirve para medir interacciones entre proteínas a tiempo real en células vivas, y se basa principalmente en la transferencia de energía de un donador bioluminiscente (luciferasa) a un aceptor fluorescente, en este caso YFP, el cual emite luz a otra longitud de onda. Esta transferencia solo ocurre cuando el donador y el aceptor están muy próximos entre sí (<100 Å). La luciferasa en presencia del sustrato coelenterazina-H emite luz a 480 nm que es capaz de excitar a la YFP, la cual emite luz a 535 nm. Por tanto, la señal BRET es la relación entre la emisión a 480 nm y 535 nm, normalizada a la misma relación de la luciferasa sola (Angosto-Bazarra et al., 2021; Martín-Sánchez et al., 2016; Tapia-Abellán et al., 2019).

Esta técnica se usó para detectar el mecanismo de acción de 4-OI y si este afectaba a la conformación de NLRP3, para ello se desarrollaron sensores BRET de NLRP3 fusionado a luciferasa e YFP en el dominio C-terminal y N-terminal respectivamente. En estos ensayos se cultivaron células HEK293T que expresaban el sensor BRET de NLRP3 silvestre o la variante p.D303N, o células que expresaban NLRP3-luciferasa (como control) en una placa de 96 pocillos blanca opaca previamente tratada con poli-L-lisina. Las células se trataron en presencia o ausencia de MCC950 (10 μM) o 4-OI (100 μM) durante 16 horas a 37°C con 5% de CO₂. Tras la incubación,

las células se lavaron con PBS y se añadió nuevamente MCC950 o 4-OI en tampón ET. Las lecturas basales de BRET se realizaron 5 minutos después de la adición del sustrato de coelenterazina-H (5 μ M) en un lector de placas Synergy neo2 (BioTek) a 480 nm y 530 nm a 37°C. Los resultados se expresaron en unidades miliBRET (mBUs) y se calcularon según la siguiente ecuación:

$$\text{mBUs} = \left[\left(\text{Sensor} \left(\frac{\text{Lum}(530 \text{ nm})}{\text{Lum}(480 \text{ nm})} \right) - \left(\text{Luciferasa} \left(\frac{\text{Lum}(530 \text{ nm})}{\text{Lum}(480 \text{ nm})} \right) \right) \right) \right] \times 1000$$

15. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism v.9 (GraphPad Software Inc.). La normalidad de las muestras se determinó con la prueba D'Angostino-Pearson omnibus. Los valores atípicos de los conjuntos de datos se identificaron mediante el método ROUT con $Q=1\%$, eliminándose del análisis y de las representaciones. Todos los datos se muestran como valores medios y las barras de errores representan el error estándar (SEM). Para las comparaciones de dos grupos, se usó la prueba U de Mann-Whitney en datos no paramétricos y la prueba T en datos paramétricos. Para las comparaciones de múltiples grupos se usó la prueba Kruskal-Wallis para datos no paramétricos y la prueba ANOVA para datos paramétricos. En los análisis de expresión génica diferencial de los datos de los repositorios GSE42606 y GSE17732 se utilizó la prueba T, mientras que para los análisis de expresión génica diferencial de los datos del repositorio GSE57253 y de la secuenciación de ARN de macrófagos inmortalizados de ratón se utilizó la prueba Wald. Todos los datos de secuenciación de ARN se corrigieron con el procedimiento Benjamini-Hochberg para obtener un p valor ajustado. Los valores de p se indican como asteriscos como se detalla en los pies de figura, siendo $p > 0.05$ no significativo (*ns*).

RESULTADOS

1. Activación del inflammasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS

1.1 Las variantes de NLRP3 asociadas a CAPS dan como resultado un inflammasoma constitutivamente activo

Para determinar si la formación de oligómeros de ASC, como indicativo de la activación del inflammasoma, estaba afectada en pacientes CAPS o FMF, en primer lugar, se analizaron las muestras de sangre de pacientes CAPS que presentaban las variantes patogénicas en heterocigosis de NLRP3 p.R260W, p.D303N, p.T348M y p.A439T. Estas muestras se cultivaron sin ningún tipo de tratamiento y mostraron un mayor porcentaje de monocitos con oligómeros de ASC en comparación con los de individuos sanos (**Figura 17A**). Además, cuando la sangre se estimuló con LPS, se vio un incremento del porcentaje de monocitos con oligómeros de ASC respecto a las células sin tratar, siendo este porcentaje mayor en los pacientes CAPS (**Figura 17A**). Las muestras de pacientes CAPS sin tratar y tratadas con LPS, incubadas con MCC950, presentaron una disminución en el porcentaje de monocitos con oligómeros de ASC (**Figura 17B**). También se evaluó la formación de oligómeros de ASC en monocitos de pacientes con FMF que portaban la variante patogénica p.M694I en el gen *MEFV* en homocigosis. Las muestras de sangre de estos pacientes FMF tratadas o no con LPS, no presentaron un mayor porcentaje de monocitos con oligómeros de ASC en comparación con los monocitos de individuos sanos (**Figura 17C**). Estos datos sugieren que los monocitos de pacientes con CAPS, pero no los de pacientes con FMF, tenían una activación constitutiva del inflammasoma NLRP3, que se exacerba por la activación de NF- κ B.

En las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de los pacientes CAPS también se observaron indicadores de una activación constitutiva del inflammasoma NLRP3, ya que las células de estos pacientes mostraban una liberación constitutiva del marcador de piroptosis galectina-3 y de la citoquina IL-18 (**Figura 18A, B**), pero no de las citoquinas IL-1 β o TNF- α (**Figura 18C, D**). La estimulación con LPS resultó en una mayor liberación de IL-1 β en las PBMCs de pacientes CAPS comparada con los individuos sanos, esta estimulación con LPS, como se sabe, es necesaria para la regulación positiva transcripcional de IL-1 β (**Figura 18C**). Además, como control del tratamiento con LPS, se cuantificó la liberación de TNF- α , sin observar diferencias entre pacientes CAPS y los individuos sanos (**Figura 18D**).

A pesar de la escasa liberación de IL-1 β e IL-18 en PBMCs en individuos sanos, la estimulación con LPS sí que produjo un aumento leve pero significativo de la liberación

RESULTADOS

de estas citoquinas, observándose en IL-18 una liberación de 0.78 ± 0.13 pg/ml en las células sin tratar a las 6 horas, la cual aumentó a 2.18 ± 0.52 pg/ml tras el estímulo con LPS, obteniendo así un valor p de la prueba T de 0.0296. En el caso de IL-1 β , los individuos mostraban una liberación de 0.65 ± 0.28 pg/ml en las células sin tratar a las 4h, y esta concentración aumentó a 11.09 ± 2.57 pg/ml tras el tratamiento con LPS, obteniendo un valor p de la prueba T de 0.0037 (**Figura 18B, C**). Este incremento es menos pronunciado que en los pacientes CAPS, coincidiendo también con un menor incremento en el porcentaje de monocitos con oligómeros de ASC (**Figura 17A**). De estos resultados, se observa una activación diferencial del inflamasoma dependiente del genotipo, siendo mayor en pacientes portadores de la variante p.A439T en relación con las demás variantes de NLRP3 (**Figura 18A-C**). No obstante, el aumento observado en el porcentaje de monocitos con ASC fue consistente en todas las variantes analizadas (**Figura 17A**), sugiriendo la hipótesis de que diferentes variantes de NLRP3 pueden provocar el ensamblaje constitutivo del inflamasoma, mientras que la señalización aguas abajo podría ser diferente.

En cambio, en los pacientes con FMF a pesar de no mostrar diferencias en el porcentaje de monocitos con oligómeros de ASC respecto a los individuos sanos (**Figura 17C**), las PBMCs sin tratar mostraron una mayor liberación de IL-18 (**Figura 18E**). Además, tras el tratamiento con LPS, también se observó un incremento de IL-1 β en estos pacientes, sin presentar diferencias en TNF- α (**Figura 18F, G**).

Para investigar el efecto de la estimulación con LPS en la activación de monocitos humanos, se utilizó el conjunto de datos transcriptómicos GSE42606 de la base GEO (del inglés *Gene Expression Omnibus*) (Smeekens et al., 2013), el cual usaba PBMCs de individuos sanos tratados o no con LPS. El análisis de estos datos mostró que la estimulación con LPS incrementaba la expresión de *IL1B*, *TNF* y *NLRP3*, mientras que la expresión de *IL18* y *LGALS3* se mantenía constante (**Figura 19A**). Sin embargo, cuando se analizó el conjunto de datos GEO GSE57253 (Canna et al., 2014), donde se utilizaban células sanguíneas de pacientes con CAPS que portaban la variante NLRP3 p.G569R, se observó que la expresión de *IL1B*, *IL18* y *NLRP3* no estaba afectada (**Figura 19B**). Por el contrario, el análisis del conjunto de datos GEO GSE17732 (Stojanov et al., 2011) que contenía pacientes FMF con las variantes *MEFV*, p.M694V/p.E148Q o p.M694del, mostraba un incremento de la expresión de *IL1B* e *IL-18* en las células sanguíneas, sin observar cambios en las expresión de *MEFV* (**Figura 19C**).

RESULTADOS

En resumen, todos estos datos apuntan a la posibilidad de un mecanismo de activación constitutiva del inflamasoma NLRP3 en los pacientes CAPS, mientras que en los pacientes FMF ese aumento en la liberación de las citoquinas podía deberse a una mayor expresión de *IL1B* e *IL-18*, no por una activación constitutiva del inflamasoma pirina.

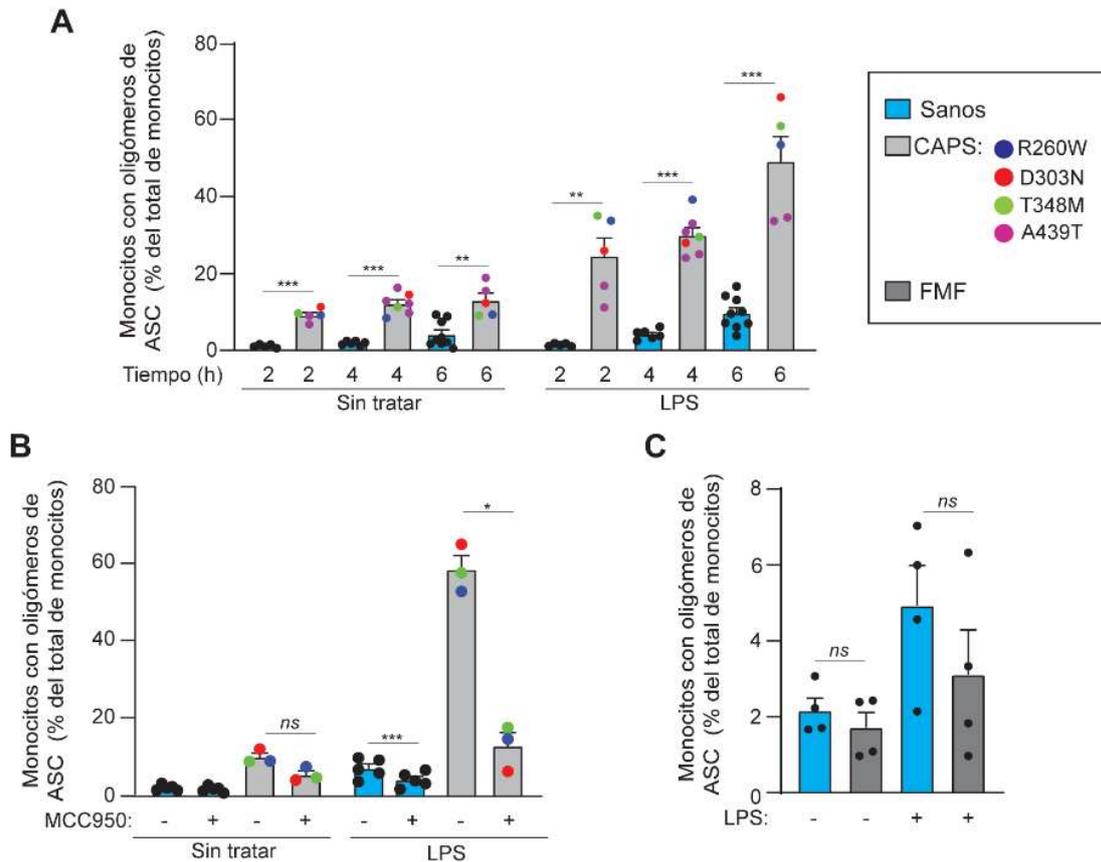


Figura 17. Los monocitos de pacientes CAPS presentan una activación constitutiva del inflammasoma NLRP3. (A) Porcentaje de monocitos con oligómeros de ASC medidos en sangre de individuos sanos (barras azules, $n=5-9$) y pacientes CAPS (barras grises, NLRP3 p.R260W, p.D303N, p.T348M y p.A439T, $n=3-7$), tratados o no con LPS (100 ng/ml) a diferentes tiempos. (B) Porcentaje de monocitos con oligómeros de ASC de muestras de sangre tratadas como en el panel A, en ausencia/presencia de LPS (100 ng/ml) o MCC950 (10 μ M) durante 6 horas. (C) Porcentaje de monocitos con oligómeros de ASC medidos en sangre de individuos sanos (barras azules, $n=4$) y pacientes FMF (barras gris oscuro, *MEFV* p.M694I, $n=4$), tratados o no con LPS (1.6 μ g/ml) durante 3 horas. Cada punto corresponde a un donante diferente y, para CAPS, cada color representa una mutación diferente; los datos se representan como media \pm SEM. Se ha utilizado la prueba estadística T en los paneles A-C. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: * $p < 0.05$; ** $p < 0.0021$; *** $p < 0.0002$; *ns* indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

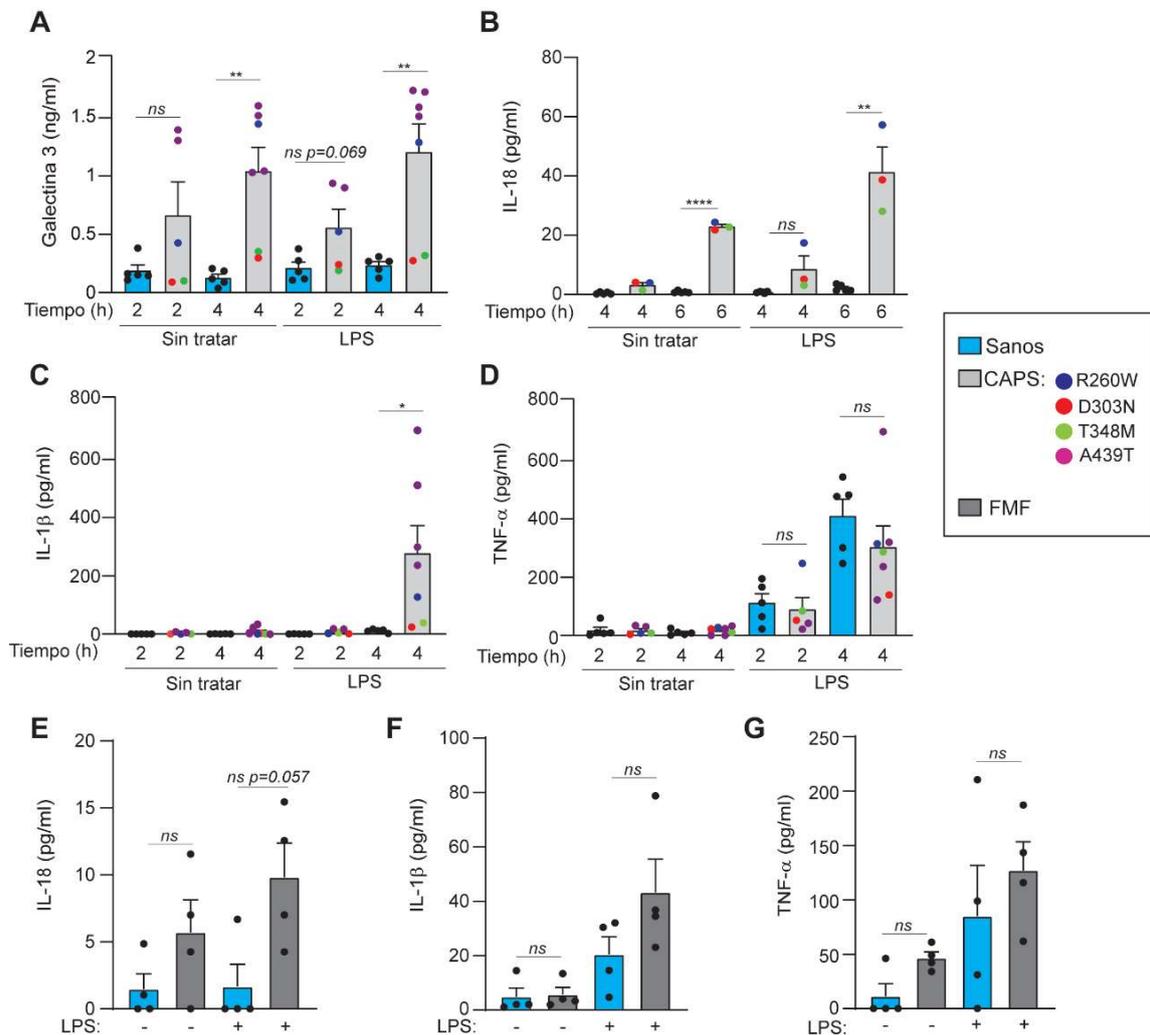


Figura 18. Liberación basal de citoquinas en pacientes CAPS y FMF. (A-D) ELISA de galectina-3, IL-18, IL-1β y TNF-α en sobrenadantes de PBMCs humanas de individuos sanos (barras azules, $n=5-9$) y pacientes CAPS (barras grises, NLRP3 p.R260W, p.D303N, p.T348M y p.A439T, $n=3-7$), tratados o no con LPS (100 ng/ml) a diferentes tiempos. (E-G) ELISA de IL-18, IL-1β y TNF-α en sobrenadantes de PBMCs humanas de individuos sanos (barras azules, $n=4$) y pacientes FMF (barras gris oscuro, *MEFV* p.M694I, $n=4$), tratados o no con LPS (1.6 μg/ml) durante 3 horas. Cada punto corresponde a un donante diferente y, para CAPS, cada color representa una variante diferente; los datos se representan como media ± SEM y se ha utilizado la prueba estadística T en los paneles A-G. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: * $p < 0.05$; ** $p < 0.0021$; **** $p < 0.0001$; *ns* indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

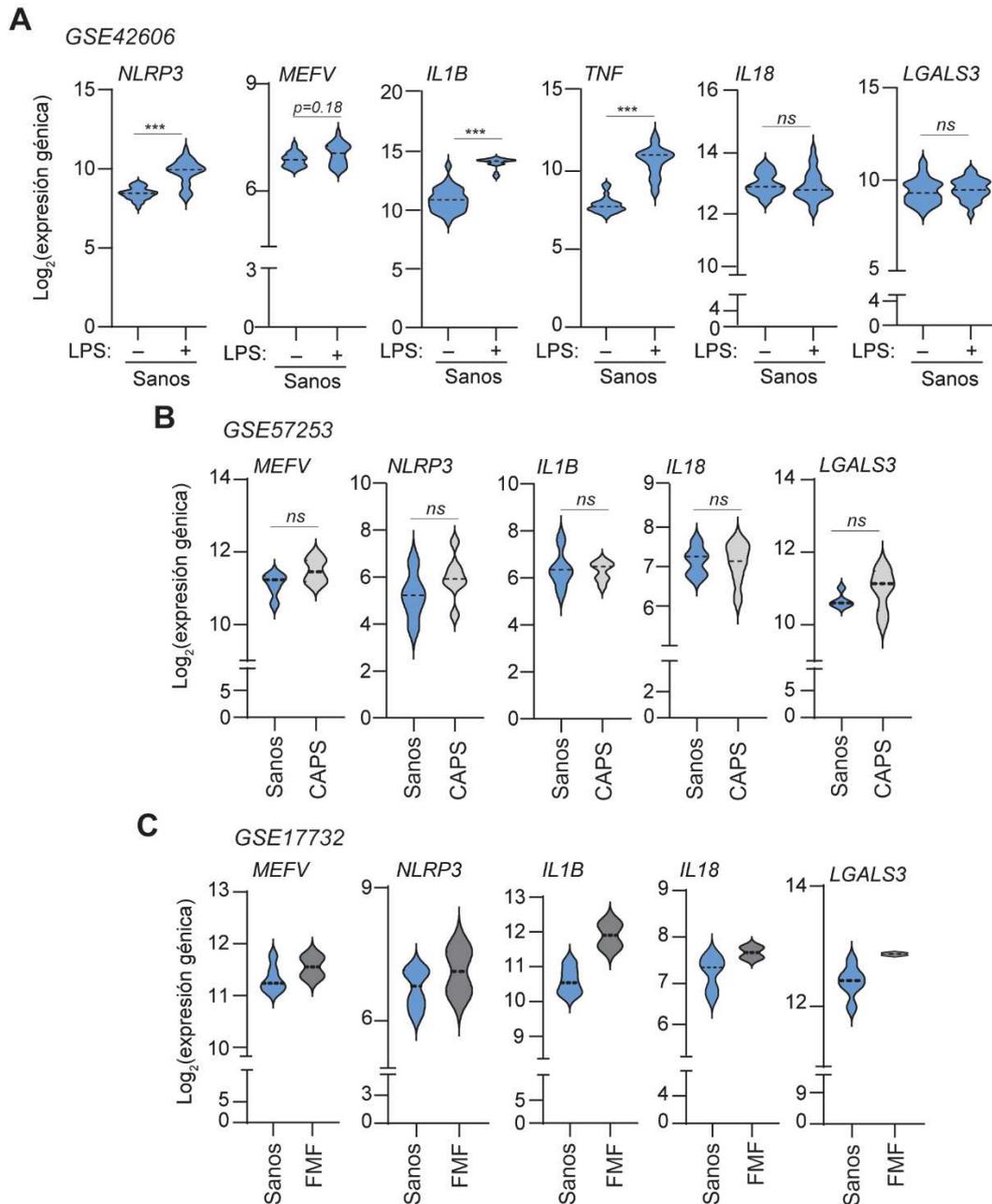


Figura 19. Diferente expresión génica de *IL1B* e *IL18* entre pacientes CAPS y FMF. (A-C) (A) Diagrama de violín de la expresión génica de *NLRP3*, *IL1B*, *TNF*, *IL18*, *LGALS3* y *MEFV* en PBMCs de individuos sanos tratados o no con LPS ($n=26-30$) (utilizando el conjunto de datos GSE42606), (B) diagrama de violín de la expresión génica de células sanguíneas de individuos sanos ($n=5$) o pacientes CAPS con la variante *NLRP3* p.G569R ($n=7$) durante un brote inflamatorio (utilizando el conjunto de datos GSE57253), (C) diagrama de violín de la expresión génica de células sanguíneas de individuos sanos ($n=6$) o pacientes FMF con las variantes *MEFV* p.M694V/p.E148Q o p.M694del ($n=2$) en brote inflamatorio (utilizando el conjunto de datos GSE17732). La línea de puntos representa la mediana; se ha utilizado la prueba estadística T para el panel A y la prueba de Wald en el panel B, en ambos casos con corrección de Benjamini-Hochberg para obtener el valor de p ajustado. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: *** $p < 0.0002$; ns indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

1.2 Los niveles de expresión de variantes de NLRP3 asociadas a CAPS influyen en la activación constitutiva del inflamasoma

Para investigar el mecanismo de activación constitutiva del inflamasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS, se utilizó un sistema recombinante inducible por doxiciclina en macrófagos inmortalizados de ratón deficientes en NLRP3, los cuales expresaban NLRP3 silvestre humano o las variantes asociadas a CAPS p.R260W, p.D303N y p.T348M humanas. Esto permitió estudiar la activación constitutiva del inflamasoma independientemente de la señal de cebado. A diferencia de lo obtenido en macrófagos que expresaban NLRP3 silvestre, la inducción de NLRP3 con las variantes asociadas a CAPS p.R260W, p.T348M y p.D303N produjo un procesamiento constitutivo de GSDMD (**Figura 20A**), de manera que al aumentar la concentración de doxiciclina se observó un incremento de la expresión del NLRP3 mutante, que conllevó a un mayor procesamiento de GSDMD (**Figura 20A, B**). Además, este procesamiento era dependiente de NLRP3, ya que el tratamiento con el inhibidor de NLRP3, MCC950, redujo el procesamiento de GSDMD (**Figura 20A**). MCC950 aumentó la expresión de NLRP3 en los macrófagos con las variantes asociadas a CAPS (**Figura 20A**), probablemente debido al aumento de la expresión del gen *NLRP3* por parte de células que no mueren por piroptosis. Por otro lado, al usar diferentes dosis de doxiciclina para lograr niveles de expresión similares tanto de NLRP3 silvestre como de la variante p.D303N, solo se observó escisión de GSDMD en macrófagos que expresaban la variante patológica de NLRP3 (**Figura 20C**).

En los siguientes experimentos también se utilizaron estas concentraciones diferentes de doxiciclina para expresar NLRP3 silvestre y la variante p.D303N, con el fin de tener unos niveles de expresión similares entre ambas y poder compararlas. Los macrófagos que expresaban la variante p.D303N, además de inducir el procesamiento de GSDMD (**Figura 20C**), también inducían la activación de caspasa-1 (**Figura 21A**), un mayor porcentaje de macrófagos que contenían oligómeros de ASC (**Figura 21B, C**) y tenían más piroptosis (**Figura 21D**). En paralelo, la expresión de las diferentes variantes de NLRP3 también desencadenó la liberación de la citoquina IL-18, la cual se expresa constitutivamente (**Figura 21E**). Como se esperaba, la inhibición de NLRP3 con MCC950 provocó una reducción de la activación de caspasa-1, el porcentaje de oligómeros de ASC, la piroptosis y la liberación de IL-18 (**Figura 21A-E**). Sin embargo, MCC950 presentó un efecto inhibitor menos potente sobre la variante NLRP3 p.T348M, afectando tanto al procesamiento de GSDMD como la liberación de IL-18 (**Figura 20A,21E**).

RESULTADOS

El tiempo también fue un factor influyente en la expresión de la variante p.D303N de NLRP3, de manera que la expresión de esta variante aumentaba con la duración de la incubación con doxiciclina (**Figura 22A**). No obstante, este aumento no se observó en períodos prolongados de incubación con doxiciclina (16h), debido probablemente a la inducción de piroptosis, ya que el bloqueo de la activación constitutiva de NLRP3 con MCC950 incrementó la expresión de NLRP3 incluso a tiempos largos de incubación con doxiciclina (**Figura 22A**), sugiriendo nuevamente que las células viables acumulaban NLRP3 p.D303N cuando este se inhibe. De manera similar a los resultados mencionados anteriormente, el aumento de la expresión del mutante NLRP3 con el tiempo, desencadenó un mayor procesamiento de GSDMD y una mayor liberación de LDH e IL-18 (**Figura 22A-C**).

En resumen, todos estos datos muestran que las variantes de NLRP3 asociadas a CAPS producen oligómeros de ASC, la activación de las caspasa-1, y el procesamiento de GSDMD con la consecuente piroptosis y liberación de IL-18, independientemente de la señal de cebado, sugiriendo que estas variantes producen un inflamasoma constitutivamente activo. Estos datos coinciden con los mostrados anteriormente en muestras de pacientes con CAPS.

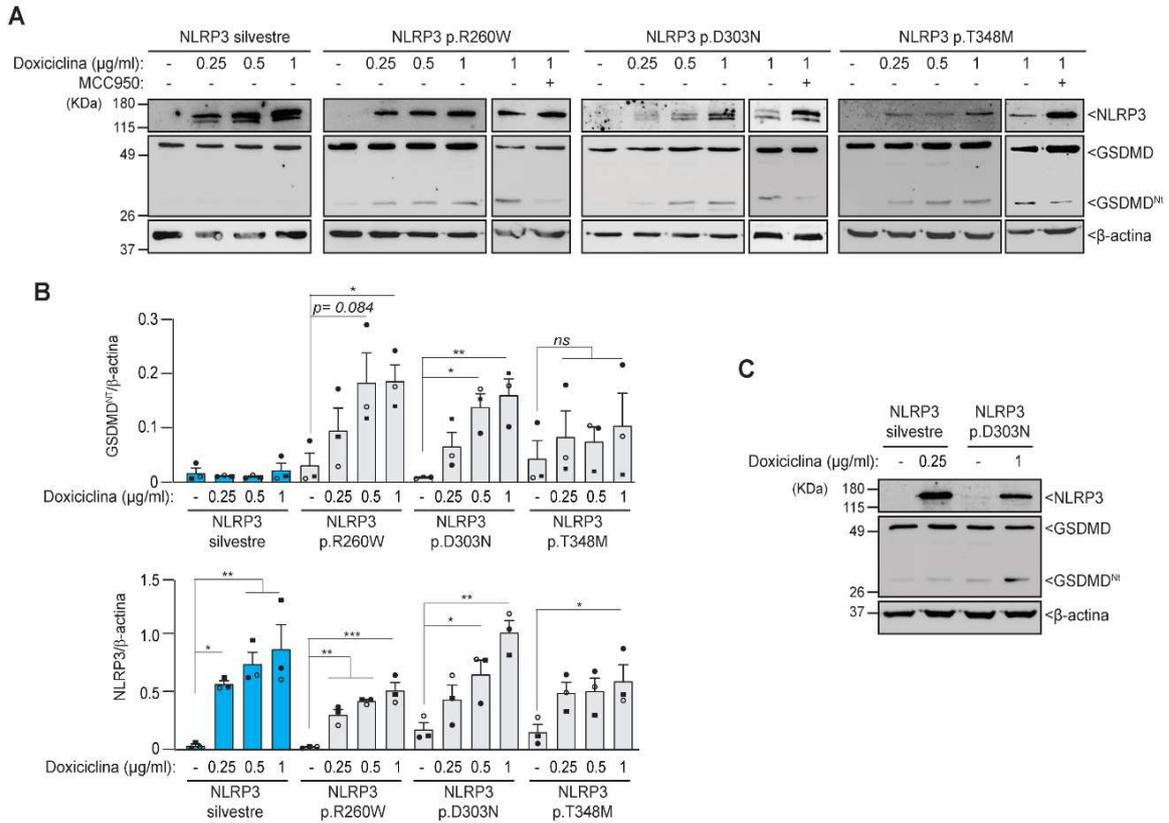


Figura 20. La expresión de variantes de NLRP3 asociadas a CAPS en macrófagos producen el procesamiento constitutivo de GSDMD. (A) Western blot de NLRP3, GSDMD y β -actina de lisados de macrófagos immortalizados *Nlrp3*^{-/-}, tratados o no con doxiciclina (0.25, 0.5 y 1 μ g/ml) durante 16 horas, para inducir la expresión de NLRP3 silvestre humano o las variantes p.D303N, p.R260W y p.T348M, en presencia o ausencia de MCC950 (10 μ M). (B) Cuantificación de GSDMD^{NT}/ β -actina (arriba) o NLRP3/ β -actina (abajo) de los Western blot presentados en el panel A. (C) Western blot de NLRP3, GSDMD y β -actina de lisados de macrófagos immortalizados *Nlrp3*^{-/-} tratados como en el panel A, para inducir la expresión de NLRP3 silvestre humano o con la variante p.D303N. Los Western blots son representativos de $n=3$ experimentos independientes; los histogramas son representativos de $n=3$ experimentos independientes (cada uno presentado con un símbolo diferente) y los datos se representan como media \pm SEM; se ha utilizado la prueba estadística ANOVA para el panel B. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: * $p < 0.05$; ** $p < 0.0021$; *** $p < 0.0002$; *ns* indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

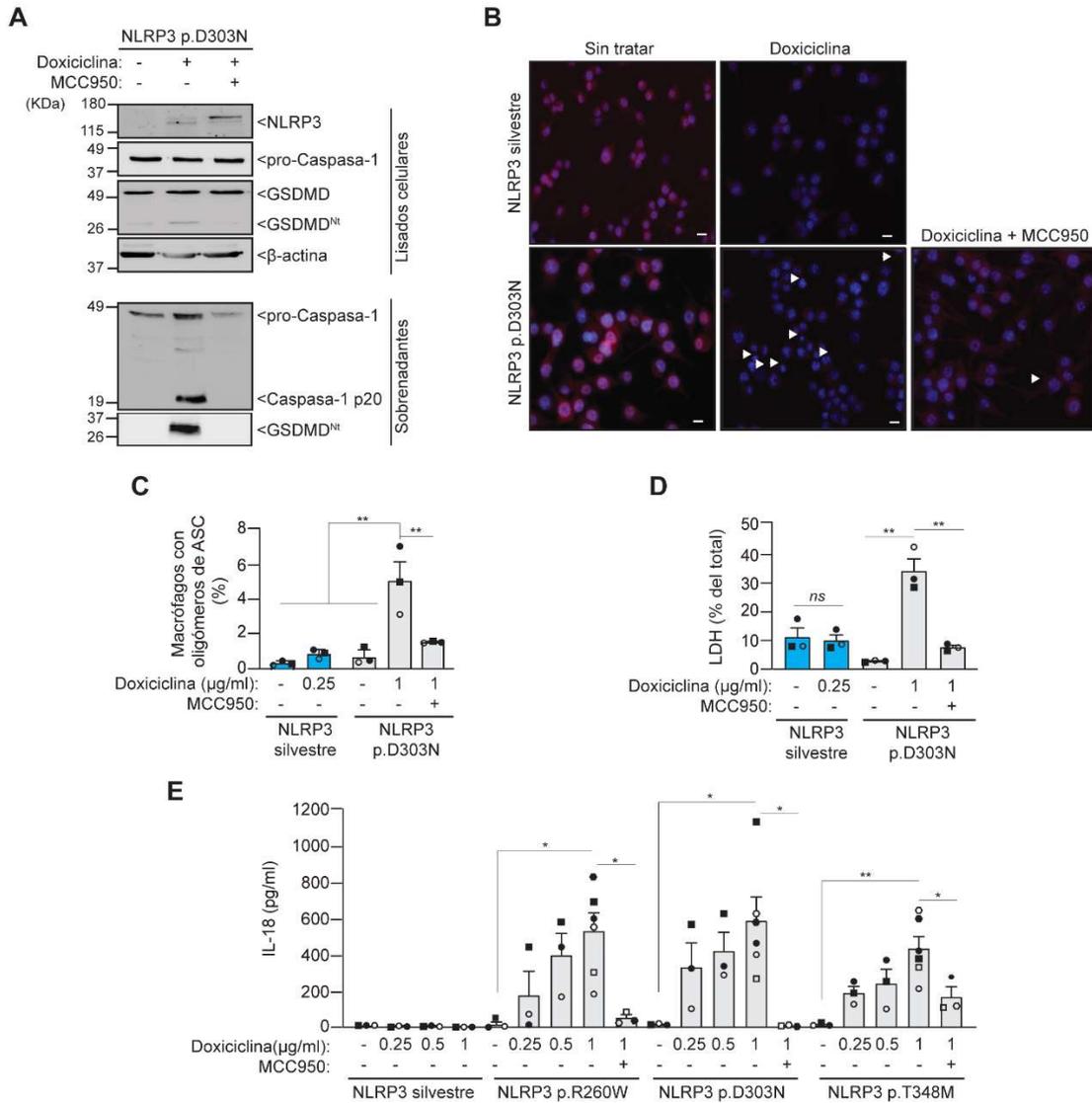


Figura 21. La expresión de variantes NLRP3 asociadas a CAPS en macrófagos resulta en una activación constitutiva del inflamasoma. (A) Western blot de NLRP3, GSDMD, caspasa-1 y β-actina de lisados y sobrenadantes de macrófagos inmortalizados *Nlrp3*^{-/-} (iMos), tratados o no con doxiciclina (1 μg/ml) durante 16 horas, para inducir la expresión de la variante p.D303N de NLRP3 humana en presencia o ausencia de MCC950 (10 μM). **(B)** Imágenes de fluorescencia de iMos *Nlrp3*^{-/-} tratados o no con doxiciclina (0.25 o 1 μg/ml) durante 16 horas para expresar NLRP3 humano silvestre o la variante p.D303N respectivamente, para obtener una expresión similar de NLRP3, en presencia o ausencia de MCC950 (10 μM); ASC está marcado en rojo, DAPI en azul; barra de escala =10 μm; las puntas de flecha indican oligómeros de ASC. Las imágenes son representativas de *n*=3 experimentos independientes. **(C)** Porcentaje de oligómeros de ASC en iMos que expresan NLRP3 humano silvestre o la variante p.D303N tratadas como se ha indicado en el panel B. **(D)** Porcentaje de LDH extracelular en cultivos de iMos que expresan NLRP3 humano silvestre o la variante p.D303N tratadas como se ha indicado en el panel B. **(E)** ELISA de IL-18 en sobrenadantes de iMos que expresan NLRP3 humano silvestre o las variantes p.D303N, p.R260W y p.T348M tratadas como se ha indicado en el panel

RESULTADOS

A pero con distintas concentraciones de doxiciclina (0.25, 0.5 y 1 $\mu\text{g/ml}$). Los histogramas muestran la media de al menos $n=3$ experimentos independientes (cada uno representado por un símbolo diferente) y los datos se representan como media \pm SEM. Los Western blots son representativos de $n=3$ experimentos independientes; se ha utilizado la prueba estadística ANOVA en los paneles C, E y la prueba T en el panel D. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: * $p < 0.05$; ** $p < 0.0021$; *ns* indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

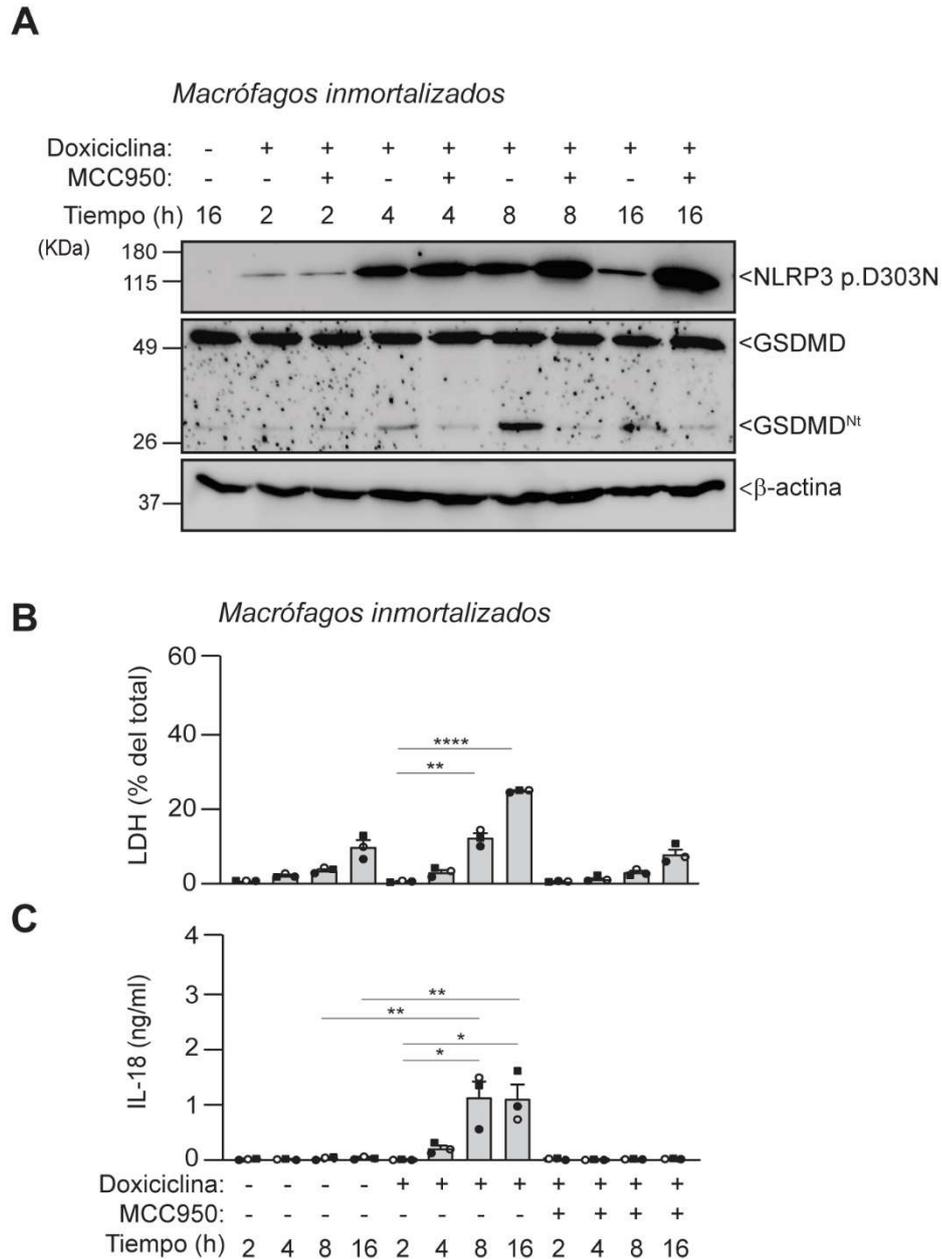


Figura 22. El aumento de la expresión de la variante p.D303N de NLRP3 resulta en un aumento en la activación constitutiva del inflamasoma. (A) Western blot de NLRP3, GSDMD y β -actina en lisados de macrófagos inmortalizados *Nlrp3*^{-/-} (iMos) tratados o no con doxiciclina (1 μ g/ml) a diferentes tiempos (2, 4, 8 o 16 h) para inducir la expresión de la variante p.D303N de NLRP3 humana, en presencia o ausencia de MCC950 (10 μ M); los Western blots son representativos de $n=2$ experimentos independientes. **(B, C)** Porcentaje de LDH extracelular (B) y ELISA de IL-18 (C) en sobrenadantes de iMos tratados como se indica en el panel A (cada símbolo representa un experimento independiente). Los gráficos muestran la media de $n=3$ experimentos independientes y los datos se representan como media \pm SEM; se ha utilizado la prueba estadística ANOVA para los paneles B, C. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: * $p < 0.05$; ** $p < 0.0021$; *** $p < 0.0002$; **** $p < 0.0001$; *ns* indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

2. Modulación del inflamasoma NLRP3 asociado a CAPS mediante NF- κ B

Para determinar la influencia de NF- κ B sobre la activación del inflamasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS, se utilizaron macrófagos inmortalizados de ratón que expresan la variante p.D303N de NLRP3 tratados o no con LPS. Como se ha mostrado en los resultados con muestras de pacientes CAPS, la formación constitutiva del inflamasoma NLRP3 no es suficiente para inducir la liberación de IL-1 β , la cual se induce tras estimulación con LPS (**Figura 23A**). Además, el tratamiento con LPS también produjo la liberación de TNF- α (**Figura 23B**), pero de forma independiente a la expresión de la variante p.D303N de NLRP3, ya que MCC950 no modificó su liberación. Sin embargo, este inhibidor bloqueaba completamente la liberación de IL-1 β (**Figura 23A**). Por otro lado, la inducción de NF- κ B con LPS también aumentó el procesamiento de GSDMD, la liberación de IL-18 y la piroptosis (**Figura 22A-C, 23C-E**).

El palmitato o las proteínas S100A9 o IL-6, también inducen la liberación de IL-1 β en los macrófagos que expresaban las variantes patogénicas de NLRP3 p.R260W, p.D303N, y p.T348M pero no cuando expresaban NLRP3 silvestre (**Figura 24A**). Además, al tratar los macrófagos con palmitato, S100A9 e IL-6, se indujo la liberación de TNF- α independientemente de la variante de NLRP3 expresada (**Figuras 24B**). Estos tratamientos también promovían la activación de NF- κ B, como indican los resultados con macrófagos que tenían un gen reportero bajo el control este factor de transcripción (**Figura 24C**). Por otro lado, como era de esperar, MCC950 bloqueó la liberación de IL-1 β de los macrófagos que expresaban la variante p.D303N de NLRP3, pero no afectó a la liberación de TNF- α (**Figura 24A, B**). Como control de una correcta expresión de NLRP3 silvestre, estos macrófagos se estimularon con LPS y nigericina, que aumentó la liberación de IL-1 β (**Figura 24D**).

La activación con distintos agonistas de TLR, LPS (TLR4) y Pam3CSK₄ (TLR2), también desencadenó la liberación de IL-1 β en los macrófagos que expresan las variantes patogénicas de NLRP3 asociadas a CAPS (**Figura 24A**). Además, el tratamiento con LPS y Pam3CSK₄, también originó la liberación de TNF- α y la inducción de NF- κ B (**Figura 24B, C**). Por el contrario, el tratamiento con activadores canónicos del inflamasoma NLRP3 silvestre, como son ATP o cristales de MSU, no fueron capaces de inducir la liberación de IL-1 β en los macrófagos con variantes de NLRP3 asociadas a CAPS (**Figura 24A**), ya que estos compuestos no promovían la activación de NF- κ B (**Figura 24C**). En estos experimentos se observan pequeñas diferencias entre las distintas variantes de NLRP3 analizadas y los tratamientos empleados, de manera que

la variante p.T348M de NLRP3 presentó una liberación de IL-1 β más moderada en comparación con las otras dos variantes analizadas, y la variante p.D303N de NLRP3 presentó una mayor liberación de IL-1 β tras el tratamiento con palmitato e IL-6 (**Figura 24A**).

La liberación de IL-1 β en los macrófagos que expresan la variante p.D303N de NLRP3 resultó ser dosis-dependiente de las concentraciones de palmitato, S100A9, IL-6, LPS y Pam3CSK₄ (**Figura 25A**). También se observó una liberación dosis-dependiente de TNF- α (**Figura 25A**). No obstante, en las cinéticas se mostraba un retraso notable en la liberación de IL-1 β en comparación con la liberación de TNF- α (**Figura 25B**). Esto pone de manifiesto que la liberación de IL-1 β dependiente de las variantes patogénicas de NLRP3 es el resultado de dos procesos, uno de ellos es la activación de NF- κ B la cual promueve la expresión de pro-IL-1 β (**Figura 25C**), y el otro es el procesamiento y liberación de la propia IL-1 β , como consecuencia del inflamasoma constitutivamente activo con las variantes de NLRP3 asociadas a CAPS.

Posteriormente se utilizó sangre de pacientes con CAPS y se estimuló con palmitato, S100A9, IL-6 y Pam3CSK₄ lo que produjo un aumento en el porcentaje de monocitos con oligómeros de ASC, siendo este aumento menos pronunciado en los monocitos de individuos sanos (**Figura 26A**). Las PBMCs de los pacientes CAPS liberaron más IL-1 β tras el estímulo con palmitato, S100A9 y Pam3CSK₄ que las células de donantes sanos (**Figura 26B**). El tratamiento con IL-6 recombinante no fue capaz de inducir la liberación de IL-1 β (**Figura 26B**). Como control, se observó que palmitato, S100A9 y Pam3CSK₄, inducían la liberación de TNF- α en PBMCs tanto de pacientes con CAPS como de individuos sanos, mientras que IL-6 no fue capaz de inducirla (**Figura 26C**). La ausencia de respuesta podía deberse a la incapacidad de IL-6 para activar a NF- κ B en monocitos primarios humanos. Al analizar el conjunto de datos GSE57253, se descubrió que el gen *S100A9* estaba aumentado en las células sanguíneas de pacientes con CAPS durante un brote inflamatorio, en comparación con los donantes sanos (**Figura 26D**). Además, el tratamiento con anakinra en estos pacientes disminuyó considerablemente la expresión de *S100A9* (**Figura 26D**), sugiriendo que las alarminas, como S100A9, podrían estar implicadas en los brotes de CAPS ya que pueden inducir un aumento en la actividad del inflamasoma NLRP3 con variantes patogénicas.

Habiendo confirmado que la estimulación con LPS incrementaba el procesamiento de GSDMD y la liberación de IL-18 en células mieloides portadoras de variantes patogénicas de NLRP3, el siguiente paso fue emplear macrófagos que

expresan la variante p.D303N de NLRP3 estimulados con palmitato, S100A9, IL-6, LPS y Pam3CSK₄. Estos tratamientos produjeron un aumento en el procesamiento de caspasa-1 p20 y GSDMD (**Figura 27A**), así como un aumento en el porcentaje de macrófagos con oligómeros de ASC (**Figura 27B**), en la liberación de IL-18, IL-1 α y P2X7 (**Figura 27C-E**) y la piroptosis (**Figura 27F**). Además, para confirmar que estos eventos eran dependientes de NLRP3 se usó el inhibidor MCC950, y como se esperaba, este redujo la liberación de IL-18, IL-1 α y P2X7, así como la piroptosis (**Figura 27C-F**). Estos datos sugieren que, a pesar de que la liberación de IL-1 β depende en gran medida de la inducción de su expresión tras activar NF- κ B, la actividad del inflamasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS está también modulada por NF- κ B, ya que en el sistema de macrófagos inmortalizados la expresión de NLRP3 es constante y no depende de NF- κ B.

Por otro lado, en esta Tesis quisimos detectar otras moléculas que podrían relacionarse con la activación del inflamasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS, de manera que se estudió el secretoma de macrófagos que expresaban la variante p.D303N de NLRP3. Se encontró que la activación de NF- κ B tras tratar macrófagos que expresan NLRP3 p.D303N con palmitato, S100A9, IL-6, LPS y Pam3CSK₄, fue crucial para la liberación de HMGB1 y cistatina B (**Figura 28A, B**), siendo el palmitato el inductor más débil, mostrando una concordancia con su menor capacidad de activación de NF- κ B. Además, como se esperaba, esta liberación era dependiente de NLRP3 ya que MCC950 redujo los niveles de liberación de HMGB1 y cistatina B (**Figura 28A, B**). Por el contrario, la variante patogénica p.D303N de NLRP3 no estuvo implicada en la liberación de catepsina B, CD14, CD206 (receptor de manosa) o anexina A1, los cuales se identificaron previamente que estaban relacionados con la activación canónica del inflamasoma silvestre por ATP extracelular (**Figura 28C-F**) (de Torre-Minguela et al., 2016).

En resumen, todos estos datos muestran que la activación constitutiva del inflamasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS se modula por inductores de NF- κ B, entre los que se incluyen estímulos endógenos del hospedador (palmitato, S100A9 e IL-6) o exógenos (LPS o Pam3CSK₄). Además, esta inducción es esencial para producir la liberación de IL-1 β y de otras moléculas como IL-1 α , P2X7, HMGB1 y cistatina B.

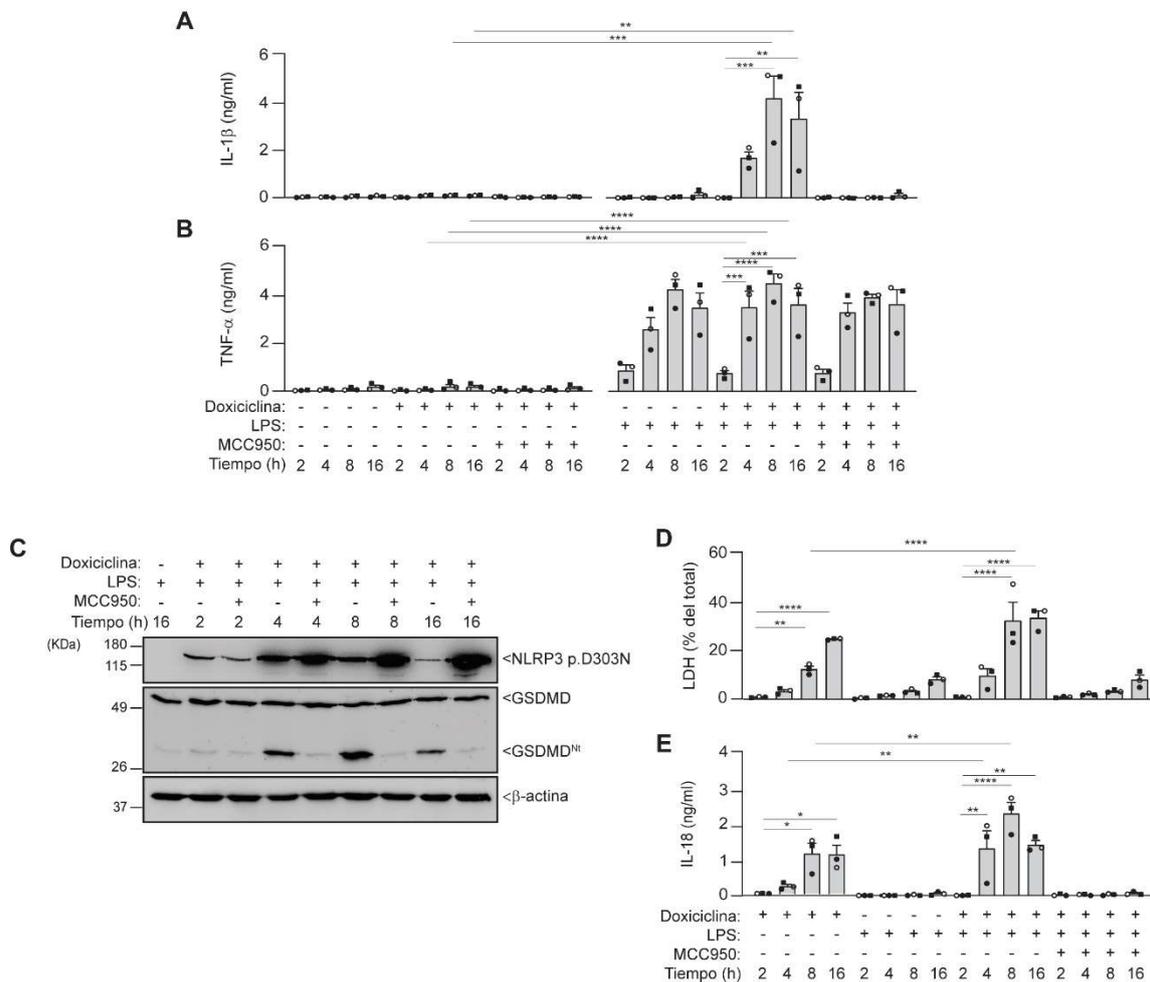


Figura 23. El LPS modula la activación del inflammasoma NLRP3 en macrófagos que expresan la variante p.D303N. (A, B, E) ELISA de IL-1β (A), TNF-α (B) e IL-18 (E) en sobrenadantes de macrófagos inmortalizados *Nlrp3*^{-/-} (iMos) tratados o no con doxiciclina (1 μg/ml) a diferentes tiempos (2, 4, 8 o 16 h) para inducir la expresión de la variante p.D303N de NLRP3 humana, en presencia o ausencia de MCC950 (10 μM) y LPS (100 ng/ml). (C) Western blot de NLRP3, GSDMD y β-actina en lisados de iMos tratados como se indica en el panel A. (D) Porcentaje de LDH extracelular de sobrenadantes de iMos tratados como se indica en el panel A. Los Western blots son representativos de *n*=2 experimentos independientes. Los histogramas muestran la media de *n*=3 experimentos independientes (cada uno representado por un símbolo diferente) y los datos se representan como media ± SEM; se ha utilizado la prueba estadística ANOVA en los paneles A, B, D, E. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: **p* < 0.05; *p* < 0.0021; ****p* < 0.0002; *****p* < 0.0001; *ns* indica que no hay diferencias significativas (*p* > 0.05).**

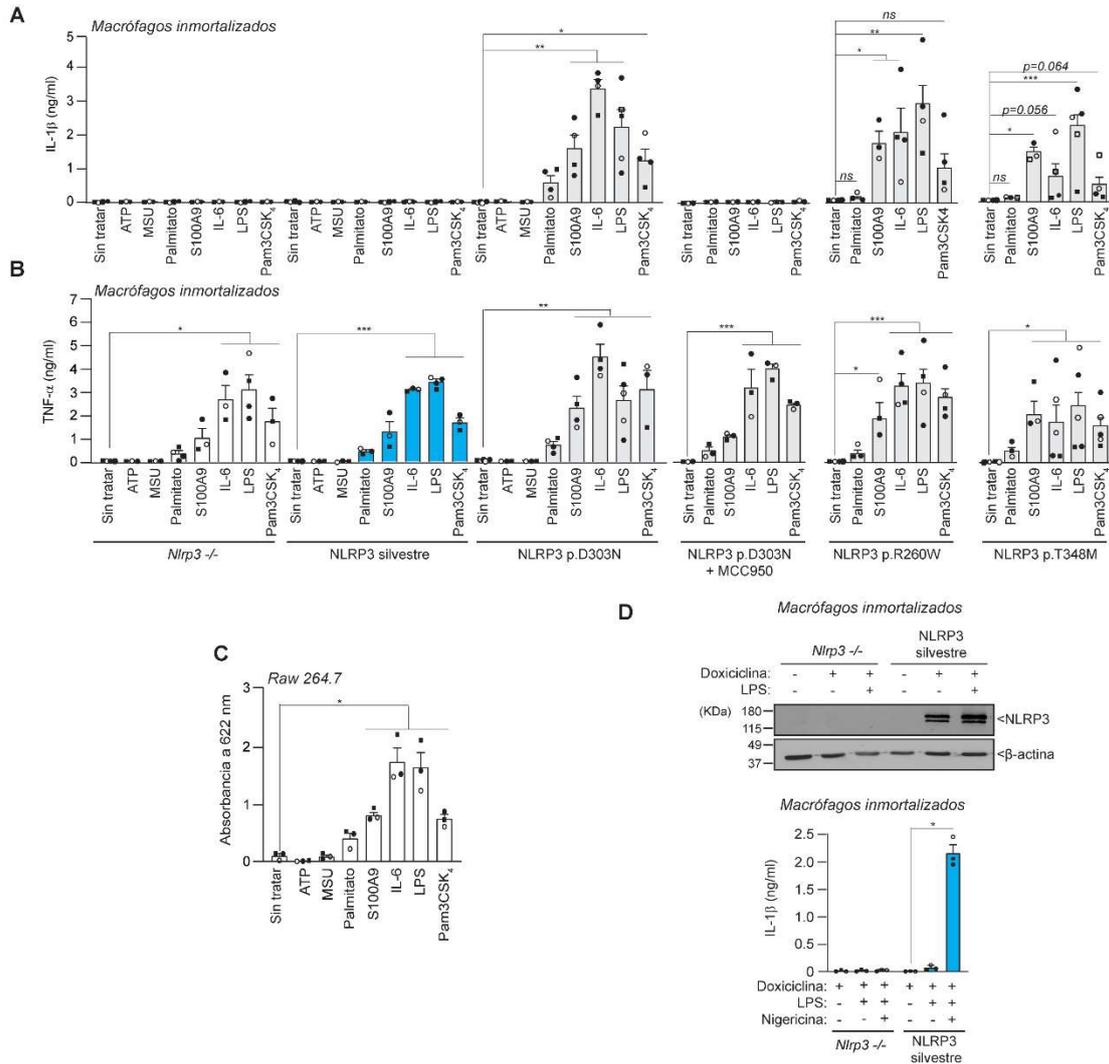


Figura 24. Diferentes PAMPs y DAMPs inducen la liberación de IL-1β dependiente de NF-κB en macrófagos que expresan variantes patológicas de NLRP3. (A, B) ELISA de IL-1β (A) y TNF-α (B) en sobrenadantes de macrófagos inmortalizados *Nlrp3*^{-/-} (iMos) que expresan NLRP3 humano silvestre o las variantes patológicas p.D303N, p.R260W y p.T348M inducidas tras el tratamiento de 16 horas con doxiciclina (1 µg/ml) en ausencia o presencia de ATP (5 mM), cristales de MSU (200 µg/ml), palmitato (1 mM), S100A9 recombinante (500 ng/ml), IL-6 recombinante (500 ng/ml), LPS (100 ng/ml), Pam3CSK₄ (1 µg/ml) y MCC950 (10 µM). (C) Cuantificación colorimétrica de los niveles de fosfatasa alcalina secretada (SEAP) de macrófagos RAW 264.7 que expresan el gen reportero SEAP bajo el control del promotor NF-κB, las células se trataron durante 4 horas con ATP (5 mM), cristales de MSU (200 µg/ml), palmitato (1 mM), S100A9 recombinante (0.5 µg/ml), IL-6 recombinante (0.5 µg/ml), LPS (0.1 µg/ml) o Pam3CSK₄ (1 µg/ml). (D) ELISA de IL-1β en sobrenadantes o Western blot de NLRP3 y β-actina en lisados de iMos que expresan o no NLRP3 silvestre tras la inducción de 16 h con doxiciclina (1 µg/ml) y nigericina (1 µg/ml).

RESULTADOS

LPS (100 ng/ml), para el ELISA las células se trataron durante 30 min adicionales con nigericina (10 μ M). Los Western blot son representativos de $n=3$ experimentos independientes; los histogramas muestran la media de $n= 3-5$ experimentos independientes (cada uno representado por un símbolo diferente) y los datos se representan como media \pm SEM; se ha utilizado la prueba estadística ANOVA para los paneles A-C. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: * $p < 0.05$; ** $p < 0.0021$; *** $p < 0.0002$; **** $p < 0.0001$; *ns* indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

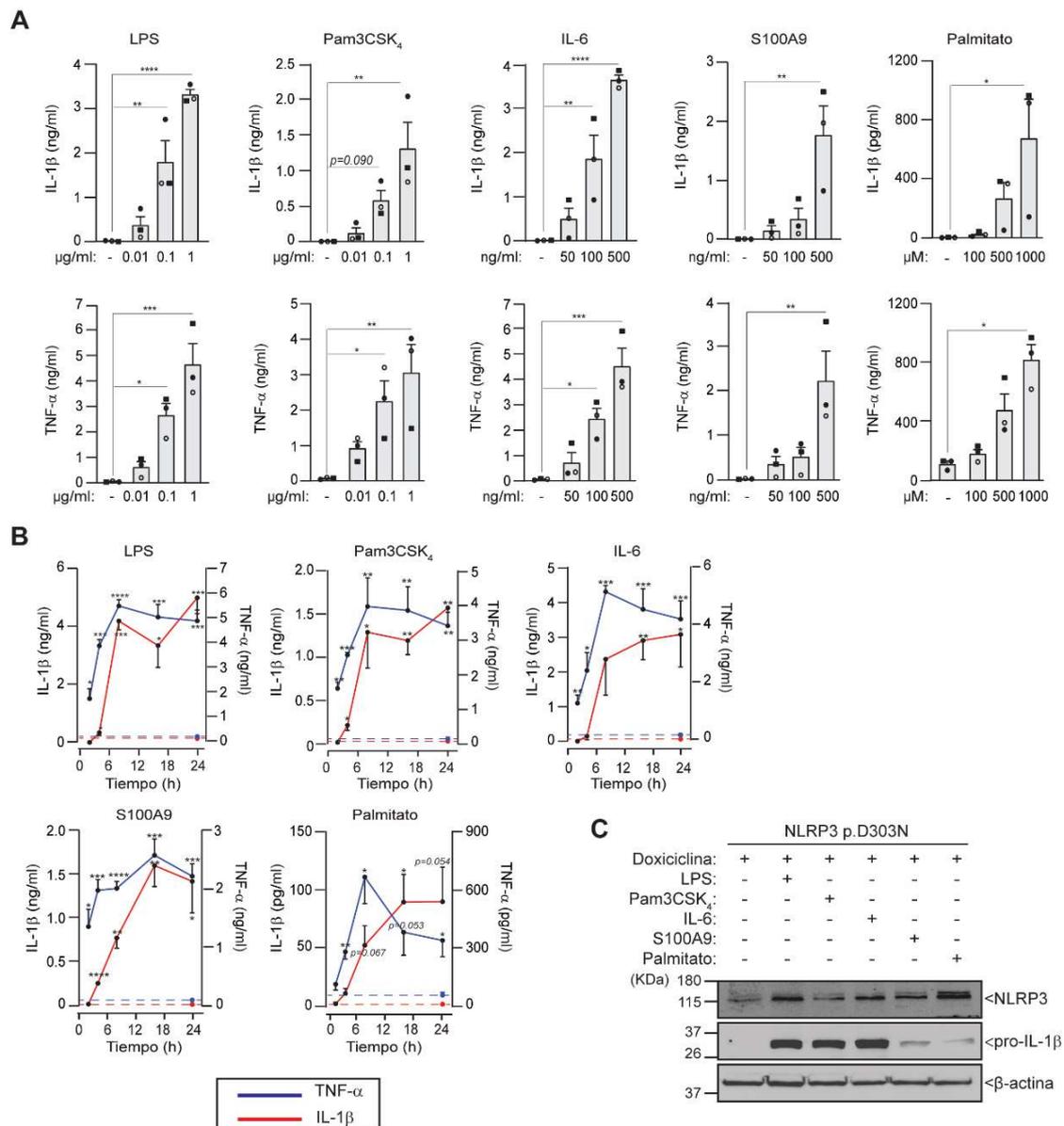


Figura 25. La dosis y el tiempo de los inductores de NF-κB condicionan la liberación de IL-1β en macrófagos con variantes de NLRP3 asociadas a CAPS (A) ELISA de IL-1β (arriba) y TNF-α (abajo) en sobrenadantes de macrófagos inmortalizados *Nlrp3*^{-/-} (iMos) que expresan la variante p.D303N de NLRP3 humana tras la inducción con doxiciclina (1 μg/ml) durante 16 h, estimulados con diferentes concentraciones de LPS, Pam3CSK₄, IL-6 recombinante, S100A9 recombinante o palmitato. (B) ELISA de IL-1β (línea roja) y TNF-α (línea azul) en sobrenadantes de iMos que expresan la variante p.D303N de NLRP3 humana tras el tratamiento de doxiciclina (1 μg/ml) durante 16h, estimulados después con LPS (100 ng/ml), Pam3CSK₄ (1 μg/ml), IL-6 recombinante (500 ng/ml), S100A9 recombinante (500 ng/ml) o palmitato (1 mM) a diferentes tiempos (0, 2, 4, 8, 16 y 24 h). Las líneas de puntos indican la liberación basal de citoquinas de IL-1β (línea roja) o TNF-α (línea azul) en iMos sin tratar cultivados durante 24 h. (C) Western blot

RESULTADOS

de NLRP3, IL-1 β y β -actina en lisados de iMos que expresan la variante p.D303N de NLRP3 humana tras 16h de tratamiento con doxiciclina (1 μ g/ml), en presencia o ausencia de LPS (100 ng/ml), Pam3CSK₄ (1 μ g/ml), IL-6 recombinante (500 ng/ml), S100A9 recombinante (500 ng/ml) o palmitato (1 mM). Los Western blots son representativos de $n=3$ experimentos independientes; las gráficas muestran la media de $n=3-4$ experimentos independientes (cada uno representado por un símbolo diferente) y los datos se representan como media \pm SEM; se ha utilizado la prueba estadística ANOVA en el panel A y la prueba T en el panel B para comparar cada hora con el control sin tratar. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: * $p < 0.05$; ** $p < 0.0021$; *** $p < 0.0002$; **** $p < 0.0001$; ns indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

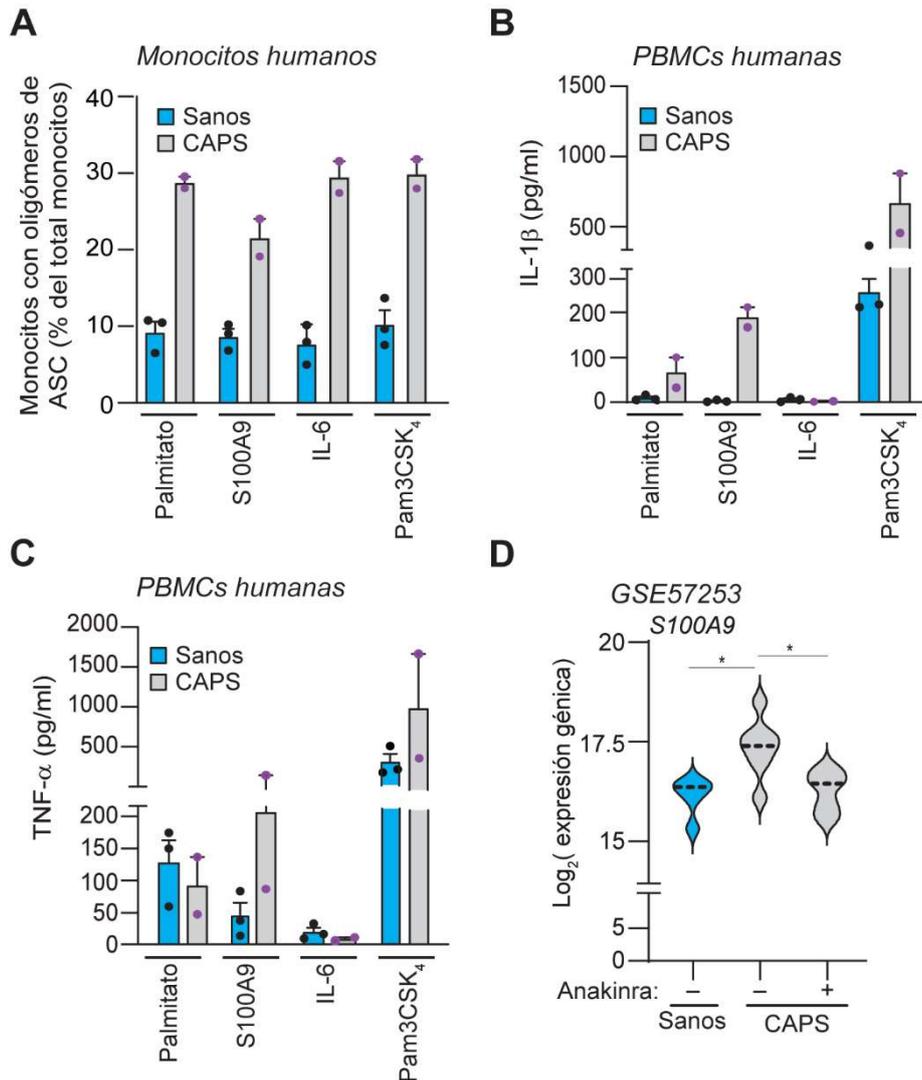


Figura 26. La activación de NF-κB con diferentes PAMPs y DAMPs aumenta la formación de oligómeros de ASC y la liberación de IL-1β en células de pacientes CAPS. (A) Porcentaje de monocitos con oligómeros de ASC de pacientes CAPS con la variante p.A439T de NLRP3 (barras grises) y de individuos sanos (barras azules) tras el tratamiento durante 6h con Pam3CSK₄ (1 μg/ml), IL-6 (500 ng/ml), S100A9 (500 ng/ml) o palmitato (1 mM). **(B, C)** ELISA de IL-1β (B) y TNF-α (C) en sobrenadantes de pacientes CAPS con la variante p.A439T de NLRP3 y de individuos sanos tratados como se indica en el panel A. **(D)** Diagrama de violín de la expresión génica de *S100A9* a partir de células sanguíneas de individuos sanos (n=5) o de pacientes con CAPS la variante p.G569R de NLRP3 (n=7) en brote inflamatorio, y estos mismos pacientes tras el tratamiento con anakinra (utilizando el conjunto de datos GSE57253); la mediana se indica por la línea central de puntos. En los paneles A-C cada punto corresponde a un donante diferente, y los datos se representan como media ± SEM; se ha utilizado la prueba estadística de Wald con la corrección de Benjamini–Hochberg para obtener el valor *p* ajustado en el panel D. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: **p* < 0.05; *ns* indica que no hay diferencias significativas (*p* > 0.05).

RESULTADOS

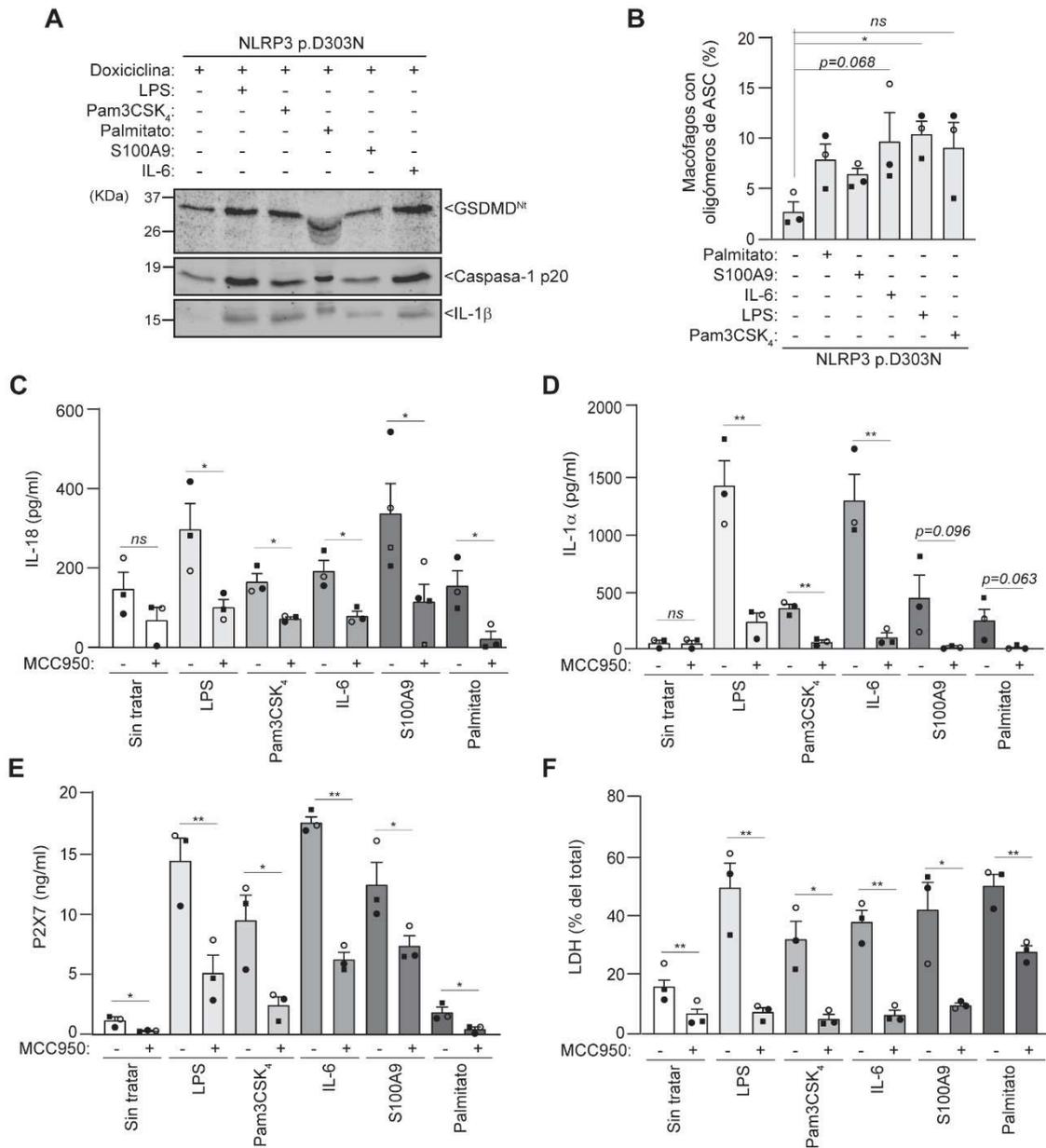


Figura 27. La inducción de NF-κB modula el inflamasoma NLRP3 con variantes patogénicas. (A) Western blot de GSDMD, caspasa-1 e IL-1β en sobrenadantes de macrófagos inmortalizados *Nlrp3*^{-/-} que expresan la variante p.D303N de NLRP3 humana inducida tras el tratamiento de 16 horas con doxiciclina (1 μg/ml) en ausencia o presencia de palmitato (1 mM), S100A9 recombinante (500 ng/ml), IL-6 recombinante (500 ng/ml), LPS (100 ng/ml) y Pam3CSK₄ (1 μg/ml). **(B)** Porcentaje de iMos con oligómeros de ASC que expresan la variante p.D303N de NLRP3 humana tratados como se indica en el panel A. **(C-E)** ELISA de IL-18 (C), IL-1α (D) y del receptor P2X7 (E) en sobrenadantes de iMos que expresan la variante p.D303N de NLRP3 humana tratados como se indica en el panel A, pero en ausencia o presencia de MCC950 (10 μM). **(F)** Porcentaje de LDH extracelular en iMos que expresan la variante p.D303N de NLRP3 humana tratados como se indica en el panel C. Los Western blots son representativos de *n*=3 experimentos independientes. Los gráficos son representativos de *n*=3-4 experimentos

RESULTADOS

independientes (cada uno representado por un símbolo diferente) y los datos se presentan como media \pm SEM; se ha utilizado la prueba estadística ANOVA en el panel B y la prueba T en los paneles C-F. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: * $p < 0.05$; ** $p < 0.0021$; *ns* indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

RESULTADOS

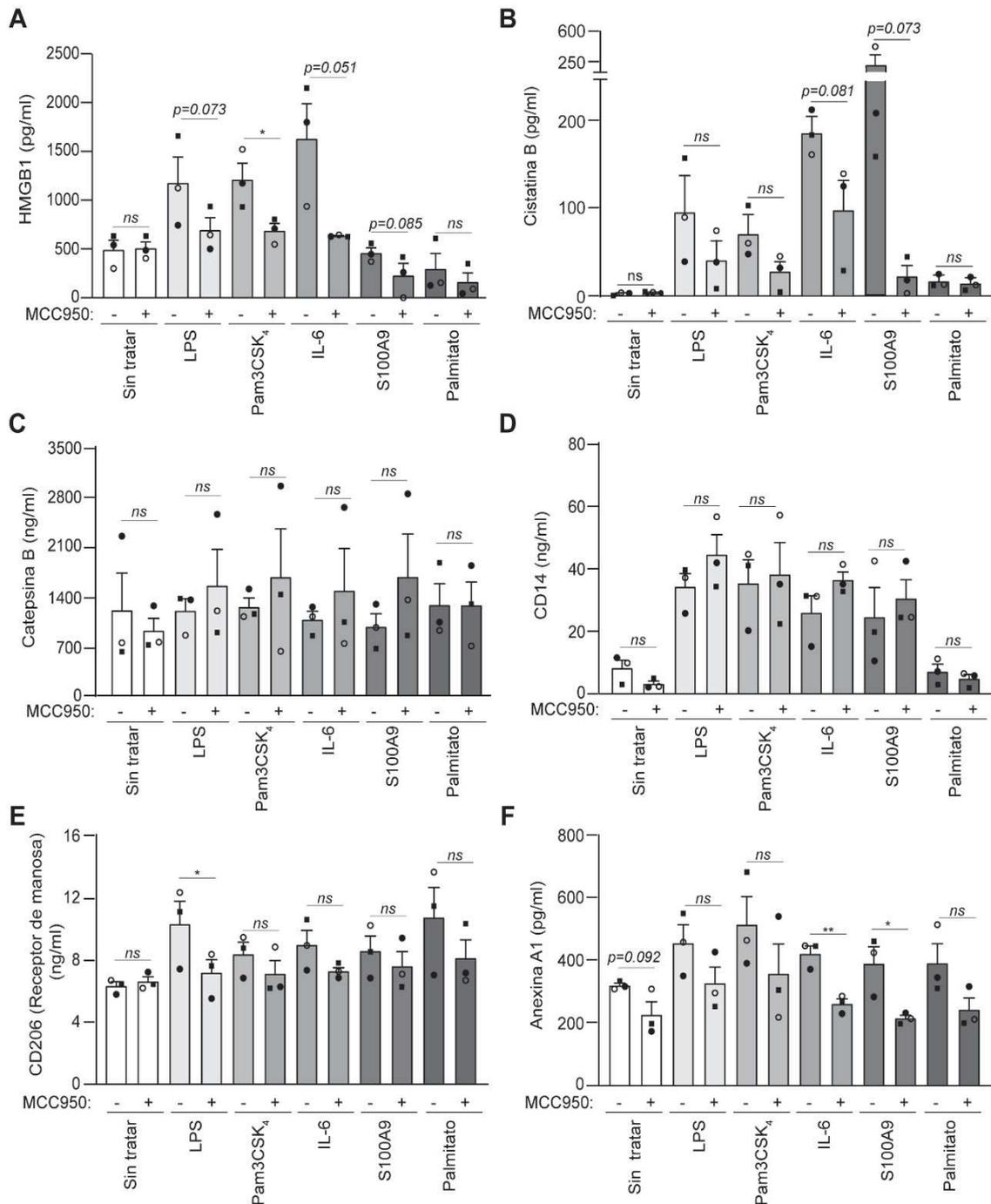


Figura 28. Secretoma del inflammasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS. (A-F) ELISA de HMGB1 (A), cistatina B (B), catepsina B (C), CD14 (D), CD206 (receptor de manosa) (E) o anexina A1 (F) en sobrenadantes de macrófagos inmortalizados *Nlrp3*^{-/-} que expresan la variante p.D303N de NLRP3 humana inducida tras el tratamiento de 16 horas con doxiciclina (1 µg/ml) en ausencia o presencia de palmitato (1 mM), S100A9 recombinante (500 ng/ml), IL-6 recombinante (500 ng/ml), LPS (100 ng/ml), Pam3CSK₄ (1 µg/ml) y MCC950 (10 µM). Los gráficos son representativos de *n*=3 experimentos independientes (cada uno representado por un símbolo diferente) y los datos se representan como media ± SEM; se ha utilizado la prueba estadística T en los paneles A-F. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: **p* < 0.05; ***p* < 0.0021; *ns* indica que no hay diferencias significativas (*p* > 0.05).

3. Regulación del inflammasoma NLRP3 asociado a CAPS por deubiquitininas

La ubiquitina juega un papel importante en la regulación postraduccional de numerosas proteínas, una de ellas es NLRP3. Se sabe que en condiciones normales la proteína NLRP3 inactiva está ubiquitinada en distintos residuos. Durante el cebado y la activación, las deubiquitininas (DUBs) eliminan la ubiquitina y permiten la activación de NLRP3 con la consecuente formación del inflammasoma (Juliana et al., 2012). Por esta razón, se ha propuesto investigar en esta Tesis el papel de las DUBs sobre la actividad del inflammasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS. Para ello, se emplearon inhibidores de DUBs de amplio espectro, como son G5 y PR-619, sobre los macrófagos que expresaban la variante p.D303N de NLRP3, estos inhibidores redujeron el procesamiento de GSDMD (**Figura 29A**) y la liberación de IL-18 (**Figura 29B**). De manera similar, el empleo del inhibidor específico de las deubiquitininas USP14 y UCHL5, b-AP15, también disminuyó el procesamiento de GSDMD y la liberación de IL-18 (**Figura 29A, B**), lo que sugiere que el proceso de deubiquitinación está implicado en la activación constitutiva del inflammasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS.

Para determinar cómo podrían afectar las DUBs a la inducción del inflammasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS tras la activación de NF- κ B mediante LPS, también se utilizaron estos inhibidores en macrófagos que expresaban la variante p.D303N de NLRP3 tras el tratamiento con LPS. De igual modo, los diferentes inhibidores de DUBs fueron capaces de reducir el procesamiento de GSDMD (**Figura 30A**) sin afectar la activación de NF- κ B inducida por LPS, determinada en las células Raw264.7 reporteras para NF- κ B (**Figura 30B**) y en la liberación de TNF- α (**Figura 30C**). Además, en presencia de LPS, los diferentes inhibidores de DUB disminuyeron la liberación de IL-18 e IL-1 β dependientes de la activación del inflammasoma (**Figura 30D, E**).

El efecto de estos inhibidores se validó en muestras de pacientes CAPS, y de forma similar a lo que ocurría en macrófagos que expresaban de forma recombinante la variante patogénica de NLRP3, el tratamiento tanto con G5 como b-AP15, resultó en una disminución del porcentaje de monocitos que contenían oligómeros de ASC en muestras de sangre, siendo esta disminución más pronunciada en muestras tratadas con LPS (**Figura 31**).

A pesar de que el tratamiento con los inhibidores de DUBs no afectó la activación de NF- κ B, todos los inhibidores de DUBs empleados (G5, PR-619 y b-AP15) redujeron significativamente la expresión de los genes *Il1b* e *Il18* inducida por LPS, sin afectar a la

RESULTADOS

expresión de *Tnf*, *Pycard*, *Casp1*, *Gsdmd*, *Nek7* o *Nlrp3* (**Figura 32**). Esto sugiere que las DUBs pueden estar modulando la actividad del inflammasoma NLRP3 con variantes patogénicas, más allá de simplemente influir en la expresión de los genes *Il1b* e *Il18*.

En resumen, los datos obtenidos tanto en monocitos de pacientes CAPS como en macrófagos que expresaban la variante patogénica de NLRP3, muestran que las deubiquitininas controlan la activación constitutiva del inflammasoma NLRP3 asociado a CAPS.

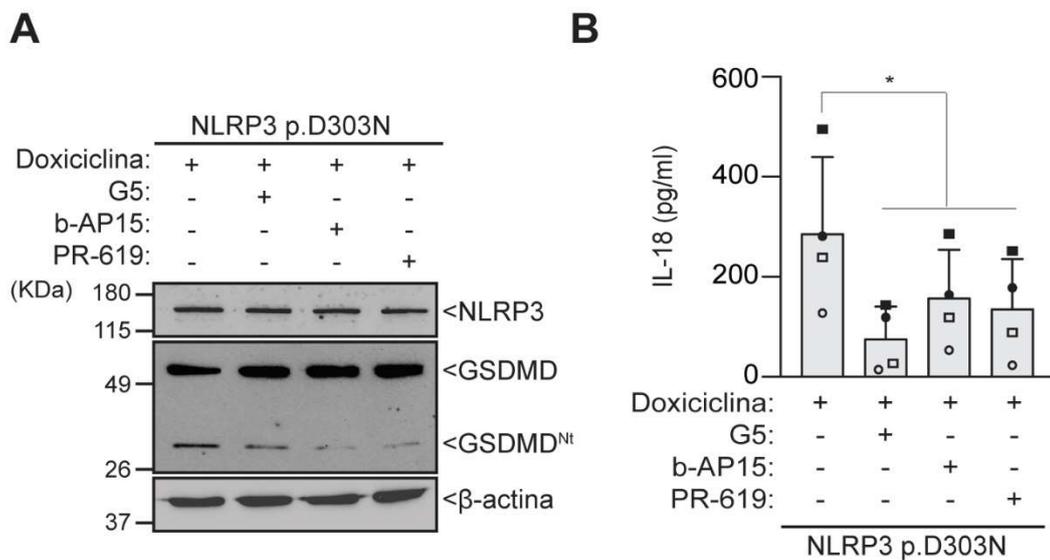


Figura 29. Las deubiquitinas modulan la activación constitutiva del inflamasoma en macrófagos que expresan la variante p.D303N de NLRP3. (A) Western blot de NLRP3, GSDMD y β -actina en lisados celulares de macrófagos inmortalizados *Nlrp3*^{-/-} (iMos) que expresan la variante p.D303N de NLRP3 humana inducida tras el tratamiento con doxiciclina (1 μ g/ml) durante 16 h, en presencia o ausencia de G5 (5 μ M), b-AP15 (5 μ M) o PR-619 (10 μ M). (B) ELISA de IL-18 en sobrenadantes de iMos tratados como se ha indicado en el panel A. Los Western blots son representativos de $n=3$ experimentos independientes. La gráfica es representativa de $n=4$ experimentos independientes (cada uno representado por un símbolo diferente) y los datos se presentan como media \pm SEM; se ha utilizado la prueba estadística T en el panel B. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: * $p < 0.05$; ns indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

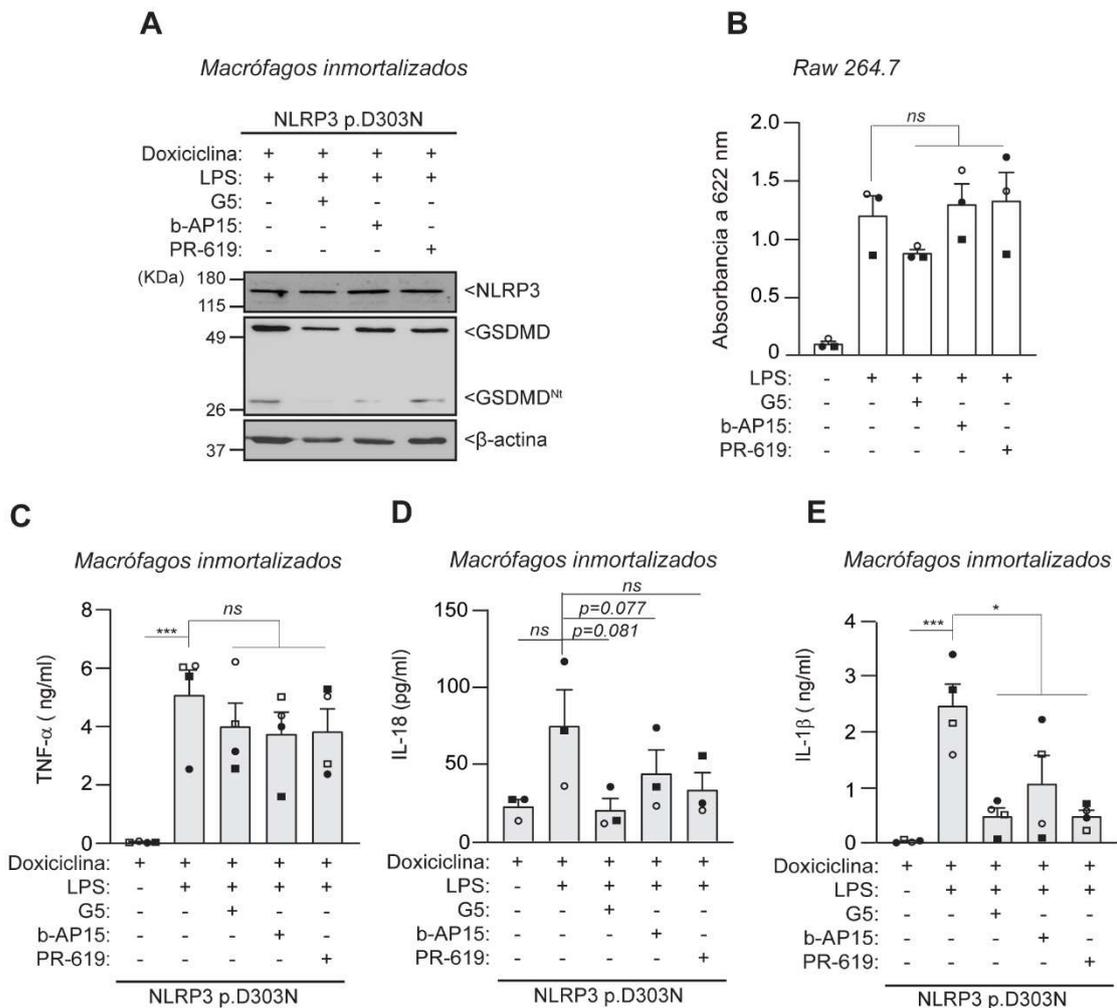


Figura 30. Las deubiquitinasas controlan la activación inflamatoria NLRP3 asociada a CAPS tras la inducción de NF-κB. (A) Western blot de NLRP3, GSDMD y β-actina en lisados celulares de macrófagos immortalizados *Nlrp3*^{-/-} (iMos) que expresan la variante p.D303N de NLRP3 humana inducida tras el tratamiento con doxiciclina (1 μg/ml) durante 16 h, después de esta incubación se trataron con LPS (100 ng/ml) en presencia o ausencia de G5 (5 μM), b-AP15 (5 μM) o PR-619 (10 μM) durante 6h. (B) Cuantificación colorimétrica de los niveles de fosfatasa alcalina secretada (SEAP) en macrófagos RAW 264.7 que expresan el gen reportero SEAP bajo el control del promotor NF-κB, las células se trataron con LPS (100 ng/ml) en presencia o ausencia de G5 (5 μM), b-AP15 (5 μM) o PR-619 (10 μM) durante 6h. (C-E) ELISA de TNF-α (C), IL-18 (D) e IL-1β (E) en sobrenadantes de iMos tratados como se ha indicado en el panel A. Los Western blots son representativos de *n*=3 experimentos independientes. Las gráficas son representativas de *n*=3-4 experimentos independientes (cada uno representado por un símbolo diferente) y los datos se presentan como media ± SEM; se ha utilizado la prueba estadística ANOVA en los paneles B-D y la prueba T en E. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: **p* < 0.05; ***p* < 0.0021; ****p* < 0.0002; *ns* indica que no hay diferencias significativas (*p* > 0.05).

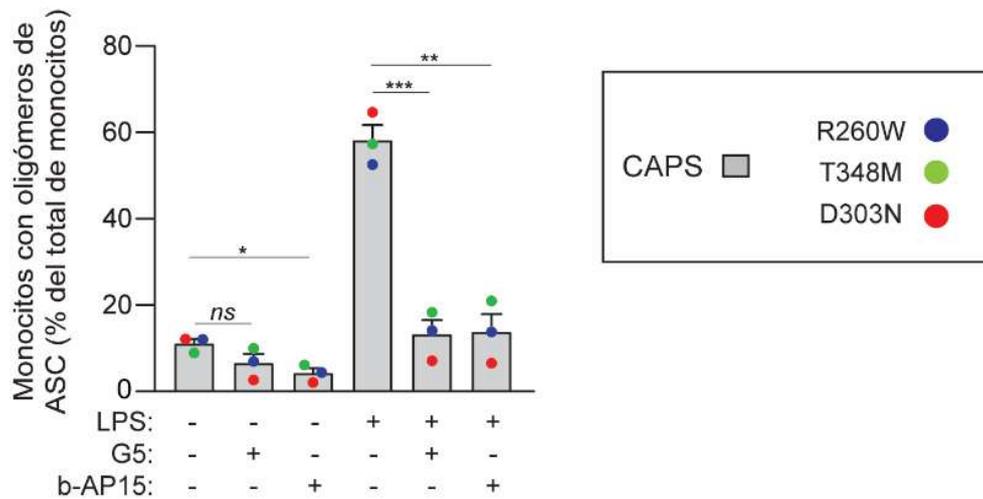


Figura 31. Las deubiquitininas están involucradas en la activación constitutiva del inflammasoma NLRP3 en pacientes CAPS. Porcentaje de monocitos con oligómeros de ASC en pacientes CAPS tras el tratamiento durante 6 h con LPS (100 ng/ml), G5 (5 μ M) o b-AP15 (5 μ M) en muestras de sangre completa (cada punto corresponde a un donante CAPS y cada color representa una variante diferente como se indica). Los datos del histograma se representan como media \pm SEM; se ha utilizado la prueba estadística T. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: * $p < 0.05$; ** $p < 0.0021$; *** $p < 0.0002$; *ns* indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

RESULTADOS

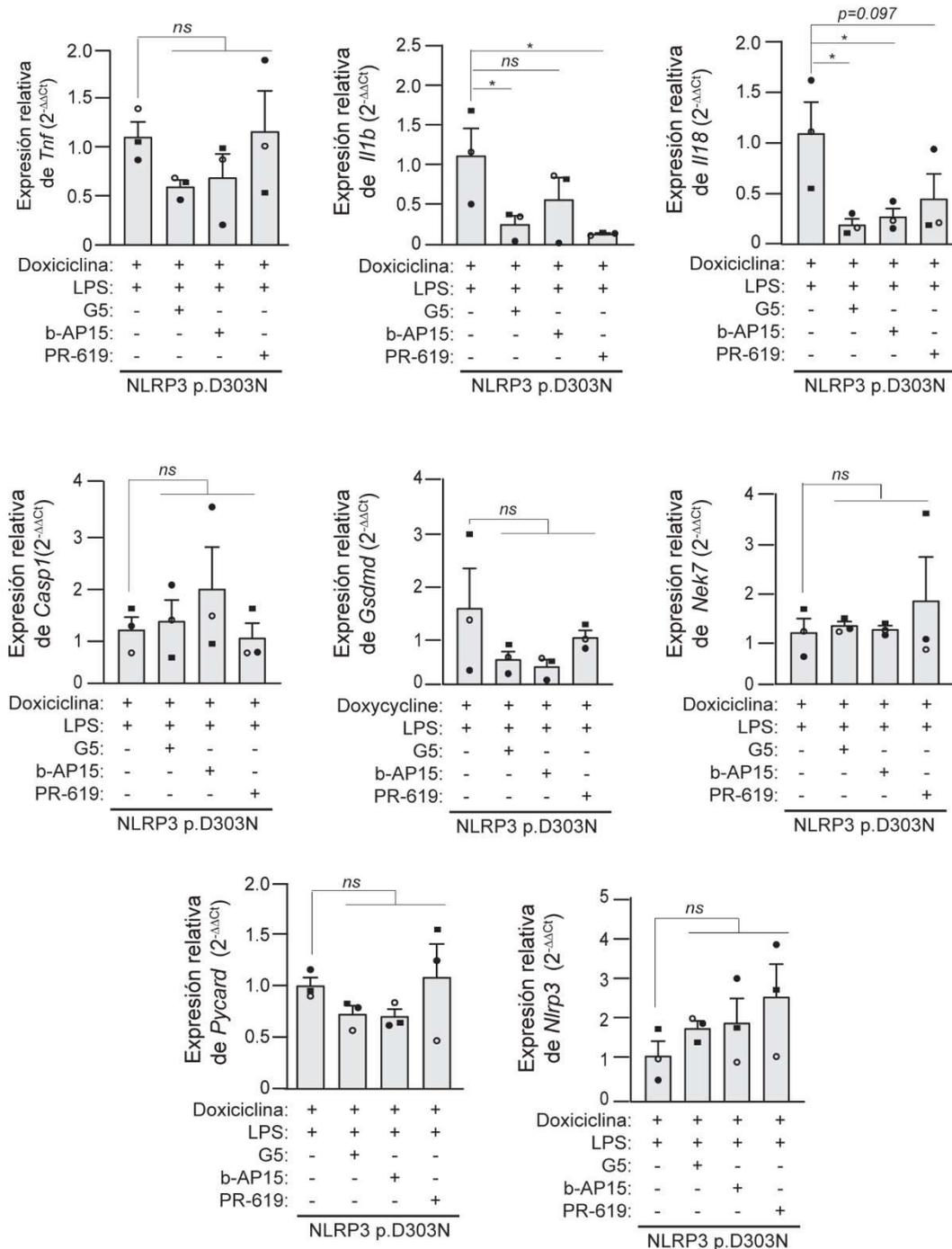


Figura 32. Los inhibidores de deubiquitinasas afectan la expresión de *Il1b* e *Il18*. Expresión génica relativa (2^{-ΔΔCt}) de *Tnf*, *Il1b*, *Il18*, *Casp1*, *Gsdmd*, *Nek7*, *Pycard* y *Nlrp3* en macrófagos inmortalizados *Nlrp3*^{-/-} que expresan la variante p.D303N de NLRP3 humana inducida tras el tratamiento con doxiciclina (1 µg/ml) durante 16 h, luego se trataron durante 6 horas con LPS (100 ng/ml), en ausencia o presencia de G5 (5 µM), b-AP15 (5 µM) o PR-619 (10 µM), los datos se muestran normalizados frente al control doxiciclina+LPS. Los gráficos son representativos de *n* = 3 experimentos independientes (cada uno representado por un símbolo diferente) y los datos se representan como media ± SEM; se ha utilizado la prueba estadística ANOVA. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: **p* < 0.05; *ns* indica que no hay diferencias significativas (*p* > 0.05).

4. La activación constitutiva del inflamasoma NLRP3 con mutaciones asociadas a CAPS induce una reprogramación metabólica de las células mieloides

4.1 Las variantes de NLRP3 asociadas a CAPS inducen reprogramación metabólica

El inmunometabolismo juega un papel importante en el progreso de la inflamación ya que produce una rápida reprogramación metabólica en los macrófagos incrementando la glicólisis y disminuyendo la respiración oxidativa (Palsson-McDermott et al., 2015). En esta Tesis se ha investigado si la activación constitutiva del inflamasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS podrían afectar al metabolismo de las células mieloides. Para ello, se hizo un estudio metabolómico no dirigido en monocitos aislados de individuos sanos o pacientes con CAPS portadores de la variante patogénica p.A439T de NLRP3, estimulados o no con LPS. Los datos obtenidos de los metabolitos se preprocesaron resultando en una matriz de datos formada por 203 metabolitos en polaridad negativa y 925 en polaridad positiva, los cuales se redujeron a 603 en polaridad positiva tras eliminar los metabolitos con alta variabilidad en las réplicas. Esta matriz de datos fusionada se representó en un gráfico de análisis de componentes principales (PCA), la cual permitió mostrar la tendencia y la variabilidad de estos metabolitos entre monocitos de individuos sanos y pacientes CAPS (**Figura 33A**). El modelo de PCA se construyó en base a 16 muestras y tres componentes, donde los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2) representaron el 25.2% y el 9.6% de la variabilidad general respectivamente, mostrando así las variaciones basadas en la covarianza total entre las cohortes de estudio. En este PCA se observó que el grupo de monocitos de pacientes con CAPS sin tratar se agrupaba cerca del grupo de monocitos de individuos sanos tratados con LPS (**Figura 33A**), de manera que su distribución se explicó principalmente por el componente 1, indicando que las diferencias entre los dos grupos podrían estar influenciadas por estas variables. Estos datos sugieren que los monocitos de pacientes con CAPS tienen un perfil proinflamatorio intrínseco.

De los metabolitos detectados, 423 de ellos tenían una abundancia diferencial entre las muestras de individuos sanos y las de pacientes con CAPS, de manera que los monocitos de individuos sanos tratados con LPS presentaban 46 metabolitos con una mayor abundancia que los no tratados. Además, concretamente estos metabolitos se encontraban aumentados en los monocitos de pacientes con CAPS tratados o no con LPS (**Figura 33B**). Por otro lado, se encontró que 121 metabolitos tenían una mayor

abundancia en monocitos CAPS en comparación con los individuos sanos, mientras que 256 metabolitos tenían una menor abundancia (**Figura 33B**). De igual modo, en los gráficos tipo volcán se observó que las mayores diferencias aparecían cuando se comparaban los monocitos de pacientes con CAPS frente a los de individuos sanos, tratados o no con LPS, mientras que las menores diferencias se obtuvieron cuando se compararon los monocitos de pacientes con CAPS no tratados con los de individuos sanos tratados con LPS, coincidiendo así con la premisa de que los pacientes CAPS presentaban un perfil proinflamatorio (**Figura 33C**).

El análisis de metabolómica no dirigida permitió identificar tentativamente 14 metabolitos cuya tasa de error oscilaba entre -2.68 y 8.52 ppm, los cuales estaban presentes de manera diferencial entre los monocitos de individuos sanos y los pacientes con CAPS. Dentro de estos metabolitos se encontraron lípidos y moléculas lipídicas, así como aminoácidos y alguno de los intermediarios relacionados con su síntesis, la mayoría de los cuales derivan de intermediarios de la glicólisis (**Figura 34A, Tabla 6**). Debido a la limitada disponibilidad de las muestras, los metabolitos no se pudieron confirmar mediante un análisis MS/MS dirigido.

Para confirmar que la presencia de variantes de NLRP3 asociadas a CAPS producían un cambio en la abundancia de los metabolitos, se realizó un análisis de metabolómica no dirigida en macrófagos inmortalizados que expresaban o no la variante patogénica p.D303N de NLRP3, en presencia o ausencia de LPS. Los resultados obtenidos de los metabolitos se preprocesaron resultando en una matriz de datos formada por 243 metabolitos en polaridad negativa y 636 en polaridad positiva, de los cuales 166 se encontraban aumentados en los macrófagos que expresaban la variante patogénica de NLRP3. En este caso, el modelo PCA se construyó en base a 12 muestras y tres componentes, donde PC1 y PC2 representaron el 29.5% y el 15.9% de la variabilidad total, respectivamente. De manera similar a los monocitos, los macrófagos que expresaban la variante p.D303N de NLRP3 se agrupaban más estrechamente con los macrófagos tratados con LPS que no expresaban NLRP3 (**Figura 34B**). Además, en este estudio se identificaron tentativamente 17 metabolitos con una tasa de error que oscilaba entre -2.69 y 8.87 ppm, dentro de esos metabolitos se encontraron lípidos y aminoácidos, incluyendo alguno de sus derivados o intermediarios (**Figura 34B, Tabla 7**). En ambos estudios metabolómicos no dirigidos se identificaron tentativamente metabolitos similares (**Figura 34B, Tabla 6,7**). Estos datos confirman que la expresión de variantes patogénicas de NLRP3 afecta a distintas vías metabólicas en los monocitos de pacientes con CAPS, produciendo así una reprogramación metabólica.

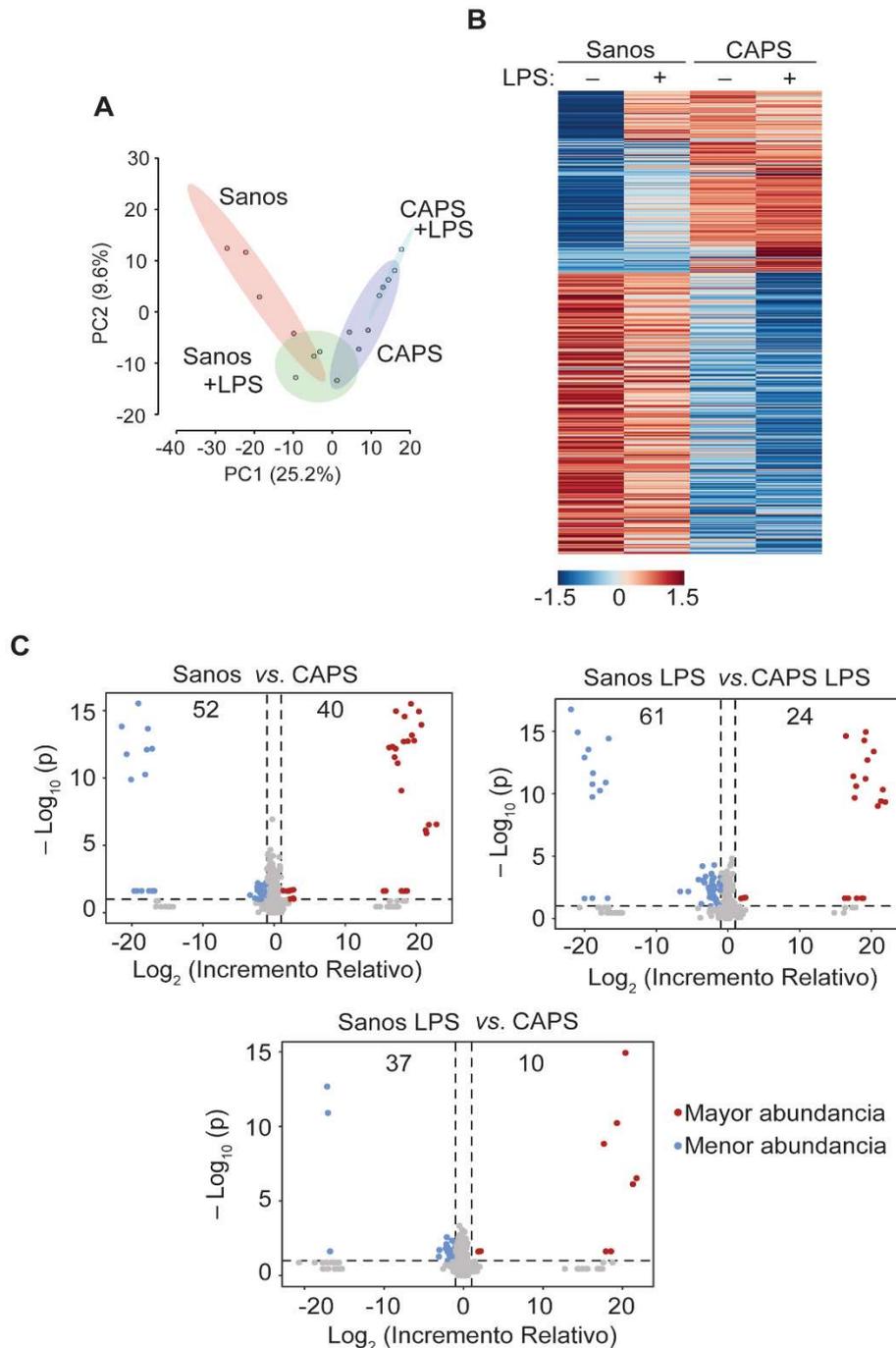


Figura 33. Los monocitos de pacientes con CAPS presentan un metabolismo alterado. (A) Análisis de componente principal (PCA) de perfiles metabolómicos de monocitos de individuos sanos ($n=4$) y CAPS ($n=4$) portadores de la variante p.A439T de NLRP3 tratados o no con LPS durante 2 h (500 ng/ml). **(B)** Perfiles metabolómicos de monocitos de individuos sanos (media de $n=4$) y CAPS (media de $n=4$) tratados como se ha indicado en el panel A. **(C)** Gráficos tipo volcán de monocitos de individuos sanos ($n=4$) y pacientes con CAPS ($n=4$) tratados como se ha indicado en el panel A; se representa el \log_2 del incremento relativo frente al $-\text{Log}_{10}$ del valor p obtenido de la prueba estadística T para obtener la diferencia significativa en la abundancia de los metabolitos; la gráficas representan los metabolitos con mayor abundancia (rojo) o menor abundancia (azul) en monocitos de pacientes CAPS en comparación con los monocitos de individuos sanos.

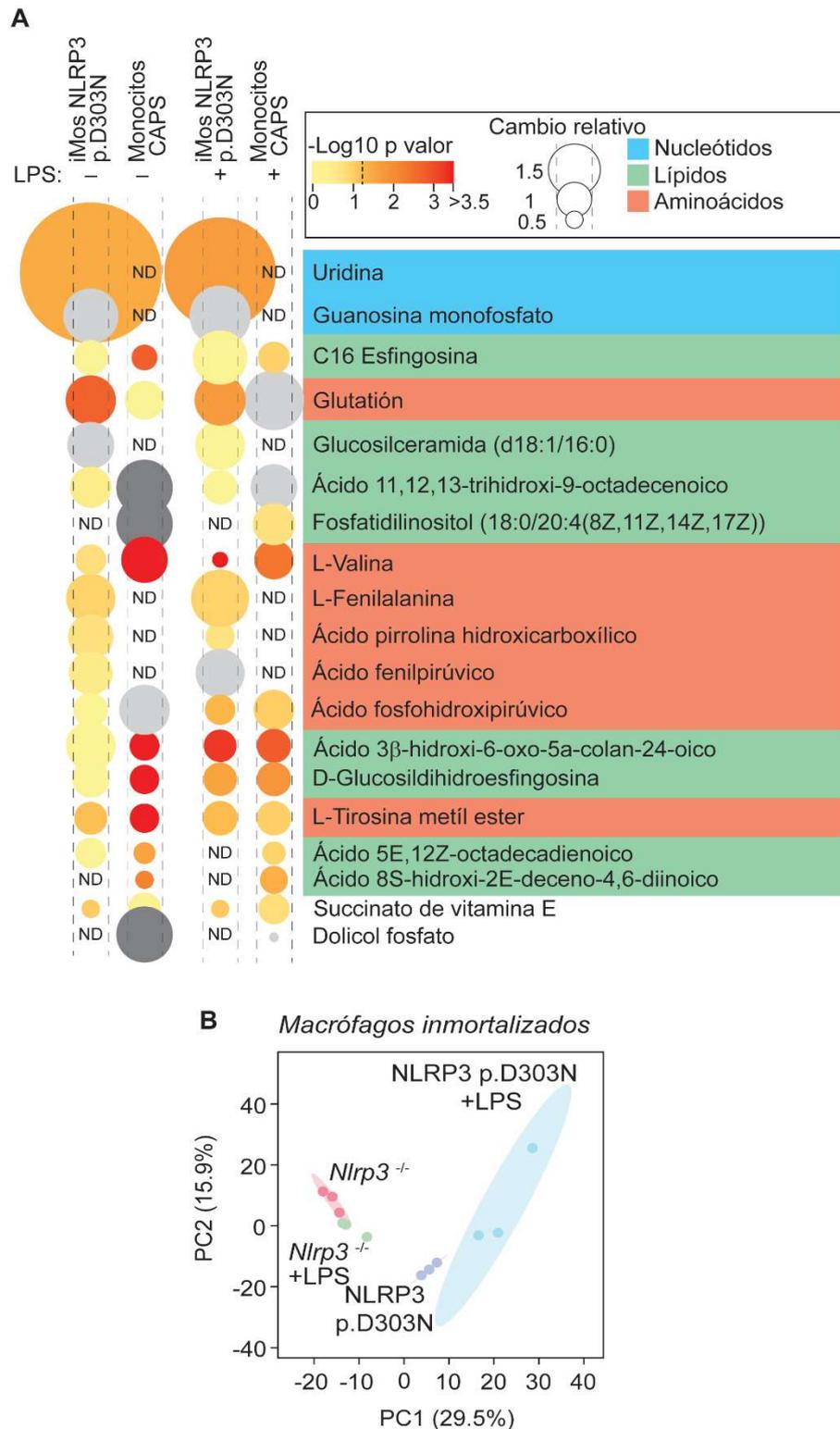


Figura 34. Metabolitos identificados tentativamente en células mieloides con variantes de NLRP3 asociadas a CAPS (A) Representación de la abundancia relativa de metabolitos identificados tentativamente en monocitos CAPS humanos ($n=4$) portadores de la variante p.A439T de NLRP3 e iMos que expresan la variante p.D303N de NLRP3 humana ($n=3$). Los monocitos se trataron con o sin LPS (500 ng/ml) durante 2h mientras que los iMos se trataron durante 16 h con doxiciclina y luego con o sin LPS (100 ng/ml) durante 4h. Los metabolitos se

RESULTADOS

agrupan según sus propiedades: nucleótidos (azul), lípidos (verde) y aminoácidos (naranja). Los datos se representan como círculos, donde el tamaño indica el cambio relativo comparado con los monocitos de individuos sanos o los iMos que no expresan NLRP3, el color representa el $-\text{Log}_{10}$ del p valor (la línea de puntos en la escala de colores representa $p=0.05$). El gris claro indica insuficiencia para calcular la estadística, mientras que el gris oscuro indica que el metabolito no se detectó en monocitos de individuos sanos; ND: no detectado. **(B)** Análisis de componente principal (PCA) de los perfiles metabolómicos de iMos que expresan la variante p.D303N de NLRP3 humana o no la expresan (*Nlrp3*^{-/-}), tratados con doxiciclina (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 16 h y luego con o sin LPS (100 ng/ml) durante 4 h. El gráfico representa datos de ($n=3$) experimentos independientes.

Tabla 6. Metabolitos identificados tentativamente en monocitos humanos.

Metabolito	Formula	Masa	Polaridad	error (ppm)	Sin tratar (CR)	LPS (CR)
Glutación	C10H17N3 O6S	307.084	Pos	0.63	1.04	1.60
Ácido 11,12,13-trihidroxi-9-octadecenoico	C18H34 O5	330.240	Neg	-1.73	#	1.35
Fosfatidilinositol (18:0/20:4(8Z,11Z,14Z,17Z))	C47H83 O13P	886.557	Neg	-0.43	#	1.22
L-Valina	C5H11 NO2	117.078	Pos	4.05	1.34*	1.14*
Ácido fosfohidroxipirúvico	C3H5O 7P	183.978	Pos	8.52	1.45	1.16
Succinato de vitamina E	C33H54 O5	530.397	Pos	7.5	0.96	0.89
Ácido 3b-hidroxi-6-oxo-5a-colan-24-oico	C24H38 O4	390.276	Pos	6.5	0.86*	0.91*
D-Glucosildihidroesfinfosina	C24H49N O7	463.350	Pos	1.18	0.85*	0.91*
L-Tirosina metil ester	C10H13N O3	195.089	Neg	-0.68	0.85*	0.92
Butil etil malonato	C9H16 O4	188.104	Neg	-2.68	0.82*	0.94
C16 esfingosina	C16H33N O2	271.250	Pos	-1.41	0.74*	0.92
Ácido 5E,12Z-octadecadienoico	C18H32 O2	280.240	Pos	2.21	0.63*	0.67
Ácido 8S-hidroxi-2E-Deceno-4,6-diinoico	C10H10 O3	178.063	Pos	3.7	0.53*	0.81*
Dolicol fosfato	C25H45O 4P	440.306	Pos	4.5	#	0.27

Abreviaturas; #: solo se ha detectado en CAPS; CR: Cambio Relativo; Neg: negativo; Pos: positivo; *p<0.05.

RESULTADOS

Tabla 7. Metabolitos identificados tentativamente en macrófagos que expresan la variante p.D303N de NLRP3.

Metabolito	Fórmula	Masa	Polaridad	error (ppm)	Sin tratar (CR)	LPS (CR)
Uridina	C9H12N2O6	244.069	Neg	0.67	4.09*	3.22*
Guanosina monofosfato	C10H14N5O8P	363.057	Neg	-1.37	1.59	1.76
C16 esfingosina	C16H33NO2	271.250	Pos	-1.21	1.01	1.57
Glutati6n	C10H17N3O6S	307.083	Neg	0.31	1.45*	1.47*
Glucosilceramida (d18:1/16:0)	C40H77NO8	699.566	Neg	-2.69	1.24	1.43
Ácido 11,12,13-trihidroxi-9-octadecenoico	C18H34O5	330.241	Neg	1.14	1.10	0.99
L-Valina	C5H11NO2	117.078	Pos	-0.67	0.89	0.46*
L-Fenilalanina	C9H11NO2	165.078	Pos	-1.69	1.42	1.54
Ácido pirrolina hidroxicarboxílico	C5H7NO3	129.042	Neg	-1.5	1.35	0.84
Ácido fenilpirúvico	C9H8O3	164.048	Pos	8.87	1.26	1.29
Ácido fosfohidroxipirúvico	C3H5O7P	183.978	Pos	6.04	0.96	0.87*
Ácido 3b-Hidroxi-6-oxo-5a-colan-24-oico	C24H38O4	390.277	Pos	0.74	1.32	0.87*
D-Glucosildihidroesfingosina	C24H49NO7	463.351	Pos	0.86	0.99	0.89
L-Tirosina metil ester	C10H13NO3	195.089	Neg	-0.22	0.95	0.92
Butil etil malonato	C9H16O4	188.105	Neg	1.28	0.94	0.95
Ácido 5E,12Z-octadecadienoico	C18H32O2	280.241	Pos	2.75	0.89	ND
Succinato de vitamina E	C33H54O5	530.396	Pos	-1.56	0.53	0.52

Abreviaturas: CR: Cambio Relativo; ND: no detectado en macrófagos NLRP3 p.D303N; Neg: negativo; Pos: positivo; *p<0.05.

4.2 El inflamasoma NLRP3 con variantes patogénicas asociadas a CAPS altera la expresión de los genes de la glicólisis

Habiendo confirmado que NLRP3 con variantes asociadas a CAPS producía una reprogramación metabólica en las células mieloides, el siguiente paso era indagar más sobre qué rutas metabólicas podrían estar alteradas. Para ello, se examinó la expresión de genes relacionados con el metabolismo en dos conjuntos de datos de GEO (GSE57253 y GSE17732), los cuales incluían muestras de sangre de pacientes con CAPS que se encontraban en brote inflamatorio (Canna et al., 2014; Stojanov et al., 2011). Curiosamente, se observó una expresión diferencial de genes asociados con la glicólisis y la vía de las pentosas fosfato en las células sanguíneas de pacientes con CAPS en brote inflamatorio (**Figura 35A, B**). Además, el tratamiento con anakinra en estos pacientes normalizó la expresión de estos genes (**Figura 35A**). El análisis de expresión diferencial mostró que los genes asociados a las pentosas fosfato (*DERA*, *PGM2*, *NAMPT*) y los asociados a la glicólisis (*BPGM*, *LDHA*, *PFKFB3*) tenían una mayor expresión en las muestras de pacientes CAPS con la enfermedad activa, mientras que el tratamiento con anakinra disminuía esta expresión (**Figura 35A, B**). Sin embargo, en la expresión del gen *ENO3* que codifica para la enzima enolasa 3, se observó una disminución de la expresión génica en los pacientes CAPS con enfermedad activa, mientras que el tratamiento con anakinra restauró esta expresión (**Figura 35A, B**).

Este análisis de la expresión génica también se llevó a cabo en macrófagos inmortalizados que expresaban la variante p.D303N de NLRP3, de manera similar a las muestras de pacientes CAPS, se observó un incremento de la expresión de los genes relacionados con la ruta de las pentosas fosfato, en contraste con una regulación negativa para los genes relacionados con la glicólisis (**Figura 35C**). Esta discrepancia, podía ser consecuencia de que en el caso de los pacientes CAPS, las muestras de sangre para estos estudios se extrajeron durante un brote inflamatorio, mientras que los macrófagos carecían de una señal de cebado que simulara el brote inflamatorio, y solamente presentan la activación constitutiva del inflamasoma. De hecho, el tratamiento con anakinra en los pacientes CAPS produjo una regulación negativa en la expresión de los genes glicolíticos, similar a los resultados observados en los macrófagos que expresaban la variante p.D303N de NLRP3 (**Figura 35A, C**).

Para conseguir un análisis más completo sobre el metabolismo, se hizo un estudio de secuenciación de ARN en macrófagos inmortalizados que expresaban la variante p.D303N de NLRP3. Se encontró que la mayoría de los genes de la glicólisis estaban regulados negativamente cuando se expresaba NLRP3 p.D303N, mientras que

el tratamiento con MCC950 recuperó los niveles de expresión (**Figura 36A, B**). Por el contrario, dentro de los genes que estaban regulados positivamente se encontraron aquellos que estaban relacionados con la vía de las pentosas fosfato (**Figura 36A, C**). No obstante, la expresión de NLRP3 silvestre en los macrófagos inmortalizados no mostró diferencias significativas en la expresión de los genes relacionados con la glicólisis y con la vía de las pentosas fosfato (**Figura 36B, C**), sugiriendo que esta alteración de la expresión génica era dependiente de la expresión de variantes de NLRP3 asociadas a CAPS.

Curiosamente, dentro del grupo de genes regulados positivamente en macrófagos que expresaban la variante p.D303N de NLRP3, se encontraron genes relacionados con la respuesta inflamatoria (**Figura 36A**). Además, como muestra el estudio de ontología de genes (GO) también se encontraron genes relacionados con la apoptosis, el metabolismo de lípidos y aminoácidos, las respuestas inmunes frente a virus, el estrés oxidativo y la citoquina IL-17. Esto destaca que las variantes asociadas a CAPS exhiben cambios en lípidos, aminoácidos e intermediarios, junto con un estado inflamatorio basal, lo que potencialmente mejora la capacidad inmunitaria frente a las infecciones (**Figura 37A, Tabla 8**). Entre los genes inflamatorios inducidos, se encontró una regulación positiva de los receptores nucleares 4A1 y 4A2, los cuales son factores de transcripción clave para la activación inflamatoria de los macrófagos. Por otro lado, cuando se analizaron los procesos biológicos regulados negativamente en macrófagos que expresaban la variante p.D303N de NLRP3, se identificaron vías relacionadas con las funciones homeostáticas celulares y la regeneración de tejidos, incluida la transcripción, la proliferación celular, la organización del citoesqueleto, la regulación de la angiogénesis, la migración celular o las cascadas ERK. Es importante destacar que los genes asociados con la respuesta a hipoxia y el metabolismo de los lípidos y los carbohidratos también estaban regulados negativamente (**Figura 37B, Tabla 9**).

En resumen, estos datos muestran que la expresión de los genes glicolíticos están afectados en macrófagos con variantes de NLRP3 asociadas a CAPS. Además, estas variantes inducen una regulación positiva de genes relacionados con la inflamación.

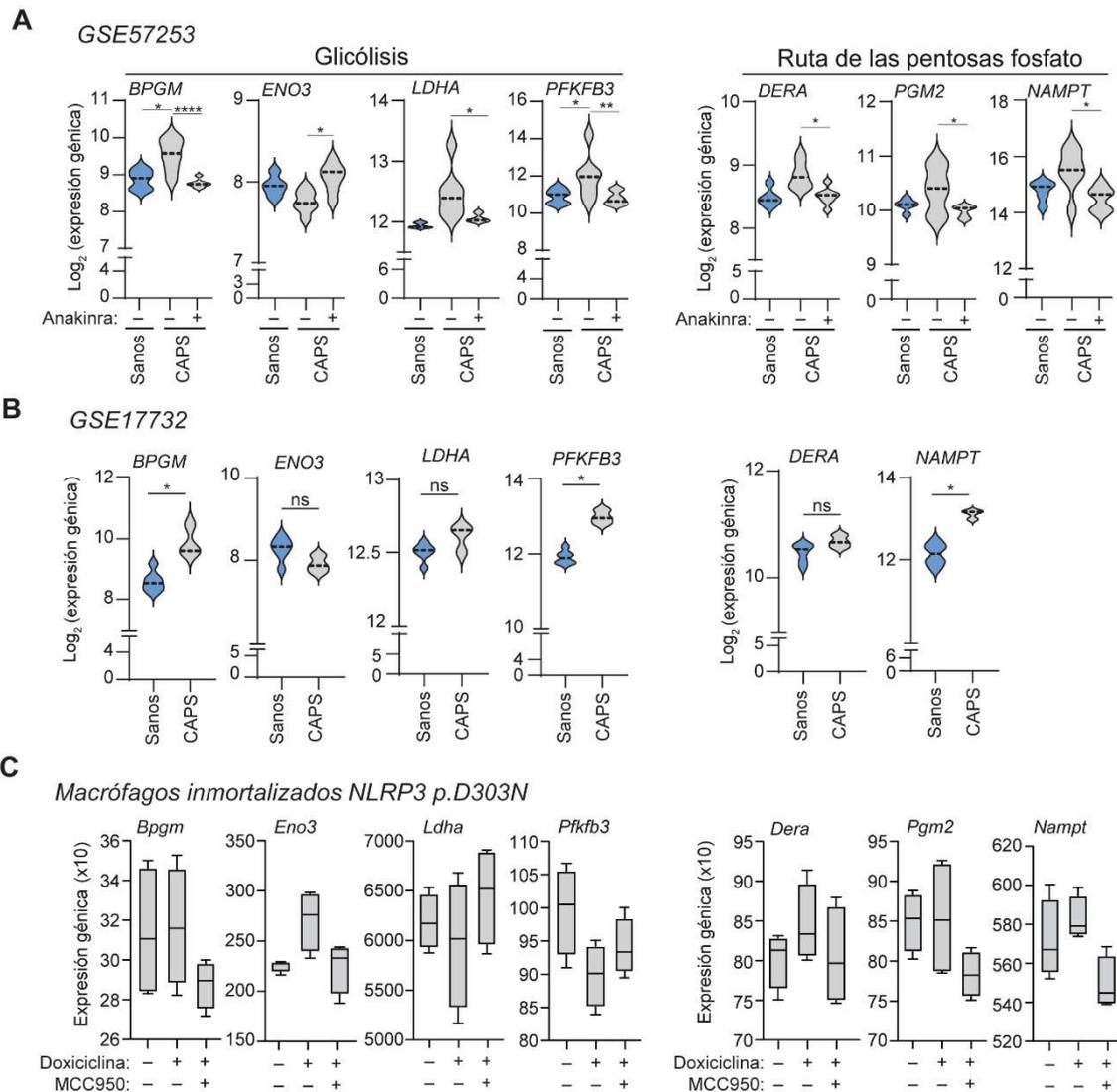


Figura 35. La expresión de variantes asociadas a CAPS presentan una expresión alterada de genes relacionados con el metabolismo. (A, B) Expresión de genes de la vía de la glicólisis y las pentosas fosfato en células sanguíneas de individuos sanos ($n=5$) o pacientes CAPS ($n=7$) durante la enfermedad activa y esos mismos pacientes tratados con anakinra ($n=7$) (utilizando el conjunto de datos GSE57253) (A) y en células sanguíneas de individuos sanos ($n=6$) o pacientes CAPS ($n=3$) durante la enfermedad activa (utilizando el conjunto de datos GSE17732) (B). La mediana está representada por la línea punteada. Los datos se analizaron mediante la prueba estadística de Wald, con corrección de Benjamini-Hochberg en el panel A, y la prueba T con corrección de Benjamini-Hochberg en el panel B. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: * $p < 0,05$; ** $p < 0.0021$; **** $p < 0.0001$; ns indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$). (C) Diagrama de cajas de la expresión de genes de la glicólisis (*Bpgm*, *Eno3*, *Ldha*, *Pfkfb3*) y de la vía de las pentosas fosfato (*Dera*, *Pgm2*, *Nampt*) en macrófagos inmortalizados *Nlrp3*^{-/-} de ratón tratados durante 16 h con o sin doxiciclina (1 $\mu\text{g/ml}$) para inducir la expresión de la variante p.D303N de NLRP3 humana en ausencia/presencia de MCC950 (10 μM). La línea central representa la media y las barras de error representan el mínimo y el máximo; el gráfico representa datos de ($n=4$) experimentos independientes.

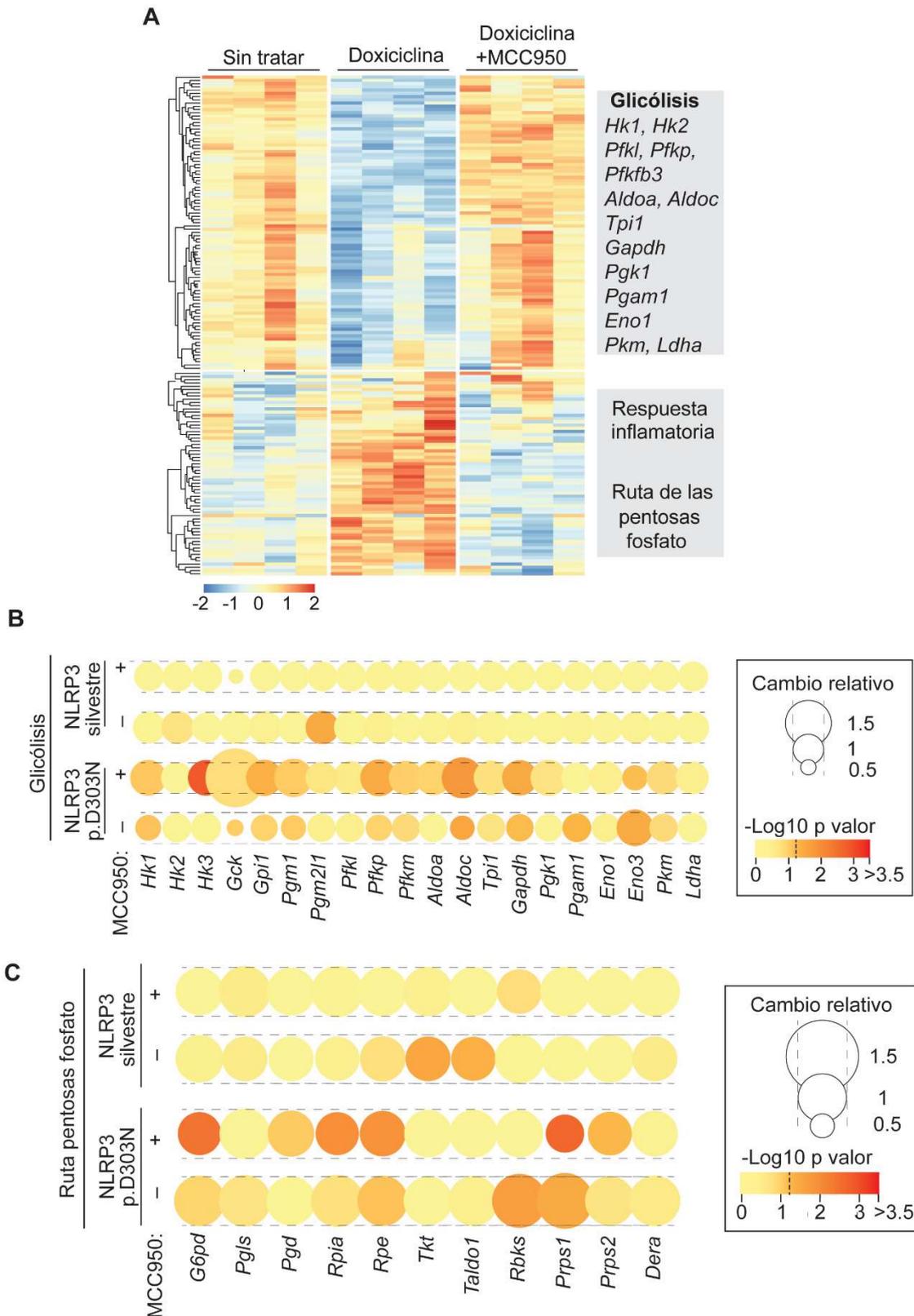


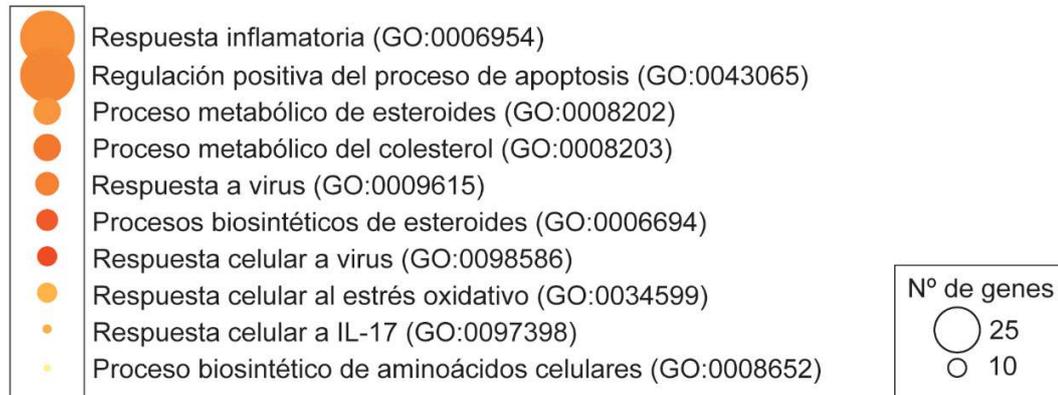
Figura 36. Análisis de transcriptómica en macrófagos que expresan la variante patogénica p.D303N de NLRP3. (A) Perfil de expresión génica de macrófagos inmortalizados *Nlrp3*^{-/-} (iMos) tratados durante 16 h con o sin doxyciclina (1 µg/ml) para inducir la expresión de la variante p.D303N de NLRP3 humana, en ausencia o presencia de MCC950 (10 µM). Los cuadros grises de la derecha resaltan algunos de los genes o vías identificadas en cada tendencia. Los datos

RESULTADOS

representados en los gráficos se derivan de $n=4$ experimentos independientes. **(B, C)** Expresión relativa de genes de la glicólisis (B) y de la vía de las pentosas fosfato (C) de iMos tratados como se describe en el panel A, que expresan NLRP3 silvestre o la variante p.D303N. Los datos se representan como círculos, mostrando el cambio relativo de las células tratadas con doxiciclina frente a las células no tratadas, y de las tratadas con doxiciclina en presencia de MCC950 frente a doxiciclina; el color representa el $-\text{Log}_{10}$ del p valor (la línea de puntos en la escala de colores representa $p=0.05$). Los gráficos representan datos de $n=3-4$ experimentos independientes.

A

Enriquecimiento GO de procesos biológicos regulados positivamente en la variante p.D303N de NLRP3:



B

Enriquecimiento GO de procesos biológicos regulados negativamente en la variante p.D303N de NLRP3:

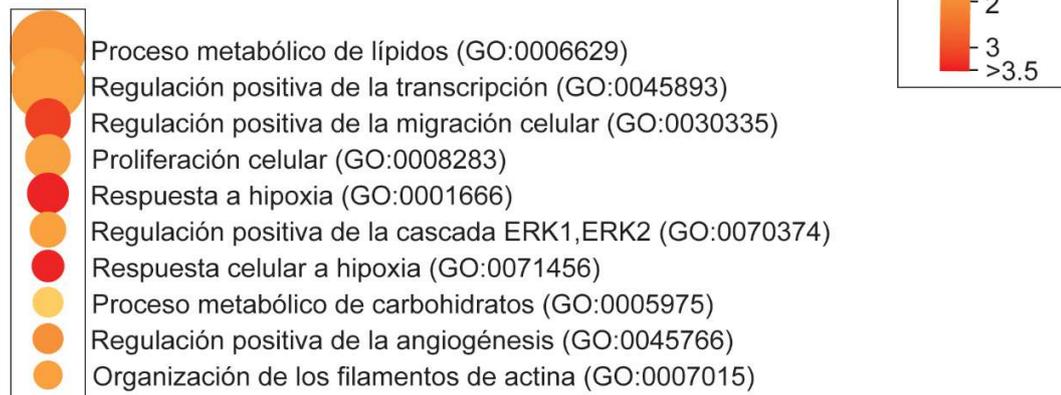


Figura 37. Análisis de enriquecimiento GO en macrófagos que expresan la variante patógena NLRP3 p.D303N. (A, B) Análisis de enriquecimiento GO de procesos biológicos de genes expresados positivamente (A) o negativamente (B) en macrófagos inmortalizados *Nlrp3*^{-/-} tratados durante 16 h con o sin doxiciclina (1 µg/ml) para inducir la expresión de la variante p.D303N de NLRP3 humana, en ausencia o presencia de MCC950 (10 µM). Los datos se representan como círculos, donde el tamaño indica el número de genes para ese proceso en particular y el color representa el $-\text{Log}_{10}$ del p valor (la línea de puntos en la escala de colores representa $p=0.05$). Los gráficos representan datos de $n=4$ experimentos independientes. Los conjuntos de genes con un valor p ajustado <0.05 mediante el método Benjamini-Hochberg se han considerado enriquecidos significativamente.

RESULTADOS

Tabla 8. Procesos biológicos de genes regulados positivamente en macrófagos que expresan la variante p.D303N de NLRP3.

Proceso biológico GO	Nº de genes	p-valor	Benjamini-Hochberg	Genes
Respuesta inflamatoria (GO:0006954)	30	1.86 x10 ⁻⁴	0.00944	<i>Il1rn, Ddx3x, Dhx9, C5ar1, Hmgb1, Ptgs2, Cxcl2, Tnf, Ccl7, Zc3h12a, Nfkbiz, Ccl2, Ccr7, Cd14, Tnfrsf4, Map2k3, Ccl22, Stard7, Acod1, Ppbp, Tnfrsf1b, Nfkb1, Il17ra, Nfkb2, Cxcl10,</i>
Regulación positiva del proceso de apoptosis (GO:0043065)	30	1.32 x10 ⁻⁴	0.00733	<i>Top2a, Tomm40, Ddx3x, Hmgb1, Ptgs2, Tnf, Hspd1, Ing5, Rassf2, Casp3, C1qbp, Bcl2a1d, Bcl2a1b, Tgm2, Utp11, Ripk2, Txnrd1, Rrp1b, Siah1b, Dhodh, Dnaja1, Nr4a1, Melk, Il1b, Lcn2, Fdps, Hmgcs1, Insig1, Dhcr24, Msmo1, Hmgcr, Srebf2, Cyp51, Nsdhl, Erg28, Chst10, Dhcr7, Ldlr, Lbr, Fdft1</i>
Proceso metabólico de esteroides (GO:0008202)	15	3.12 x10 ⁻⁴	0.01427	<i>Fdps, Hmgcs1, Insig1, Dhcr24, Msmo1, Hmgcr, Srebf2, Cyp51, Nsdhl, Erg28, Chst10, Dhcr7, Ldlr, Lbr, Fdft1</i>
Proceso metabólico del colesterol (GO:0008203)	15	5.46 x10 ⁻⁵	0.00362	<i>Fdps, Hmgcs1, Insig1, Lrp5, Dhcr24, Msmo1, Hmgcr, Srebf2, Cyp51, Sqle, Nsdhl, Dhcr7, Ldlr, Lbr, Fdft1</i>
Respuesta a virus (GO:0009615)	13	1.38 x10 ⁻⁴	0.00748	<i>Ivns1abp, Ifitm3, Ifitm2, Ddx3x, Rsad2, Ddx1, Odc1, Ddx21, Irak3, Tnf, Il17ra, Lcn2, Oasl1</i>
Proceso biosintético de esteroides (GO:0006694)	12	2.01 x10 ⁻⁵	0.00171	<i>Fdps, Nsdhl, Erg28, Hmgcs1, Dhcr24, Msmo1, Dhcr7, Hmgcr, Hsd17b7, Lbr, Cyp51, Fdft1</i>
Respuesta celular a virus (GO:0098586)	11	1.38 x10 ⁻⁴	0.00095	<i>Cxcl10, Hsp90aa1, Ddx3x, Tomm70a, Fmr1, Zc3h12a, Gbf1, Rrp1b, Pou2f2, Ikbke, Nfkb1p</i>
Respuesta celular al estrés oxidativo (GO:0034599)	11	1.06 x10 ⁻³	0.04040	<i>Nr4a2, Chchd4, Pnpt1, Zc3h12a, G6pdx, Gsr, Slc11a2, Atp2a2, Pycr2, Sod2, Eif2s1</i>
Respuesta celular a IL-17 (GO:0097398)	5	1.02 x10 ⁻³	0.03925	<i>Cxcl10, Il1b, Srsf1, Nfkbiz, Nfkb1</i>
Proceso biosintético de aminoácidos (GO:0008652)	4	5.20 x10 ⁻²	0.58259	<i>Mthfd1, Pycr2, Bcat1, Enoph1</i>

RESULTADOS

Tabla 9. Procesos biológicos de genes regulados negativamente en macrófagos que expresan la variante p.D303N de NLRP3.

Proceso biológico GO	Nº de genes	p-valor	Benjamini-Hochberg	Genes
Proceso metabólico de lípidos (GO:0006629)	42	3.11 x10 ⁻⁵	0.01187	<i>Dgkg, Faah, B4galt1, Cerk, Insig2, Mgst3, Hexb, Hexa, Inpp1, Lpl, Ptpn22, Hacd4, Ptgs1, Pld2, Sult1a1, Hmgcl, Gm2a, Psap, Cyp4v3, Scd2, Pgap6, Inpp5k, Hacl1, Pltp, Hsd3b7, Cpt1a, Gpx1, Sphk2, Sphk1, Nr1h2, Ephx1, Peds1, Plcb3, Soat1, Naaa, Acot2, Rubcnl, Echdc3, Acox3, Pafah1b3, Pam, Slc27a4</i>
Regulación positiva de la transcripción (GO:0045893)	41	8.74 x10 ⁻⁵	0.02033	<i>Kdm3a, Calcoco1, Shc1, Cited2, Wbp2, Src, Pbxip1, Rora, Foxo3, Hif1a, Npas2, Phf8, Lbh, Tnni2, Inpp5k, Apbb1, Nos1, Mta3, Trp53inp1, Arhgef11, Arnt2, Egr2, Jun, Niban2, Map3k1, Fzd7, Nr1h2, Tfeb, Dyrk1b, Mitf, Klf4, Usf2, Runx3, Trerf1, Klf2, Mafb, Asp, Id2, Irf8, Mapre3, Map3k12</i>
Regulación positiva de la migración celular (GO:0030335)	25	9.05 x10 ⁻⁷	0.00062	<i>Grn, Flt1, Cxcr4, Lamc2, Vsir, Gnai2, Pld2, Ppp3ca, Plau, Ccl3, Itgax, S1pr1, C3ar1, Ccr1, Sema4a, Sphk1, Cav1, Sema4g, Vegfa, Cpeb1, Myadm, Numb, Spry2, Myo1f, Bcar1</i>
Proliferación celular (GO:0008283)	25	9.47 x10 ⁻⁵	0.02033	<i>Rb1, Rarg, B4galt1, Cited2, Src, Adm, Rasgrp4, Gnai2, Ndst1, S1pr1, Mta3, Tns3, Appl2, Pdk1, Jun, Gpx1, Sphk2, Sphk1, Cav1, Vegfa, Asp, Kitl, Tgfb, Ypel5, Nodal</i>
Respuesta a hipoxia (GO:0001666)	23	1.38 x10 ⁻⁷	0.00016	<i>Egln1, Arnt2, Camk2d, Cdkn1b, Flt1, Cited2, Cav1, Bnip3, Cxcr4, Adm, Plod1, Hif1a, Vegfa, Pld2, Cd24a, Plau, Ddit4, Acot2,</i>

RESULTADOS

Regulación positiva de la cascada ERK1, ERK2 (GO:0070374)	20	7.52 x10 ⁻⁵	0.02033	<i>Capn2, Lonp1, Hmox1, Nos1, Pam, Ccr1, App, Camk2d, Jun, Shc1, Src, Cxcr4, Trem2, Arrb1, Ptpn22, Mturn, Vegfa, Gnai2, Prxl2c, Nptn, Ccl3, Spry2, Nodal, Map3k12, Mapk3</i>
Respuesta celular a hipoxia (GO:0071456)	18	1.20 x10 ⁻⁷	0.00016	<i>Egln1, Bnip3l, Src, Bnip3, Trem2, Rora, Ak4, Foxo3, Ndr1, Hif1a, Rtn4, Vegfa, Cpeb1, Pink1, Rgcc, Eif4ebp1, Hmox1, Mgarpl, Epm2a, B4galt1, Gbe1, Hexb, Hexa, Pygl, Hexdc, Hk1, Gpi1, Hk3, Ppp1r3c, Hyal1, Ppp1r3b, Gapdh, Pdk2, Pgm1, Pdk1</i>
Proceso metabólico de carbohidratos (GO:0005975)	17	4.94 x10 ⁻⁴	0.07210	<i>Ecm1, Grn, Flt1, Sphk1, Emp2, Adm, Hif1a, Rtn4, Add1, Vegfa, Rhob, Lgals3, Hyal1, C3ar1, Itgax, Hmox1, Nodal</i>
Regulación positiva de la angiogénesis (GO:0045766)	17	1.77 x10 ⁻⁵	0.01012	<i>Tmod1, Gsn, Sh3kbp1, Inpp1, Emp2, Arhgap25, Arhgap6, Rnd3, Mtss1, Coro1b, Rhob, Myo1e, Whamm, Rhoq, Myo1f, Bcar1</i>
Organización de los filamentos de actina (GO:0007015)	16	8.38 x10 ⁻⁵	0.02033	

4.3 La glicólisis está afectada por el inflamasoma NLRP3 mutante asociado a CAPS

Tras determinar que los genes de la glicólisis estaban regulados negativamente en macrófagos inmortalizados que expresaban la variante p.D303N de NLRP3, se pretendió estudiar si estas alteraciones en la expresión génica resultan en una función alterada de la glicólisis. Para ello, se utilizaron macrófagos que expresaban NLRP3 silvestre o con la variante p.D303N y se evaluó la tasa glicolítica tras medir la acidificación extracelular del medio debida a la liberación de protones. También se midió la tasa de consumo de oxígeno dependiente de la mitocondria. Los resultados mostraron una reducción de la glicólisis basal y compensatoria en los macrófagos que expresan la variante patogénica de NLRP3 p.D303N, comparados con macrófagos que expresan o no NLRP3 silvestre, independientemente de si estaban tratados o no con LPS (**Figura 38A, B**). No obstante, el LPS aumentó la glicólisis en los macrófagos que expresaban NLRP3 p.D303N (**Figura 38A, B**). Además, el tratamiento con MCC950 aumentó la actividad glicolítica de los macrófagos (**Figura 38A, B**), observándose también un incremento en la expresión de los genes relacionados con la glicólisis (**Figura 36B**), como se ha mencionado anteriormente. También se comprobó que la disminución de la glicólisis no se debía a la señalización de IL-1, ya que la tasa glicolítica no estaba afectada cuando se incubó con el IL-1Ra recombinante (**Figura 38C**). Por otro lado, los macrófagos que no expresaban NLRP3 o aquellos que expresaban la NLRP3 silvestre, no mostraron ningún cambio en la glicólisis tras el tratamiento con doxiciclina o con el inhibidor MCC950 (**Figura 38B**), sugiriendo que la reducción de la glicólisis era resultado de la actividad del inflamasoma NLRP3 con la variante p.D303N.

Para confirmar que la expresión de la variante de NLRP3 disminuía la tasa glicolítica, se midieron otros parámetros relacionados con la glicólisis. En línea con los resultados anteriores, NLRP3 p.D303N indujo una disminución notable en la producción de los productos finales de la glicólisis (lactato, piruvato) y del ATP glicolítico (**Figura 39A-C**). Además, como se esperaba, el tratamiento con MCC950 mitigó esta reducción (**Figura 39A-C**). A pesar de que la expresión de la variante de NLRP3 también disminuyó la producción de ATP mitocondrial (**Figura 39C**), no se observó una alteración de la respiración mitocondrial basal o máxima en los macrófagos sin LPS, mientras que en aquellos tratados con LPS disminuyó ligeramente (**Figura 39D, E**). De manera similar, los metabolitos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, como citrato, malato, fumarato, succinato y cetoglutarato, junto con sus genes asociados, permanecieron inalterados tras la expresión de la variante p.D303N NLRP3 (**Figura 40A, B**).

RESULTADOS

En resumen, estos datos confirman que la glicólisis está alterada mientras que la respiración mitocondrial y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos parecían no estar afectados por las variantes de NLRP3 asociadas a CAPS.

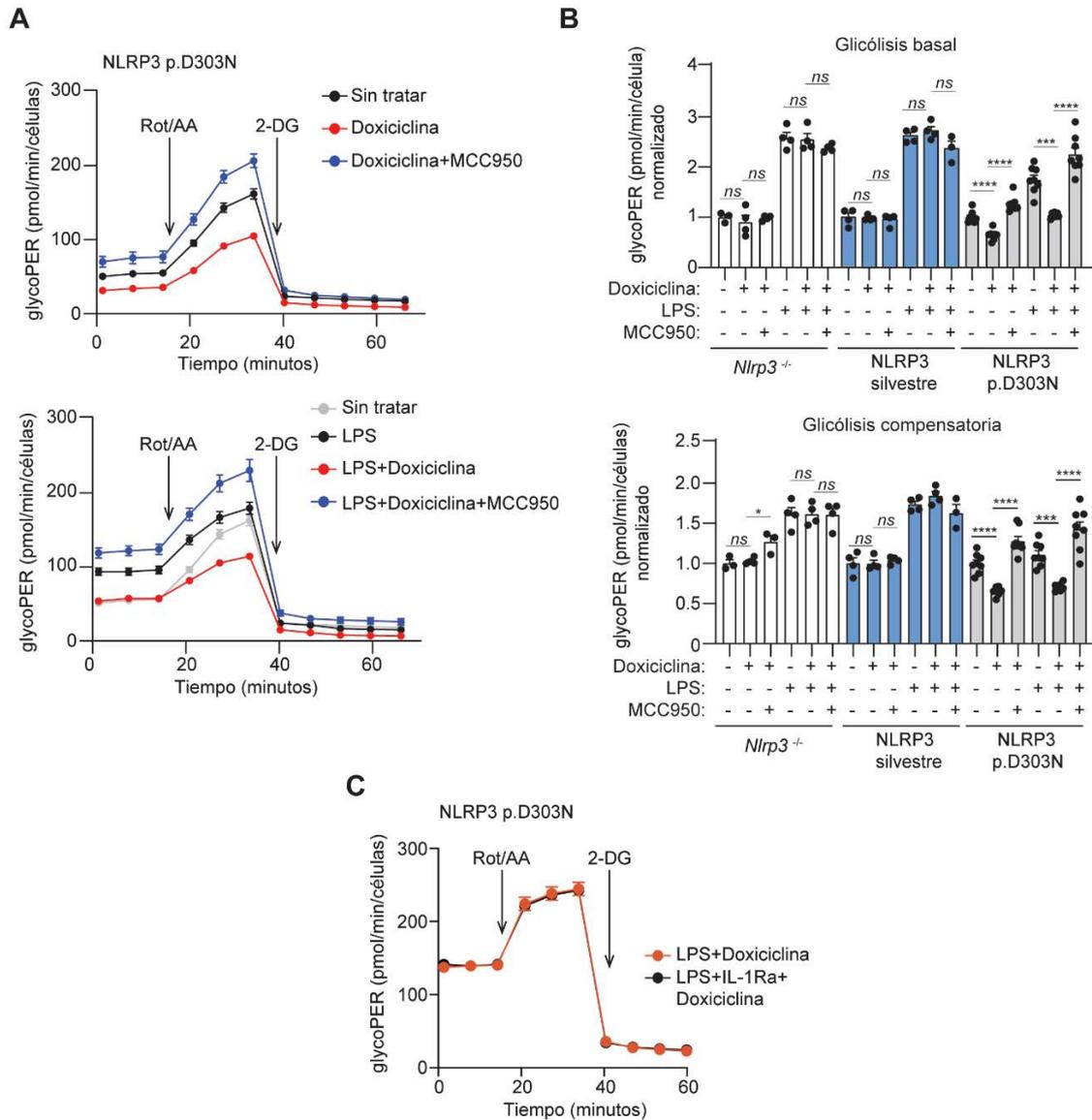


Figura 38. Disminución de la capacidad glicolítica en macrófagos que expresan la variante patogénica p.D303N de NLRP3. (A, B, C) Análisis *Seahorse* de la glicólisis en macrófagos inmortalizados *Nlrp3*^{-/-} (iMos) tratados durante 16 h con o sin doxiciclina (1 µg/ml) para inducir la expresión de NLRP3 silvestre humano o la variante p.D303N, en ausencia o presencia de MCC950 (10 µM), LPS (100 ng/ml) e IL-1RA (100 ng/ml). Los datos se derivan de *n*= 3-8 réplicas biológicas, que son representativas de *n*=2-4 experimentos independientes. Los datos se representan como media ± SEM. Para los análisis estadísticos se ha utilizado la prueba estadística ANOVA en el panel B. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: **p* < 0.05; *p* < 0.0021; ****p* < 0.0002; *****p* < 0.0001; *ns* indica que no hay diferencias significativas (*p* > 0.05); Rot: Rotenona; AA: Antimicina A; 2-DG: 2-desoxi-D-glucosa.**

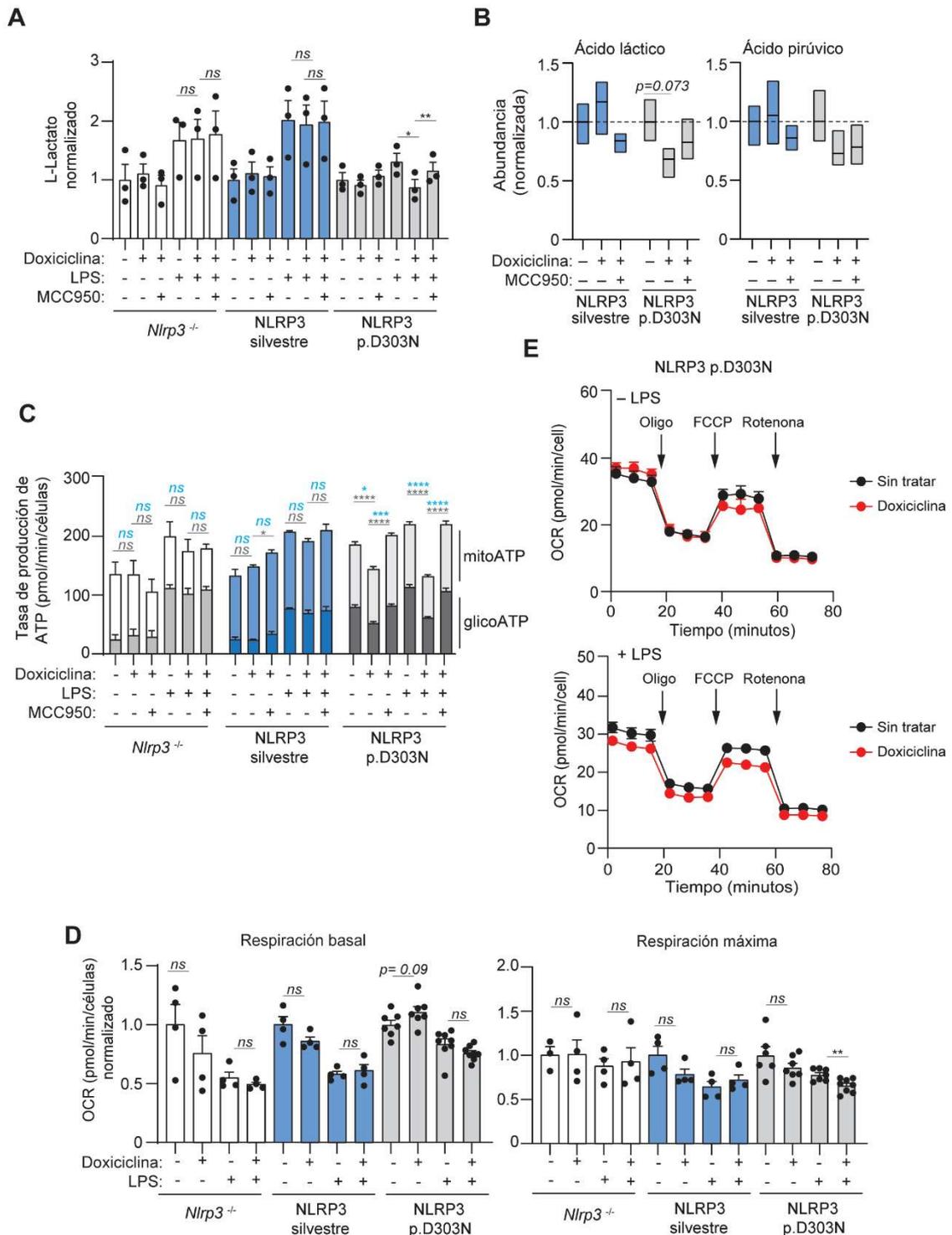


Figura 39. Los producción de lactato, piruvato y ATP glicolítico esta disminuida en macrófagos que expresan la variante patogénica p.D303N de NLRP3. (A) Medida de L-lactato en sobrenadantes de macrófagos inmortalizados *Nlrp3*^{-/-} (iMos) tratados durante 16 h con o sin doxiciclina (1 µg/ml) para inducir la expresión o no de NLRP3 silvestre humano o la variante p.D303N, en ausencia o presencia de MCC950 (10 µM) y LPS (100 ng/ml); los datos se derivan de *n*=3 experimentos independientes. (B) Abundancia normalizada de ácido láctico y ácido pirúvico en iMos *Nlrp3*^{-/-} que expresan NLRP3 silvestre o la variante p.D303N, tratados como en

RESULTADOS

el panel A; los gráficos representan datos de $n=3$ experimentos independientes, con la mediana indicada por la línea central; la línea de puntos representa la abundancia en las células control. **(C)** Análisis *Seahorse* de la tasa de producción de ATP glicolítico (glicoATP) y ATP mitocondrial (mitoATP) en iMos *Nlrp3*^{-/-} que expresan o no, NLRP3 silvestre o la variante p.D303N, tratados como en el panel A. Los datos se derivan de $n=3-8$ réplicas biológicas, que son representativas de $n=3$ experimentos independientes. **(D, E)** Análisis *Seahorse* de la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial que mide el perfil de respiración mitocondrial (E) y la respiración basal y máxima (D) en iMos tratados como en el panel A. Los datos se derivan de $n=3-8$ réplicas biológicas, que son representativas de $n=3$ experimentos independientes. Los gráficos se representan como media \pm SEM. Para los análisis estadísticos se ha utilizado la prueba estadística T en los paneles A, B, C, D. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: * $p < 0.05$; ** $p < 0.0021$; *** $p < 0.0002$; **** $p < 0.0001$; *ns* indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$). En el panel D, el azul representa la estadística para el ATP mitocondrial y el gris representa la estadísticas para el ATP glicolítico.

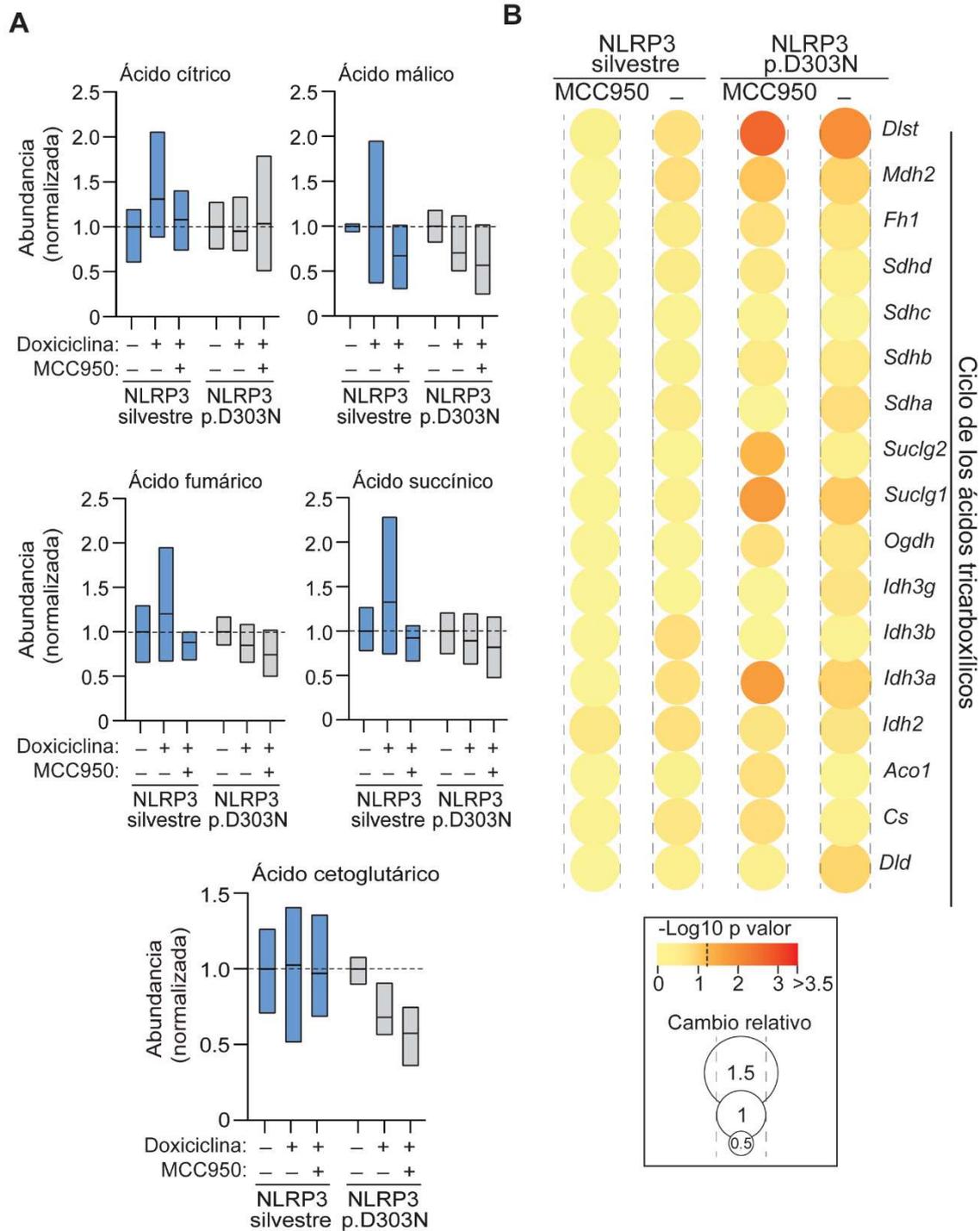


Figura 40. El ciclo de los ácidos tricarbóxicos no está afectado en macrófagos que expresan la variante patogénica p.D303N de NLRP3. (A) Abundancia normalizada de varios metabolitos del ciclo del ácido tricarbóxico en macrófagos inmortalizados *Nlrp3*^{-/-} (iMos) tratados durante 16 h con o sin doxiciclina (1 µg/ml) para inducir la expresión de NLRP3 silvestre humano o la variante p.D303N, en ausencia o presencia de MCC950 (10 µM), los gráficos representan datos de *n*=3 experimentos independientes, con la mediana indicada por la línea central; la línea de puntos representa la abundancia en las células control. **(B)** Expresión relativa de genes del ciclo del ácido tricarbóxico en iMos tratados como se ha descrito en el panel A. Los datos se

RESULTADOS

representan como círculos, donde el tamaño indica el cambio relativo de las células tratadas con doxiciclina frente a las células no tratadas, y de las tratadas con doxiciclina en presencia de MCC950 frente a doxiciclina, el color representa el $-\text{Log}_{10}$ del p valor (la línea de puntos en la escala de colores representa $p=0.05$). Los gráficos representan datos de $n=3-4$ experimentos independientes.

4.4 La disminución de la glicólisis por la activación constitutiva del inflammasoma NLRP3 mutante limita la producción de IL-1 β

En diferentes estudios se ha descrito la dependencia de la producción de IL-1 β de la glicólisis para un desarrollo óptimo de la inflamación (Palsson-McDermott et al., 2015). Por este motivo, y habiendo confirmado que la expresión de variantes de NLRP3 afectaban a la glicólisis, el siguiente objetivo fue determinar qué consecuencias funcionales producía esta disminución. Para ello, se utilizaron macrófagos inmortalizados que expresaban NLRP3 silvestre o la variante p.D303N complementado con piruvato, el producto final de la glicólisis. Esto resultó en un aumento de la liberación de IL-1 β , pero no de IL-18 en macrófagos que expresaban la variante p.D303N NLRP3 (**Figura 41A**). Además, como se esperaba, este efecto no se observó en los macrófagos que expresaban NLRP3 silvestre. También cabe destacar que cuando se expresó la variante p.D303N, se observó un incremento sutil de la expresión del gen *Il1b*, un efecto que no ocurría con NLRP3 silvestre (**Figura 41B**). Por el contrario, cuando se bloqueó la glicólisis tras la inhibición de la actividad de la enzima hexoquinasa con 2-desoxi-D-glucosa (2DG) (**Figura 41D**), se encontró una disminución en la liberación de IL-1 β , pero no de IL-18 en aquellos macrófagos que expresaban la variante p.D303N de NLRP3 tratados con LPS (**Figura 41C**). Como se esperaba, 2DG también bloqueó la liberación de IL-1 β tras la activación canónica del NLRP3 silvestre (**Figura 41E**).

En resumen, estos hallazgos muestran que el inflammasoma NLRP3 con variantes patogénicas asociadas a CAPS produce cambios en el inmunometabolismo que afectan a la glicólisis, la cual a su vez disminuye la producción basal de IL-1 β , limitando así los brotes inflamatorios.

RESULTADOS

el panel C; los datos representan $n=3-4$ réplicas biológicas y son representativos de $n=2$ experimentos independientes. (E) ELISA de IL-1 β en sobrenadantes de iMos que expresan o no NLRP3 silvestre, tratados durante 4 h con doxiciclina (1 $\mu\text{g/ml}$), MCC950 (10 μM), LPS (100 ng/ml) o 2-DG (0.1, 0.5 y 1 mM), y luego se trataron durante 30 min con nigericina (10 μM); el gráfico representa datos de $n=3$ experimentos independientes. Los datos se representan como media \pm SEM; se utilizó la prueba estadística T en los paneles A-C y la prueba ANOVA en los paneles D-E. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: * $p < 0.05$; ** $p < 0.0021$; *** $p < 0.0002$; **** $p < 0.0001$; *ns* indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

5. El 4-octilitaconato bloquea la activación constitutiva del inflammasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS

El compuesto 4-octilitaconato (4-OI) es un derivado del itaconato, este es un metabolito que recientemente se ha descrito como un modulador antiinflamatorio, de hecho, se le ha relacionado en numerosos procesos, siendo uno de ellos la inhibición de NLRP3. Por tanto, el siguiente objetivo era determinar la acción del 4-OI sobre la activación constitutiva del inflammasoma NLRP3 en variantes asociadas a CAPS, para ello se utilizaron macrófagos inmortalizados que expresaban NLRP3 silvestre y las variantes patogénicas de NLRP3 p.R260W, p.D303N y p.T348M asociadas a CAPS. Los resultados mostraron que concentraciones crecientes de 4-OI bloqueaban la liberación de IL-18 dependiente del inflammasoma constitutivamente activo de NLRP3 con la variante p.R260W en macrófagos (**Figuras 42A**). Como control, se utilizó el inhibidor específico de NLRP3, MCC950, que como se esperaba también bloqueó esta liberación (**Figura 42A**). Los macrófagos que expresaban las variantes p.D303N y p.T348M de NLRP3 también redujeron la liberación de IL-18 constitutiva en presencia de 4-OI (**Figura 42B**). Se obtuvieron resultados similares en los macrófagos tratados con LPS, donde 4-OI también disminuyó la liberación de IL-18 (**Figura 42A, B**). Como se ha descrito en resultados anteriores, la expresión de NLRP3 silvestre no produce una activación constitutiva del inflammasoma, por tanto, como control de una correcta expresión de este genotipo, los macrófagos se estimularon con LPS y nigericina, simulando una activación canónica del inflammasoma NLRP3, observándose la consecuente liberación de IL-18 la cual fue inhibida por 4-OI (**Figura 42C**). Es de destacar que la inhibición de 4-OI se produjo de manera dependiente del tiempo en macrófagos que expresaron la variante p.D303N (**Figura 42D**).

Habiendo comprobado que 4-OI inhibía la liberación basal de IL-18 dependiente del inflammasoma mutante, se estudió más en detalle la acción de este compuesto sobre los macrófagos que expresan la variante p.D303N de NLRP3 asociadas a CAPS. De manera que el tratamiento con 4-OI mostró una reducción de la activación caspasa-1, el procesamiento de GSDMD, la liberación de IL-1 β y la piroptosis (**Figura 43A, B**), tanto en la activación constitutiva del inflammasoma como la inducida por LPS, de forma similar al efecto de MCC950. El bloqueo del procesamiento de GSDMD y la piroptosis mediante 4-OI y MCC950 resultó en un aumento de la expresión de NLRP3 con variantes asociadas a CAPS (**Figura 43A, B**). Estos datos sugieren que 4-OI puede inhibir la activación constitutiva del inflammasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS.

RESULTADOS

Para determinar el efecto del 4-OI sobre la formación del inflamasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS, se usaron células HEK293T transfectadas con NLRP3-YFP silvestre o con la variante p.D303N de manera estable. El NLRP3 mutante resultó en un incremento de células con un punteado de NLRP3 en condiciones basales, en comparación con NLRP3 silvestre. Este porcentaje de células que contenían un punteado de NLRP3 se redujo tras los tratamientos con 4-OI y MCC950 (**Figura 44A, B**). Mediante la técnica transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET), se estudió el efecto de 4-OI en la conformación molecular de NLRP3. La variante p.D303N de NLRP3 tiene una conformación más “abierta” que el NLRP3 silvestre ya que presenta una menor señal BRET, el tratamiento con MCC950 incrementa la señal BRET de la variante de NLRP3, produciendo una conformación más cerrada (Tapia-Abellán et al., 2019). El tratamiento con 4-OI no produjo ningún cambio en la señal BRET, lo que sugiere que 4-OI no afecta a la conformación de NLRP3 silvestre o con la variante p.D303N (**Figura 44C**).

Una vez confirmado que 4-OI no afectaba a la conformación del inflamasoma NLRP3, se evaluó si 4-OI podía afectar la formación de oligómeros de ASC. Para ello, se utilizaron células HEK293T co-transfectadas transitoriamente con ASC-RFP y NLRP3 silvestre o la variante p.D303N, y se observó que las células que expresaban la variante de NLRP3 tenían un mayor porcentaje de células con oligómeros de ASC en comparación con el NLRP3 silvestre. El porcentaje de células con oligómeros de ASC disminuyó tras el tratamiento con 4-OI, sugiriendo que 4-OI afecta a la formación de oligómeros de ASC (**Figura 44D**).

En resumen, estos datos muestran que el 4-OI bloquea la activación constitutiva del inflamasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS inhibiendo la oligomerización de ASC, bloqueando así la activación de caspasa-1, el procesamiento de GSDMD, la liberación de IL-18 y la piroptosis.

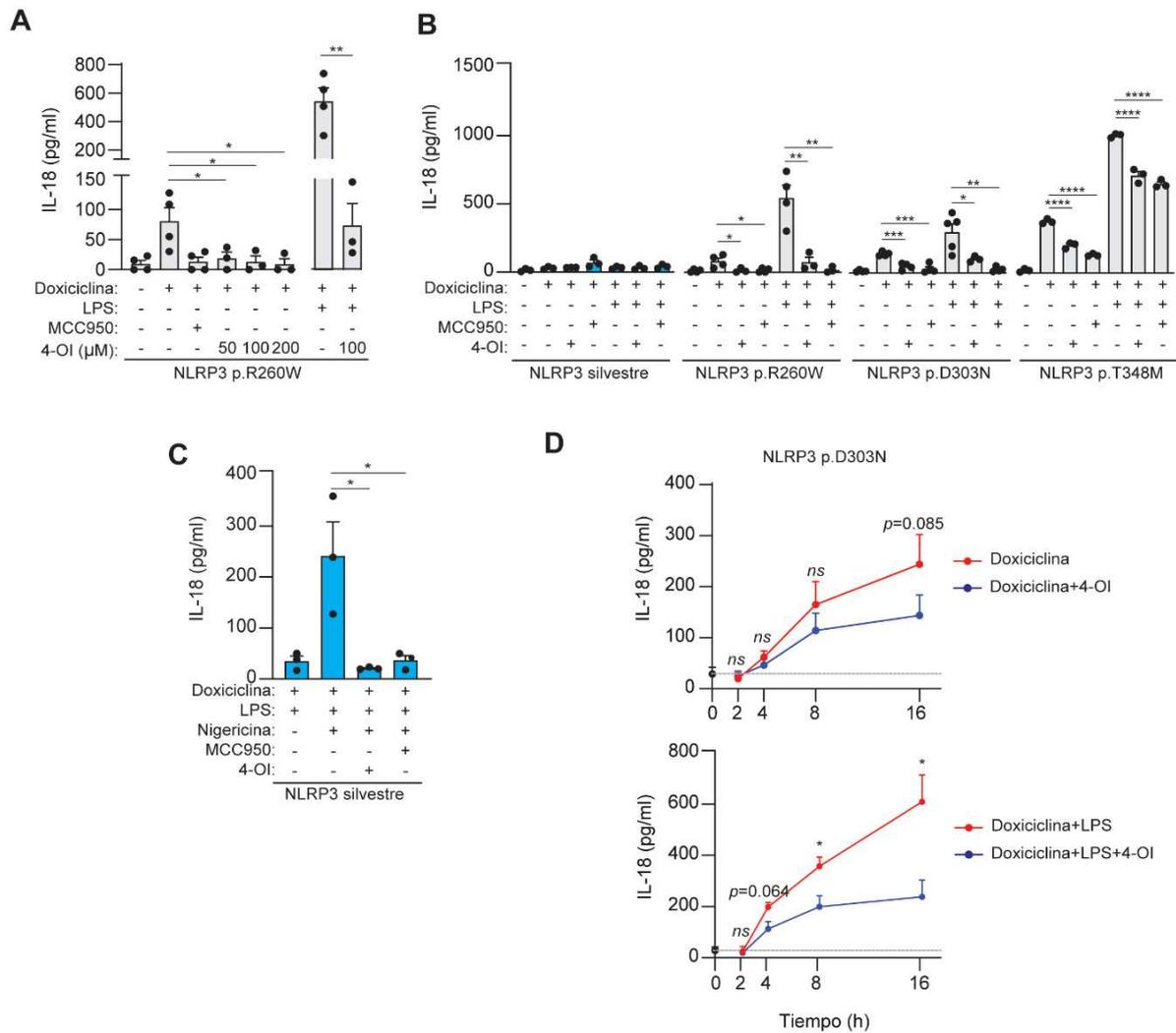


Figura 42. 4-OI inhibe la liberación de IL-18 en macrófagos que expresan variantes de NLRP3 asociadas a CAPS. (A) ELISA de IL-18 en sobrenadantes de macrófagos inmortalizados *Nlrp3*^{-/-} (iMos) que expresan la variante p.R260W de NLRP3 humana inducida tras el tratamiento con doxiciclina (1 µg/ml) durante 16 horas, en ausencia o presencia de MCC950 (10 µM), 4-OI (50, 100 y 200 µM) o LPS (100 ng/ml) **(B)** ELISA de IL-18 en sobrenadantes de iMos que expresan NLRP3 humano silvestre o las variantes p.D303N, p.R260W y p.T348M tratadas como se indica en el panel A, con 4-OI (100 µM). **(C)** ELISA de IL-18 en sobrenadantes de iMos que expresan NLRP3 humano silvestre tratados como se indica en el panel B, y luego se estimularon con nigericina (10 µM) durante 30 min. **(D)** ELISA de IL-18 en sobrenadantes de iMos que expresan la variante p.D303N de NLRP3 humana, tratados como se indica en el panel B, a diferentes tiempos (0, 2, 4, 8 y 16 h). Los gráficos son representativos de n=3-5 experimentos independientes y los datos se representan como media ± SEM; se ha utilizado la prueba estadística ANOVA en los paneles A-C y la prueba T en el panel D. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: *p < 0.05; **p < 0.0021; ***p < 0.0002; ****p < 0.0001; ns, indica que no hay diferencias significativas (p > 0.05).

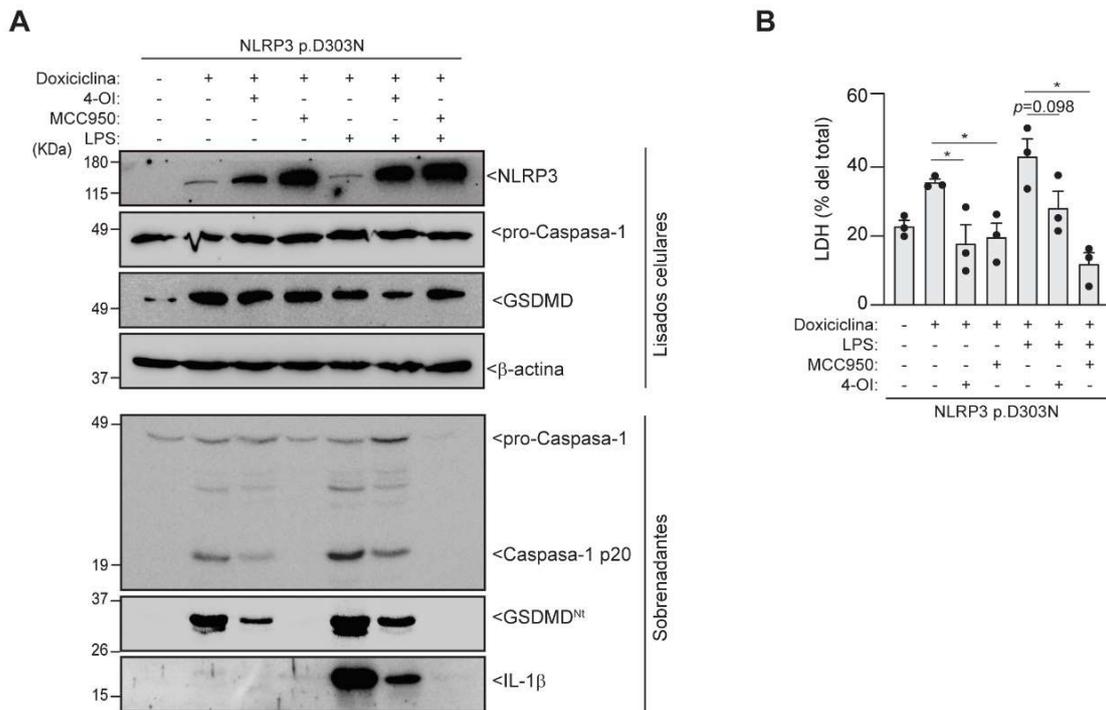


Figura 43. 4-OI reduce la activación de caspasa-1, el procesamiento de GSDMD y la piroptosis inducida por NLRP3 p.D303N. (A) Western blot de NLRP3, caspasa-1, GSDMD e IL-1 β en lisados celulares y sobrenadantes de macrófagos inmortalizados *Nlrp3*^{-/-} (iMos) que expresan la variante p.D303N de NLRP3 humana inducida tras el tratamiento con doxiciclina (1 μ g/ml) durante 16 horas, en ausencia o presencia de MCC950 (10 μ M), 4-OI (100 μ M) o LPS (100 ng/ml). (B) Porcentaje de LDH extracelular en iMos tratados como se indica en el panel A. Los Western blots son representativos de $n=2$ experimentos. Los gráficos son representativos de $n=3-5$ experimentos independientes y los datos se representan como media \pm SEM; se ha utilizado la prueba estadística ANOVA en el panel B. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: * $p < 0.05$; *ns*, indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

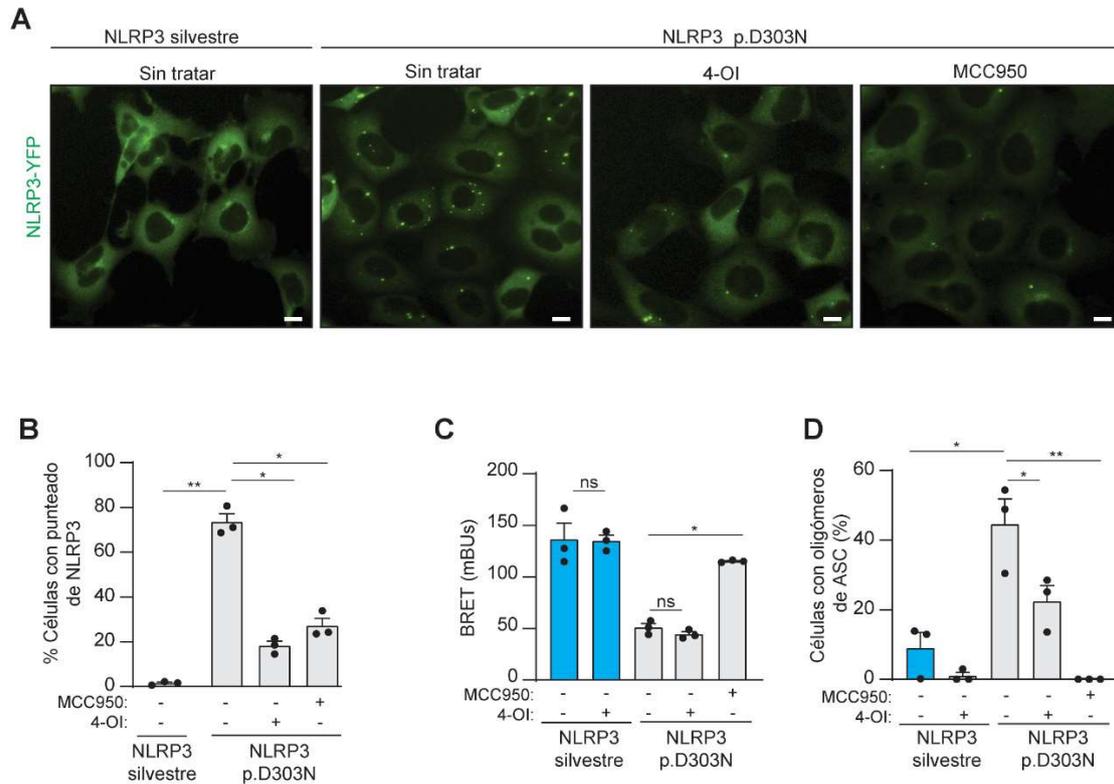


Figura 44. 4-OI inhibe la formación de oligómeros de ASC dependiente de la expresión de la variante p.D303N de NLRP3. (A) Imágenes de fluorescencia representativas de células HEK293T que expresan de manera estable YFP-NLRP3 silvestre o la variante p.D303N, tratadas durante 24 horas en presencia o ausencia de MCC950 (10 μ M) o 4-OI (100 μ M); NLRP3 se muestra en verde; las imágenes son representativas de $n=3$ experimentos independientes. (B) Porcentaje de células HEK293T con una distribución puntuada de NLRP3 tratadas como se indica en el panel A. (C) Señal de BRET en células HEK293T que expresan YFP-NLRP3-Luc silvestre o la variante p.D303N, tratadas con MCC950 (10 μ M) o 4-OI (100 μ M) durante 16 h. (D) Porcentaje de células HEK293T con oligómeros de ASC co-transfectadas con ASC-RFP y NLRP3-YFP silvestre o la variante p.D303N tratadas con MCC950 (10 μ M) o 4-OI (100 μ M) durante 16 h. Los gráficos son representativos de $n=3$ experimentos independientes y los datos se representan como media \pm SEM; se ha utilizado la prueba estadística ANOVA en los paneles B-C y la prueba T en el panel D. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: * $p < 0.05$; ** $p < 0.0021$; *ns*, indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

6. Moléculas análogas a MCC950 como potenciales inhibidores de NLRP3, y nuevos tratamientos del síndrome CAPS

Como se ha mencionado anteriormente, el inflamasoma NLRP3 está involucrado en el desarrollo de numerosas patologías, siendo una de ellas el síndrome CAPS. El inhibidor MCC950 se ha descrito como una de las principales moléculas capaces de inhibir NLRP3 debido a su efectividad y especificidad (Coll et al., 2015), sin embargo, estudios clínicos con MCC950 no han sido muy prometedores. Por este motivo, el último objetivo de esta Tesis se centró en la búsqueda de nuevos posibles inhibidores de NLRP3. Para ello, en colaboración con el grupo de investigación en Bioinformática Estructural y Computación de Alto Rendimiento de la Universidad Católica San Antonio de Murcia, se eligieron 26 moléculas análogas de MCC950 y que, a través de modelos computacionales, se pudo identificar que estas tenían un alto potencial de interactuar con NLRP3 en la región con actividad ATPasa.

Para realizar los ensayos funcionales con estas moléculas, se utilizaron macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) de ratones silvestres con la intención de hacer un cribado de esas moléculas y seleccionar aquellas que tuvieran un mayor efecto inhibitorio. Con este fin, los macrófagos se trataron con LPS+nigericina para estimular la ruta de activación canónica del inflamasoma NLRP3, en presencia o ausencia de las distintas moléculas durante el tratamiento con nigericina. De los 26 compuestos testados, se encontró una reducción significativa de la liberación de IL-1 β en aquellos macrófagos que estaban tratados con el compuesto E1 y con el E3 (**Figura 45A**). Además, E1 también redujo la piroptosis, pero no lo hizo el E3 (**Figura 45B**). Tras este cribado se seleccionaron las moléculas E1 y E3 como posibles candidatos inhibidores de NLRP3, y se profundizó más en su actividad. En concreto, se evaluó su eficacia midiendo la concentración necesaria para inhibir la actividad biológica en un 50% (IC₅₀), para ello, los macrófagos fueron expuestos a diversas concentraciones de estos inhibidores, resultando en un efecto ligeramente superior por parte de E1 (IC₅₀=16.73 μ M) en comparación con E3 (IC₅₀ =19.91 μ M) (**Figura 46**), en ambos casos por encima de la IC₅₀ del MCC950 (IC₅₀=1.64 μ M) (**Figura 46**).

Una vez confirmado que E1 y E3 podían inhibir la liberación de IL-1 β en macrófagos tratados con LPS+nigericina, se determinó si estas moléculas bloqueaban también a otros elementos del inflamasoma, observándose así una reducción de la activación de caspasa-1 y del procesamiento de GSDMD, siendo este efecto mayor en E1 (**Figura 47A**). Para validar estas moléculas, también se trataron estos macrófagos con otros activadores canónicos de NLRP3 como son el ATP y el sílice (SiO₂), y de

manera similar, se observó una reducción de la liberación de IL-1 β , en presencia de E1 y E3 (**Figura 47B**). Además, se usaron muestras humanas de individuos sanos, en las cuales se midió el porcentaje de oligómeros de ASC e IL-1 β . De tal forma que, las muestras tratadas con E1 mostraron una reducción del número de oligómeros de ASC y de la liberación de IL-1 β , en presencia de ambos activadores canónicos del inflamasoma, ATP o nigericina (**Figura 47C**). Sin embargo, E3 solo mostró una reducción del número de oligómeros y una ligera reducción de IL-1 β en presencia de nigericina, pero no de ATP, discrepando así con los resultados obtenidos en macrófagos de ratón (**Figura 47B**). También se pretendió validar el efecto de estos inhibidores en macrófagos inmortalizados que expresaban la variante p.D303N de NLRP3 asociada a CAPS tratados con LPS, esto resultó en una reducción de la liberación de IL-1 β en presencia de E1 y E3 (**Figura 47D**). En resumen, los datos indican que, principalmente E1, pero también E3, pueden ser prometedores inhibidores de NLRP3.

Para terminar de caracterizar que la inhibición que producía E1 y E3 era específica de NLRP3, se evaluó la acción de estos compuestos sobre la vía de señalización de NF- κ B, evaluando también la consecuente transcripción de NLRP3 e IL-1 β . Por tanto, en estos ensayos las células se trataron con LPS para simular la señal de cebado de NLRP3, midiéndose así la liberación de TNF- α en células BMDM y macrófagos inmortalizados que expresaban la variante p.D303N de NLRP3. Esto resultó en una reducción de la liberación de TNF- α en presencia de E1, pero no E3 (**Figura 48 A, B**). Además, en macrófagos Raw 264.7 que expresaban un gen reportero para la activación de NF- κ B, también se observó una mayor reducción de la activación de esta vía en presencia de E1 (**Figura 48C**). Finalmente se confirmó que la expresión de NLRP3 e IL-1 β estaba disminuida en aquellos macrófagos que estaban tratados con E1, mientras que E3 afectaba en menor medida a la expresión de estas proteínas (**Figura 48D**).

Todos estos datos sugerían que los análogos de MCC950, E1 y E3 pueden inhibir específicamente NLRP3 en la señal de activación, teniendo E1 un mayor efecto. Sin embargo, también afecta a la señal de cebado de NLRP3, bloqueando la vía de NF- κ B, principalmente E1. En resumen, E1 y E3 no son específicos de la activación de NLRP3, pero podrían tener un espectro antiinflamatorio mayor al inhibir la activación de NLRP3 y la señalización de NF- κ B.

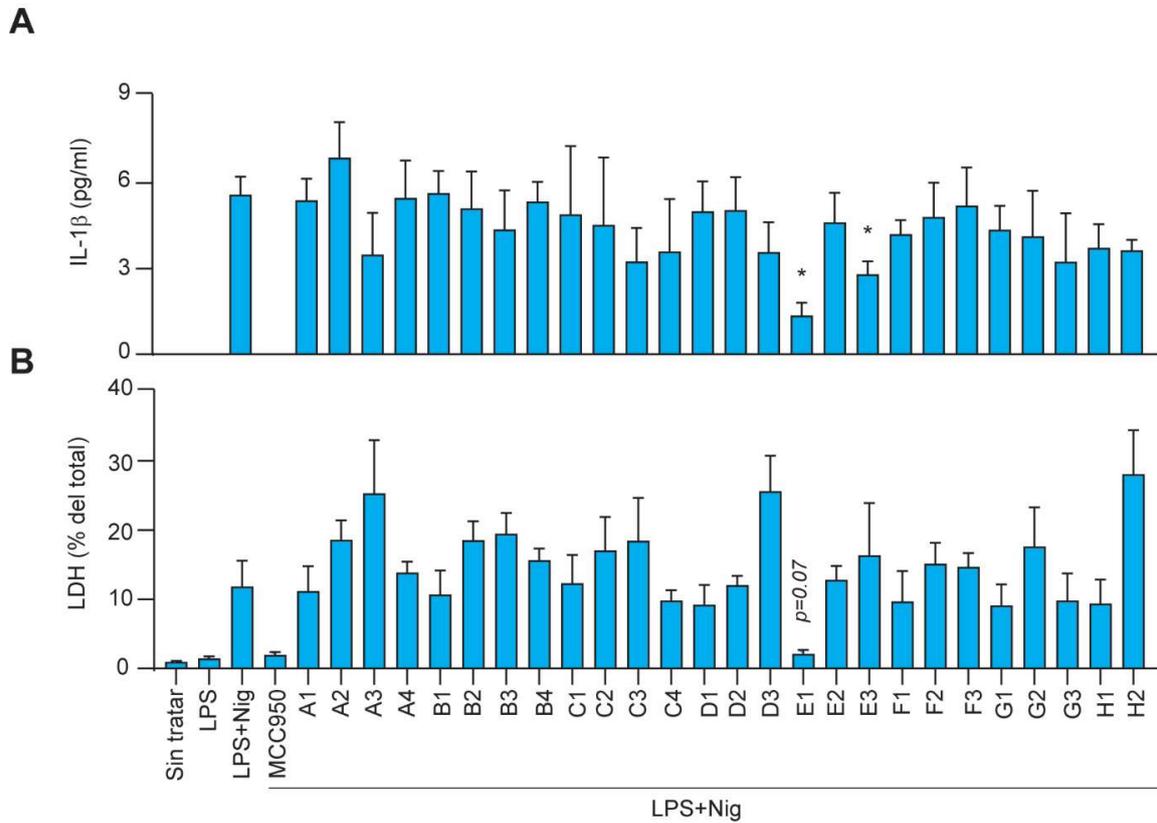


Figura 45. Los análogos de MCC950 (E1 y E3) inhiben la liberación de IL-1 β dependiente de NLRP3. (A, B) ELISA de IL-1 β (A) y porcentaje de LDH (B) de BMDM silvestres de ratón tratadas durante 4h con LPS (1 μ g/ml) y luego 30 min con nigericina (5 μ M) en presencia o ausencia de MCC950 (10 μ M) o las distintas moléculas testadas (10 μ M). Los gráficos son representativos de $n=3$ experimentos independientes y los datos se representan como media \pm SEM; se ha utilizado la prueba estadística T en los paneles A, B, comparando cada compuesto con el tratamiento LPS+Nig. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: * $p < 0.05$; ns, indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

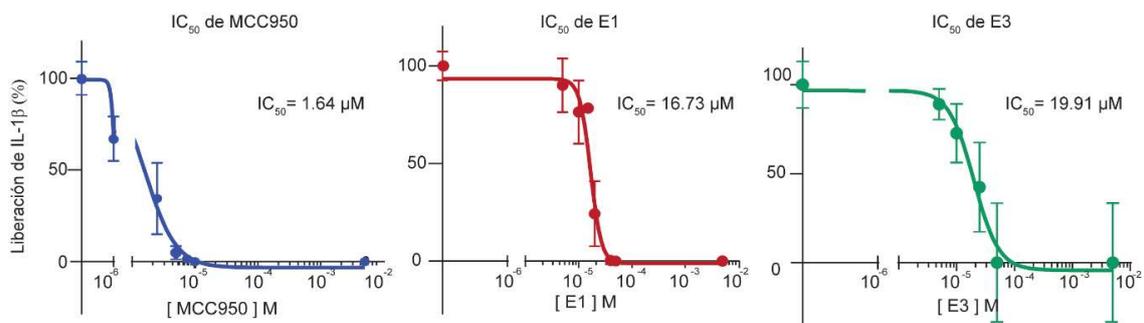


Figura 46. Curvas IC₅₀ de E1 y E3. Análisis del % de liberación de IL-1β en BMDM silvestres de ratón tratadas durante 4h con LPS (1 μg/ml) y luego 30 min con nigericina (5 μM) en presencia o ausencia de MCC950 (10, 25, 50 y 100 μM), E1 (5, 10, 15, 20, 40 y 50 μM) y E3 (5, 10, 25 y 50 μM). Los gráficos son representativos de *n*=3 experimentos independientes y los datos se representan como media ± SEM. La IC₅₀ fue calculada mediante regresión logística de 4 parámetros.

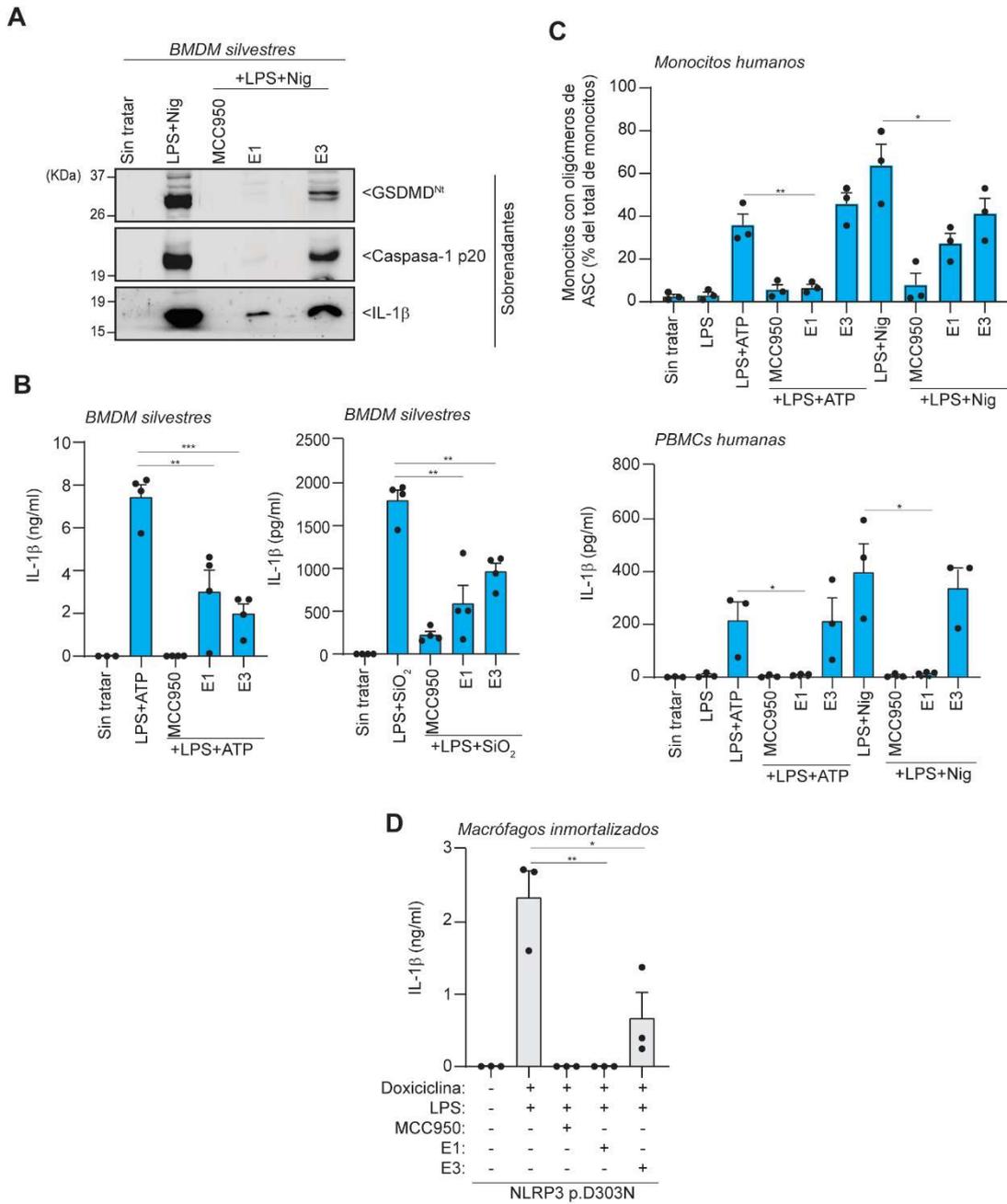


Figura 47. E1 y E3 inhiben el inflammasoma NLRP3 silvestre y NLRP3 con variantes asociadas a CAPS. (A) Western blot de GSDMD, caspasa-1 e IL-1 β en sobrenadantes de células BMDM silvestres de ratón tratadas durante 4h con LPS (1 μ g/ml) y luego 30 min con nigericina (5 μ M) en presencia o ausencia de MCC950 (10 μ M), E1 (30 μ M) o E3 (30 μ M). **(B)** ELISA de IL-1 β en BMDM de ratón tratados durante 4h con LPS (1 μ g/ml) y luego 30 min con ATP (3 mM) o durante 5h con SiO₂ (50 μ g/ml) en ausencia o presencia de MCC950 (10 μ M) E1 (30 μ M) o E3 (30 μ M). **(C)** Porcentaje de monocitos con oligómeros de ASC y ELISA de IL-1 β en sobrenadantes de PBMCs de individuos sanos (cada punto es un donante) tratados durante 3h con LPS (1.6 μ g/ml) y luego estimulados durante 30 min con nigericina (10 μ M) o ATP (3 mM) en presencia o

RESULTADOS

ausencia de MCC950 (10 μ M), E1 (30 μ M) o E3 (30 μ M). **(D)** ELISA de IL-1 β en sobrenadantes de macrófagos inmortalizados de ratón *Nlrp3*^{-/-} que expresan la variante p.D303N de NLRP3 humana tras la inducción con doxiciclina (1 μ g/ml) durante 4h en presencia o ausencia de LPS (100 ng/ml), MCC950 (10 μ M), E1 (30 μ M) o E3 (30 μ M). Los Western blot son representativos de $n=2$ experimentos independientes; los gráficos son representativos de $n=3-4$ experimentos independientes y los datos se representan como media \pm SEM; se ha utilizado la prueba estadística T en los paneles B-D. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: * $p < 0.05$; ** $p < 0.0021$; *** $p < 0.0002$; *ns*, indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

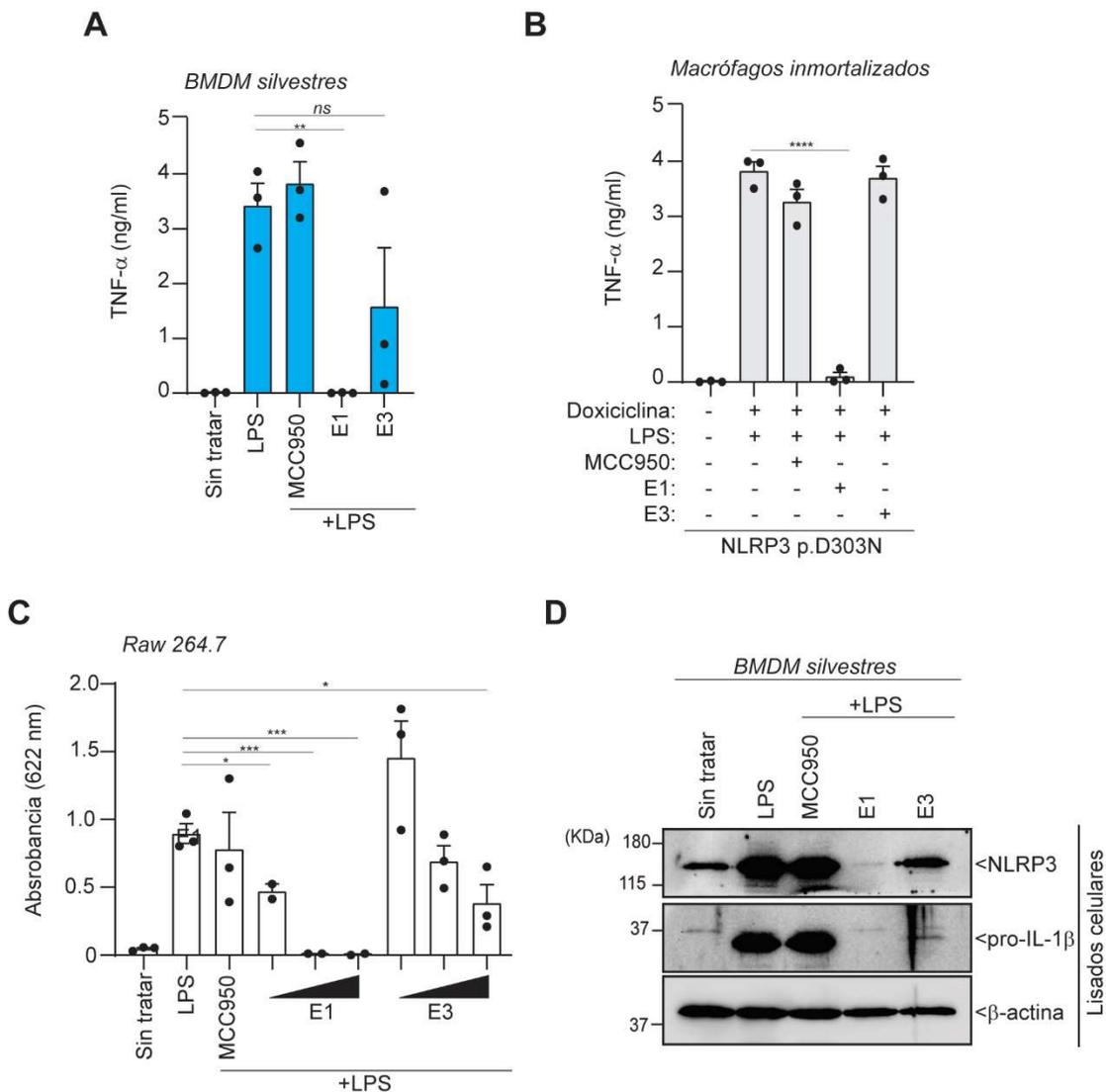


Figura 48. El análogo de MCC950, E1, inhibe la señal de cebado de NLRP3. (A) ELISA de TNF-α en BMDM de ratón tratados durante 4h con LPS (1 μg/ml) en ausencia o presencia de MCC950 (10 μM), E1 (30 μM) o E3 (30 μM). (B) ELISA de TNF-α en sobrenadantes de macrófagos immortalizados de ratón *Nlrp3*^{-/-} que expresan la variante p.D303N de NLRP3 humana tras la inducción con doxiciclina (1 μg/ml) durante 4h en presencia o ausencia de LPS (100 ng/ml), MCC950 (10 μM), E1 (30 μM) o E3 (30 μM). (C) Ensayo de activación de NF-κB en macrófagos Raw 264.7 que expresan el gen reportero de la fosfatasa alcalina secretada (SEAP) tratados con LPS (100 ng/ml), MCC950 (10 μM), E1 (10, 20 y 30 μM) y E3 (10, 20 y 30 μM) durante 4h. (D) Western blot de NLRP3, IL-1β y β-actina de lisados celulares de BMDM tratadas como en el panel A. Los Western blot son representativos de *n*=2 experimentos independientes; los gráficos son representativos de *n*=3 experimentos independientes y los datos se representan como media ± SEM; se ha utilizado la prueba estadística T en los paneles A-C. El grado de significancia se indica de la siguiente manera: **p* < 0.05; ***p* < 0.0021; ****p* < 0.0002; *****p* < 0.0001 *ns*, indica que no hay diferencias significativas (*p* > 0.05).

DISCUSIÓN

1. Activación del inflammasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS

NLRP3 es un sensor intracelular que en respuesta a numerosos estímulos es capaz de formar, junto a ASC y caspasa-1, un complejo llamado inflammasoma, promoviendo así la liberación de las citoquinas IL-1 β e IL-18 y fomentando la respuesta inflamatoria. Sin embargo, la desregulación o activación del inflammasoma NLRP3 está relacionada con el desarrollo de numerosas patologías, siendo una de ellas el síndrome periódico asociado a criopirina (CAPS). Este síndrome es una enfermedad autoinflamatoria de herencia dominante que surge por variantes de ganancia de función en el gen *NLRP3*, las cuales pueden causar un espectro continuo de enfermedades en los pacientes (FCAS, MWS y NOMID/CINCA). La patología de los CAPS está mediada por una sobreproducción de la citoquina IL-1 β y se trata con bloqueantes de IL-1 (Agostini et al., 2004; Lachmann et al., 2009).

La mayoría de las investigaciones publicadas sobre la caracterización funcional de variantes patogénicas de NLRP3 se han llevado a cabo exponiendo monocitos o macrófagos a LPS, y cuantificando la liberación de IL-1 β . En estas condiciones experimentales, el LPS exacerba la liberación de IL-1 β en muestras de pacientes con CAPS en comparación con aquellos que portan NLRP3 silvestre, llegando a la conclusión que es un inflammasoma hipersensible (Hooftman et al., 2020; Tapia-Abellán et al., 2019). Sin embargo, los pacientes con CAPS sufren brotes inflamatorios estériles, y los modelos *in vitro* e *in vivo* de CAPS muestran indicios de una activación basal del inflammasoma NLRP3 que no dependen de LPS. De hecho, células HEK293T que expresan variantes patogénicas de NLRP3, muestran un mayor punteado de oligómeros de NLRP3 y una conformación abierta activa basal de esta proteína (Baroja-Mazo et al., 2014; Tapia-Abellán et al., 2019). Además, los modelos murinos que expresan variantes patogénicas de NLRP3, muestran una inflamación sistémica basal (Bonar et al., 2012; Vande Walle et al., 2019). De igual modo, en pacientes CAPS se observa un incremento de niveles séricos de citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-18, TNF- α e IL-6 (Wu et al., 2021) y niveles altos de ROS en sus monocitos (Carta et al., 2012).

En línea con estos resultados, en esta Tesis se ha estudiado el inflammasoma NLRP3 con variantes patogénicas asociadas a CAPS, observándose en ensayos *ex vivo* de muestras de sangre pacientes CAPS con distintas variantes, un incremento en los monocitos con oligómeros de ASC y la liberación de galectina-3 e IL-18 basal, dependiente todas de NLRP3. La activación de NLRP3 aumenta tras la inducción de NF- κ B con LPS, observándose además en esta circunstancia liberación de IL-1 β . De

igual modo, en el conjunto de datos transcriptómicos GSE57253 no se observó un aumento de la expresión de *NLRP3*, *IL1B* e *IL18* en pacientes CAPS cuando se encontraban en brote inflamatorio comparados con donantes sanos (Canna et al., 2014), mostrando evidencias de una activación constitutiva del inflamasoma NLRP3 con variantes patogénicas. Apoyando esta premisa, se ha demostrado que las PBMCs no tratadas de pacientes CAPS tienen una liberación basal de IL-18 y caspasa-1 a las 4h (Rieber et al., 2015; Wu et al., 2021), observándose también oligómeros de ASC en el plasma de estos pacientes (Baroja-Mazo et al., 2014; Corcoran et al., 2020).

En este estudio también se ha utilizado un sistema recombinante inducido por doxiciclina, para expresar diferentes variantes patogénicas de NLRP3 en macrófagos inmortalizados de ratón con el objetivo de poder controlar los niveles de expresión de esta proteína, demostrando que solo aquellos macrófagos portadores de variantes de NLRP3 producían oligómeros de ASC, activación de caspasa-1, procesamiento de GSDMD y liberación de IL-18 basal. De igual modo, el aumento de expresión de NLRP3 dependiente del tiempo de incubación con doxiciclina, produjo los mismos resultados, confirmando que cuando NLRP3 porta variantes patogénicas asociadas a CAPS, origina una activación constitutiva que depende de los niveles de expresión de esta proteína. En línea con nuestros hallazgos, modelos murinos de CAPS con la variante p.D301N (p.D303N en humanos) muestran una inflamación constitutiva, con altos niveles de mediadores inflamatorios séricos (IL-1 β , IL-18, IL-6, G-CSF y TNF- α), y desarrollo de un evidente retraso del crecimiento, osteopenia posnatal grave, meningitis y muerte postnatal (Bonar et al., 2012).

En esta Tesis se ha observado también un efecto de MCC950 dispar según la variante patogénica de NLRP3 estudiada, teniendo el MCC950 un menor efecto sobre la variante p.T348M. Estos hallazgos son similares a los de un estudio *ex vivo* de pacientes CAPS, donde el MCC950 muestra diferentes valores de IC₅₀ dependiendo de la variante patogénica examinada (Weber et al., 2022). Además, se han descrito otras variantes de NLRP3 en ensayos *in vivo* e *in vitro* que no responden a este inhibidor, siendo la variante p.L351P una de ellas (Ren et al., 2021; Vande Walle et al., 2019).

Otra enfermedad autoinflamatoria evaluada en esta Tesis, ha sido la fiebre mediterránea familiar (FMF), la cual surge por variantes patogénicas en el gen *MEFV* que codifica para el sensor pirina, originando así una sobreproducción de IL-1 β e IL-18 dependiente de este inflamasoma (Schnappauf et al., 2019). Sin embargo, a diferencia de los datos obtenidos con pacientes CAPS, en los ensayos *ex vivo* de muestras de pacientes FMF con la variante p.M694I, no se observó un aumento de oligómeros de

ASC de forma basal en los monocitos, pero si una exacerbación de la producción de IL-18 e IL-1 β en comparación con los donantes sanos. De igual modo, en el conjunto de datos transcriptómicos GSE17732 se observó un aumento de la expresión de *NLRP3*, *IL1B* e *IL18* en pacientes FMF que se encontraban en brote inflamatorio, sugiriendo que el incremento de liberación de IL-1 β e IL-18 era dependiente de la expresión elevada de estas citoquinas, no por la activación constitutiva del inflamasoma pirina en sí. Apoyando la idea de que las variantes FMF no producen una activación constitutiva del inflamasoma, un estudio observó que en pacientes FMF no incrementaba la formación oligómeros de ASC en monocitos en relación con los donantes sanos (Moghaddas et al., 2017). Además, las PBMCs de pacientes FMF tratadas con LPS, liberan más IL-1 β (Ibrahim et al., 2014), dependiendo de la variante o de la condición de heterocigosis u homocigosis (Omenetti et al., 2014). Como controversia, un estudio observó en un modelo recombinante que la expresión de la variante p.M694V, origina la liberación de IL-1 β y el procesamiento de GSDMD mostrando indicios de una activación basal de pirina (Spel et al., 2022). En ese sentido, en esta Tesis se han incluido pacientes con la variante *MEFV* p.M694I en homocigosis, tratados con colchicina, con una clínica asintomática en el momento de la extracción de sangre, pudiendo este tratamiento haber alterado la activación basal del inflamasoma.

2. Modulación del inflamasoma NLRP3 asociado a CAPS mediante NF- κ B

En la formación del inflamasoma NLRP3, la vía de señalización del NF- κ B juega un papel crucial, ya que produce la transcripción de NLRP3 y la citoquina pro-IL-1 β (Qiao et al., 2012). Numerosos estudios muestran distintas estrategias para activar esta vía, como los agonistas de TLRs, donde se incluye el agonista de TLR4 LPS (Qiao et al., 2012), agonista de TLR2 Pam3CSK₄ o moléculas endógenas como S100A9 y el ácido graso palmitato que activan TLR4, o la citoquina IL-6 activando a su receptor (He, et al., 2016; Qiao et al., 2012).

A diferencia de la activación canónica de NLRP3 silvestre, en la cual se necesitan dos señales para la formación del inflamasoma y la liberación de IL-1 β , en el síndrome CAPS una señal es suficiente para producir estos dos eventos, conociéndose, como se ha mencionado previamente, como un inflamasoma hipersensible. De hecho, hay estudios que muestran un incremento en la formación de oligómeros de ASC, activación de caspasa-1 y liberación de IL-1 β e IL-18 tras el tratamiento con LPS en muestras de pacientes con CAPS cuando se compara con la condición silvestre (Hoofman et al., 2020; Tapia-Abellán et al., 2019; Wu et al., 2021). También se han descrito otros agonistas de TLR, como el resquimod y el zimósán, que incrementan la liberación de IL-1 β en PBMCs de pacientes CAPS (Carta et al., 2012). Además, la inhibición de NF- κ B disminuye la IL-1 β en las muestras de estos pacientes tratados con LPS, mostrando así la dependencia de esta vía (Shimogaki et al., 2014).

En concordancia con estos resultados previos, en esta Tesis se ha estudiado el papel de NF- κ B sobre la activación constitutiva del inflamasoma NLRP3 con variantes patogénicas asociadas a CAPS, en ensayos *in vitro* y *ex vivo* de macrófagos inmortalizados de ratón y muestras humanas que expresan variantes patogénicas de NLRP3. Donde se ha observado un incremento de la formación de oligómeros de ASC y liberación de IL-1 β en aquellas células portadoras de las distintas variantes de NLRP3 tras la estimulación con agonistas de TLR, como los PAMPs LPS o Pam3CSK₄, pero lo que es más importante, observando también IL-1 β tras la estimulación con las moléculas endógenas S100A9, IL-6 y palmitato, ampliando así el repertorio de moléculas capaces de influir en la liberación de IL-1 β en pacientes con CAPS. Curiosamente, estos resultados evidencian la disparidad de las variantes de NLRP3 frente a la respuesta a los distintos tratamientos, observando una liberación reducida de IL-1 β en la variante p.T348M. Por otro lado, el tratamiento con IL-6 en muestras humanas produjo un incremento en la formación oligómeros de ASC, el cual no se vio en reflejado en la

liberación de IL-1 β o TNF- α , esto puede ser respaldado por un estudio *in vivo* en ratones deficientes del receptor de IL-6, donde mostraban que su delección no mejoraba la patología, sin encontrar una relación directa entre IL-6 y las enfermedades mediadas por inflamomas (McGeough et al., 2012).

En esta Tesis, también se ha demostrado que el tratamiento con LPS, Pam3CSK4, S100A9, IL-6 y palmitato modula la activación constitutiva del inflamoma NLRP3 mutante, obteniendo un aumento en la activación de caspasa-1, el procesamiento de GSDMD, y la piroptosis. De igual modo, en el conjunto de datos transcriptómicos GSE57253, se observó un incremento de la expresión de *S100A9* en pacientes CAPS (Canna et al., 2014), fortaleciendo la idea de que estas moléculas endógenas son capaces de modular la respuesta inflamatoria de NLRP3, y que podrían en parte estar asociadas y contribuir a los brotes inflamatorios que sufren estos pacientes. En línea con esta hipótesis, hay trabajos donde se han reportado que los niveles séricos de S100A9 e IL-6 estaban elevados en estos pacientes (Lachmann et al., 2009; McGeough et al., 2012; Wittkowski et al., 2011).

Por otro lado, en esta Tesis se ha identificado un secretoma particular regulado por las variantes patogénicas de NLRP3, el cual también podría contribuir a la perpetuación de los brotes inflamatorios en pacientes con CAPS. En este respecto, el inflamoma NLRP3 asociado a CAPS induce un aumento en la secreción de IL-1 α , HMBG1, y del receptor purinérgico P2X7. Distintos, estudios muestran que la concentración plasmática del receptor P2X7 aumenta en pacientes con diferentes patologías inflamatorias y se correlaciona positivamente con la concentración plasmática de proteína C reactiva (Conte et al., 2021; García-Villalba et al., 2022), sugiriendo que la concentración plasmática del receptor P2X7 podría servir como un potencial biomarcador de la inflamación relacionada con CAPS.

Todos estos datos sugieren que la activación del inflamoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS es dependiente de dos procesos, uno la activación constitutiva del inflamoma y otro la modulación de NF- κ B, la cual es esencial para la producción de IL-1 β . Por lo tanto, bloquear la activación de NF- κ B para impedir la expresión del gen *NLRP3*, podría ser una vía para tratar o prevenir los brotes inflamatorios en pacientes con CAPS

3. Regulación del inflamasoma NLRP3 asociado a CAPS por deubiquitininasas

La activación canónica NLRP3 silvestre está fuertemente regulada por diversas modificaciones postraduccionales, siendo una de ellas la ubiquitinación o su proceso inverso la deubiquitinación, las cuales pueden afectar tanto la señal de cebado como la de activación (Juliana et al., 2012).

La dependencia de la activación de NLRP3 por las DUBs es evidente y numerosos estudios muestran que la inhibición o la delección de genes que codifican estas enzimas, incrementan la ubiquitinación de NLRP3 reduciendo así su activación (Juliana et al., 2012; Palazón-Riquelme et al., 2018; Py et al., 2013). En esta Tesis, se ha estudiado el papel de las DUBs en la activación constitutiva y la inducida por NF- κ B (tras el tratamiento con LPS) del inflamasoma NLRP3 con variantes patogénicas de NLRP3 asociadas a CAPS. La presencia de inhibidores de DUBs, disminuyó los oligómeros de ASC, el procesamiento de GSDMD y la liberación de IL-1 β e IL-18, demostrando así que las deubiquitininasas están implicadas en la activación basal del inflamasoma NLRP3 con variantes CAPS.

En línea con nuestros resultados, en el estudio de Ren en 2019, se describió que el complejo que contiene a BRCC3 (BRISC) el cual consta de 4 subunidades (BRCC3 ABRO1, NBA1 y BRE), es clave para la deubiquitinación de NLRP3. Demostrando que la activación del inflamasoma NLRP3 tanto en macrófagos de ratón e individuos sanos, como en macrófagos *Nlrp3*^{-/-} de ratón que expresaban la variante patogénica p.A350V de NLRP3 asociada a CAPS, se suprimía por deficiencia de ABRO1. Además, macrófagos que expresan esta variante patogénica de NLRP3 mostraron una mayor deubiquitinación en comparación con los que expresaban la proteína silvestre tras el tratamiento con LPS (Ren, et al. 2019). Por otro lado, en el trabajo de Ren de 2021 utilizaron ensayos *in vivo* en ratón, y demostraron que aquellos que expresaban la variante p.A350V presentaron un menor peso que los ratones silvestres, el fenotipo patológico se restauró en presencia de tiolutina (THL), el cual inhibía la deubiquitinasa BRCC3 (Ren et al., 2021). Estos datos mostraban indicios de la acción de las DUBs sobre la activación basal del inflamasoma NLRP3 asociado a CAPS y la importancia de estas enzimas como diana de posibles fármacos sobre distintas variantes patogénicas de NLRP3. Otras variantes de NLRP3 relacionadas con la enfermedad inflamatoria intestinal de aparición temprana, también presentaban una mayor actividad de las DUBs BRCC3 y JOD2, favoreciendo la formación del inflamasoma (Zhou et al., 2021). Todos estos datos son consistentes con la idea de que la deubiquitinación regula la activación

de NLRP3 con variantes asociadas a CAPS. Además, en esta Tesis se confirma que las DUBs no solo están implicadas en la activación inducida por NF- κ B, sino que también regulan el proceso de activación constitutiva de NLRP3 con variantes patogénicas. Por otra parte, a diferencia de lo que se ha observado en otros estudios donde el empleo de inhibidores de DUBs parecía no afectar a la expresión de *Il1b* e *Il18* (Py et al., 2013), en esta Tesis, los inhibidores de DUBs resultaron en una menor expresión de esos genes y no en aquellos relacionados con la estructura del inflamasoma NLRP3, sugiriendo que las modificaciones postraduccionales están implicadas en la expresión de *Il1b* e *Il18*.

A pesar del concepto ampliamente aceptado de que el proceso de deubiquitinación es necesario para la activación del inflamasoma, recientemente se ha descrito que la ubiquitinación mediada por la ligasa E3 MARCH5 es imprescindible para la formación del complejo NLRP3-NEK7 (Park et al., 2023), sugiriendo que el proceso de ubiquitinación /deubiquitinación es más complejo que lo que parece en cuanto a la regulación del inflamasoma NLRP3.

4. La activación constitutiva del inflamasoma NLRP3 con mutaciones asociadas a CAPS induce una reprogramación metabólica de las células mieloides

Los avances en el campo del inmunometabolismo han revelado cómo los procesos metabólicos son cruciales para regular la respuesta inmunitaria, descubriendo un nuevo horizonte para abordar el tratamiento de diferentes enfermedades.

La relación entre la inflamación y la glicólisis es estrecha, investigaciones previas han revelado que la estimulación con LPS produce una reprogramación metabólica en macrófagos a M1 aumentando la glicólisis y la ruta de la pentosas fosfato, con la consecuente disminución del ciclo de los ácidos tricarbónicos y la fosforilación oxidativa (Hooftman et al., 2020; Palsson-McDermott et al., 2015). Un estudio, mostró que la enzima glicolítica piruvato quinasa 2 (PKM2) junto a HIF-1 α regulan la producción de IL-1 β en macrófagos tratados con LPS (Palsson-McDermott et al., 2015), demostrándose también que la delección de PKM2, atenúa la activación de los inflamasomas NLRP3 y AIM2, y la expresión de IL-1 β (Xie et al., 2016). La glicólisis se ha visto involucrada en el desarrollo de numerosas patologías inflamatorias, de hecho, en un modelo *in vivo* con lesión pulmonar aguda se observó que el bloqueo de la enzima hexoquinasa mediante 2-desoxi-D-glucosa (2-DG), reduce los niveles de expresión de NLRP3 e IL-1 β , mejorando así los síntomas de la enfermedad, de igual modo, pacientes con lesión pulmonar presentan un aumento en la producción de lactato (producto final de la glicólisis) (Zhong et al., 2019). Además, en modelos *in vivo* de sepsis se ha descrito un aumento de la glicólisis con un aumento de liberación de citoquinas proinflamatorias, las cuales se redujeron en presencia de 2-DG (Wang et al., 2020), obteniendo resultados similares en pacientes sépticos (Pan et al., 2022). Todas estas evidencias muestran la dependencia de la glicólisis en la producción de IL-1 β , la activación de NLRP3 y el desarrollo de la inflamación.

En línea con estos datos previos, en esta Tesis se ha evaluado la relación de NLRP3 con variantes patogénicas asociadas CAPS con el metabolismo, determinando que la activación basal del inflamasoma NLRP3 alteraba significativamente los metabolitos celulares, incluidos los lípidos, aminoácidos, nucleótidos y sus intermediarios. Estos hallazgos se ven respaldados además por la regulación positiva de los procesos biológicos y los genes asociados con estas vías. Curiosamente, similar a la reprogramación metabólica que ocurre en macrófagos estimulados con LPS (Palsson-McDermott et al., 2015), en células sanguíneas de pacientes con CAPS que

se encontraban en brote inflamatorio, se observó un aumento de la expresión de genes glicolíticos clave (*PFKFB3* o *BPGM*), mientras que otros (*ENO3*) disminuían su expresión.

A nivel celular, la activación basal del inflamasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS resultó en una disminución de la expresión de genes glicolíticos y una reducción de la glicólisis y la consecuente producción de ATP. Esto condujo a una limitación específica de la producción de IL-1 β , mientras que la liberación de IL-18 no estaba afectada. Más allá de la regulación negativa de los genes glicolíticos, la activación de caspasa-1 también puede reducir la glicólisis mediante el procesamiento de enzimas de esta vía (Shao et al., 2007).

Una limitación de esta Tesis es la posible discrepancia entre la expresión génica y la reprogramación metabólica entre los macrófagos inmortalizados de ratón que expresan la variante patogénica de NLRP3 p.D303N y aquellos macrófagos primarios de ratón o monocitos/macrófagos humanos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, este estudio se centró únicamente en el metabolismo afectado por una variante patógena de NLRP3 (p.D303N) expresada en macrófagos inmortalizados. A pesar de esto, se observó que el perfil metabólico y la expresión génica en monocitos de pacientes con CAPS humanos que portaban variantes patogénicas de NLRP3 eran similares a los de macrófagos inmortalizados que expresaban la variante humana p.D303N de NLRP3, sugiriendo que esta reducción de la glicólisis podría limitar los brotes inflamatorios derivados de IL-1 β en CAPS.

5. El 4-octilitaconato bloquea la activación constitutiva del inflammasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS

El itaconato es un ácido dicarboxílico insaturado que se sintetiza a partir de la descarboxilación del cis-aconitato, un intermediario del TCA, por la enzima ACOD1. Este metabolito es un excelente ejemplo de reprogramación metabólica, ya que su producción aumenta tras el tratamiento con LPS en los macrófagos. Además, el itaconato y sus derivados (4-octilitaconato o dimetilitaconato) se les ha relacionado con eventos antiinflamatorios, de ahí la explicación del auge en su estudio (Hooftman et al., 2020; Peace & O'Neill, 2022).

En numerosos estudios se ha descrito cómo el itaconato hace de nexo entre el metabolismo y la respuesta inflamatoria, de manera que macrófagos deficientes en *Irg1*, gen que codifica para ACOD1, mostraban una mayor producción de citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-18, IL-6 e IL-12, y de otros marcadores de inflamación como NO e HIF-1 α . Además, en ensayos *in vitro* e *in vivo*, el tratamiento con itaconato produce efectos antiinflamatorios (Lampropoulou et al., 2016). En otros ensayos *in vivo*, también se evidencia la importancia del itaconato en la regulación de procesos inflamatorios, ya que ratones deficientes en *Irg1*, sucumben rápidamente a la infección por *Mycobacterium tuberculosis* (Nair et al., 2018). Debido a su aparente éxito, tanto el itaconato como sus derivados se han estudiado como posibles tratamientos para numerosas enfermedades, de hecho, 4-OI tiene efectos antivirales y antiinflamatorios frente al síndrome respiratorio agudo severo causado por el coronavirus 2 (SARS-CoV-2) a través de la señalización de NRF2, mostrando también efectos antivirales frente al virus del herpes simple tipo 1 y 2, el virus Vaccinia y el Zika (Olagnier et al., 2020). Además, los derivados dimetilitaconato o 4-OI, también se han estudiado como tratamiento en el desarrollo de otras patologías, de manera que estos inhiben la activación de NLRP3 en macrófagos estimulados con lisofosfatidilcolina, la cual se usa para inducir la desmielinización simulando un modelo de esclerosis múltiple (Hoyle et al., 2022), y mostrando también un efecto beneficioso en modelos *in vivo* de diabetes tipo 1 (He et al., 2023), prostatitis crónica (Zhao et al., 2023) o sepsis (Zhang et al., 2022).

La relación entre NLRP3 e itaconato es evidente, de hecho, un estudio reciente ha descrito que macrófagos tratados con LPS y nigericina (o ATP) en presencia de 4-OI, presentan una reducción de la activación de caspasa-1, la liberación de IL-1 β e IL-18 y la piroptosis dependiente de NLRP3, mostrando finalmente que el 4-OI modifica el residuo C548 de esta proteína, la cual bloquea la interacción NLRP3-NEK7 y la consecuente formación del inflammasoma (Hooftman et al., 2020). También se ha

descrito que el itaconato y sus derivados afectan a la señal de cebado de NLRP3, disminuyendo la transcripción de pro-IL-1 β en macrófagos tratados con LPS, y que también bloquea la señal de activación del inflamasoma NLRP3 (Hoyle et al., 2022). En línea con estos avances, en esta Tesis, se ha evaluado el efecto de 4-OI sobre la activación constitutiva del inflamasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS en ensayos *in vitro* de macrófagos de ratón que expresaban distintas variantes patogénicas. Dichos ensayos demostraron que 4-OI era capaz de bloquear la activación de caspasa-1, el procesamiento de GSDMD, la piroptosis y la liberación de IL-18. Además, también se demostró que este bloqueo era dependiente de la formación de oligómeros de ASC, sin afectar a la conformación de NLRP3. En concordancia con estos resultados, en PBMCs de pacientes CAPS tratados con LPS, se observó una reducción de la liberación de IL-1 β en presencia de 4-OI (Hoofman et al., 2020), siendo estos datos consistentes con la idea de que el itaconato y sus derivados son capaces de bloquear la activación constitutiva del inflamasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS, llegando a ser un potencial tratamiento para los brotes inflamatorios.

A pesar de las evidencias, también se ha demostrado otras discrepancias sobre el itaconato y sus derivados, ya que no solo actúan sobre NLRP3, sino que tienen como diana otras proteínas, llegando a bloquear varias enzimas de la glicólisis, la cual es necesaria para el desarrollo de la respuesta inflamatoria en macrófagos tratados con LPS, la proteína KEAP1 que regula NRF2, e incluso la propia GSDMD (Bambouskova et al., 2021; Peace & O'Neill, 2022). Además, se ha descrito que los derivados de itaconato pueden tener otras propiedades en comparación con el itaconato endógeno, por lo que no pueden reflejar completamente su funcionalidad (Swain et al., 2020).

6. Moléculas análogas a MCC950 como potenciales inhibidores de NLRP3, y nuevos tratamientos del síndrome CAPS

El inflamasoma NLRP3 se ha visto implicado en el desarrollo de numerosas patologías, por este motivo se le ha considerado como un potencial objetivo farmacológico, convirtiéndose la identificación de compuestos que modulen este inflamasoma en un área activa de investigación.

La mayoría de los inhibidores de NLRP3 existentes se dirigen a eventos relacionados con su activación, como la señal de cebado, la regulación postraduccional o la señal de activación, entre otros. Sin embargo, son pocos los inhibidores que se han descrito hasta la fecha que inhiban directamente NLRP3, siendo el más caracterizado el MCC950. Esta sulfonilurea fue descrita como un potencial inhibidor de NLRP3 en el estudio de Coll de 2015, (Coll et al., 2015), descubriendo más tarde su mecanismo de acción, el cual bloquea la actividad ATPasa de NLRP3 (Coll et al., 2019). Desde entonces el inhibidor MCC950 ha sido objeto de estudio en numerosos trabajos *in vitro* e *in vivo*, demostrando su eficacia en una amplia variedad de modelos preclínicos, entre los que se incluye la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, la sepsis o el síndrome CAPS (Li et al., 2021). Sin embargo, un ensayo clínico con MCC950 llegó sin éxito a fase II, ya que este produce hepatotoxicidad (Mangan et al., 2018).

Por ello, numerosas investigaciones se han centrado en la búsqueda de moléculas similares a MCC950, de hecho, en un estudio se sintetizaron moléculas análogas añadiendo grupos deuterio (^2H). Estos nuevos compuestos se testaron sobre macrófagos derivados de monocitos humanos, tratados con LPS y nigericina para simular la activación canónica del inflamasoma NLRP3, obteniendo valores IC_{50} muy similares a la molécula original de MCC950 (Salla et al., 2018). En otro estudio, se desarrollaron varias moléculas N-fenil-1-(fenilsulfonamida)ciclopropano-1-carboxamida análogas a MCC950 mediante el remplazo del anillo furano B, observando en varias de ellas una inhibición del inflamasoma NLRP3, ya que disminuían la liberación de $\text{IL-1}\beta$ a concentraciones nanomolares (Li et al., 2021). También se han ideado otras estrategias creando híbridos de MCC950 con sulfonilureas secretagogos de insulina, estas moléculas fueron testadas en ensayos *in vitro* obteniendo resultados favorables en macrófagos de ratón y en una línea celular pancreática, donde se observaba en ambos casos la inhibición del inflamasoma NLRP3, actuando como prometedoras herramientas para comprender mejor la activación de NLRP3 en la diabetes tipo 2 (Hill et al., 2017).

En línea con estos resultados, en esta Tesis, se ha realizado un cribado de 26 moléculas análogas a MCC950 las cuales fueron seleccionadas mediante modelado computacional como candidatas para la unión a la región ATPasa de NLRP3. Los ensayos *in vitro* en PBMCs humanas de individuos sanos y de macrófagos de ratón derivados de médula ósea silvestres, e inmortalizados que expresaban la variante patogénica de NLRP3 p.D303N, mostraron que el compuesto E3 y el E1 eran potenciales inhibidores de NLRP3, ya que al añadirlos después del cebado con LPS bloqueaban la formación de oligómeros de ASC, la activación de caspasa-1, el procesamiento de GSDMD y la liberación de IL-1 β . Sin embargo, estos compuestos también bloquearon la señal cebado, disminuyendo la expresión de NLRP3 y pro-IL-1 β si se administraban junto con el LPS, a diferencia de lo que ocurre con MCC950 y otros análogos donde la liberación de TNF- α no está afectada en macrófagos tratados con LPS y ATP (Li et al., 2021).

A pesar de las discrepancias con el MCC950, los compuestos E1 y E3 pueden ser prometedores candidatos para el desarrollo de nuevas terapias donde el inflammasoma NLRP3 está involucrado. Además, estas moléculas podrían tener un espectro antiinflamatorio mayor al inhibir la activación de NLRP3 y la señalización de NF- κ B.

7. Resumen

En base a todos los resultados mostrados a lo largo de esta Tesis, se propone un modelo para la activación de NLRP3 con variantes patogénicas asociadas a CAPS. En dicho modelo, la expresión de variantes de NLRP3 favorece la activación constitutiva del inflamasoma, gracias a la deubiquitinación parcial de la proteína. Esto resulta en la consecuente formación de oligómeros de ASC, activación de caspasa-1, procesamiento de GSDMD y liberación de la citoquina IL-18 (**Figura 49**).

La activación de la vía de señalización de NF- κ B por moléculas asociadas a patógenos agonistas de TLR, (LPS y Pam3CKs₄) o por moléculas endógenas (S100A9, el ácido graso palmítico o la citoquina IL-6), aumenta la activación constitutiva del inflamasoma NLRP3 portador de variantes patogénicas. Por lo que, una regulación positiva de esta vía incrementa la expresión de NLRP3 e IL-1 β , y la deubiquitinación sobre el propio NLRP3, produciendo así un aumento de la activación del inflamasoma y la liberación de IL-18, y promoviendo también la liberación de IL-1 β y otros marcadores inflamatorios (IL-1 α , el receptor purinérgico P2X7, cistatina B y HMBG1) (**Figura 49**).

Por otro lado, la expresión de NLRP3 con variantes asociadas a CAPS produce una reprogramación metabólica, disminuyendo la glicólisis, la cual afecta a la producción de IL-1 β , probablemente este proceso limita los brotes inflamatorios en CAPS derivados de esta citoquina. Además, el derivado del itaconato (4-octilaitaconato) es capaz de bloquear la activación constitutiva del inflamasoma NLRP3, inhibiendo la formación de oligómeros de ASC (**Figura 49**).

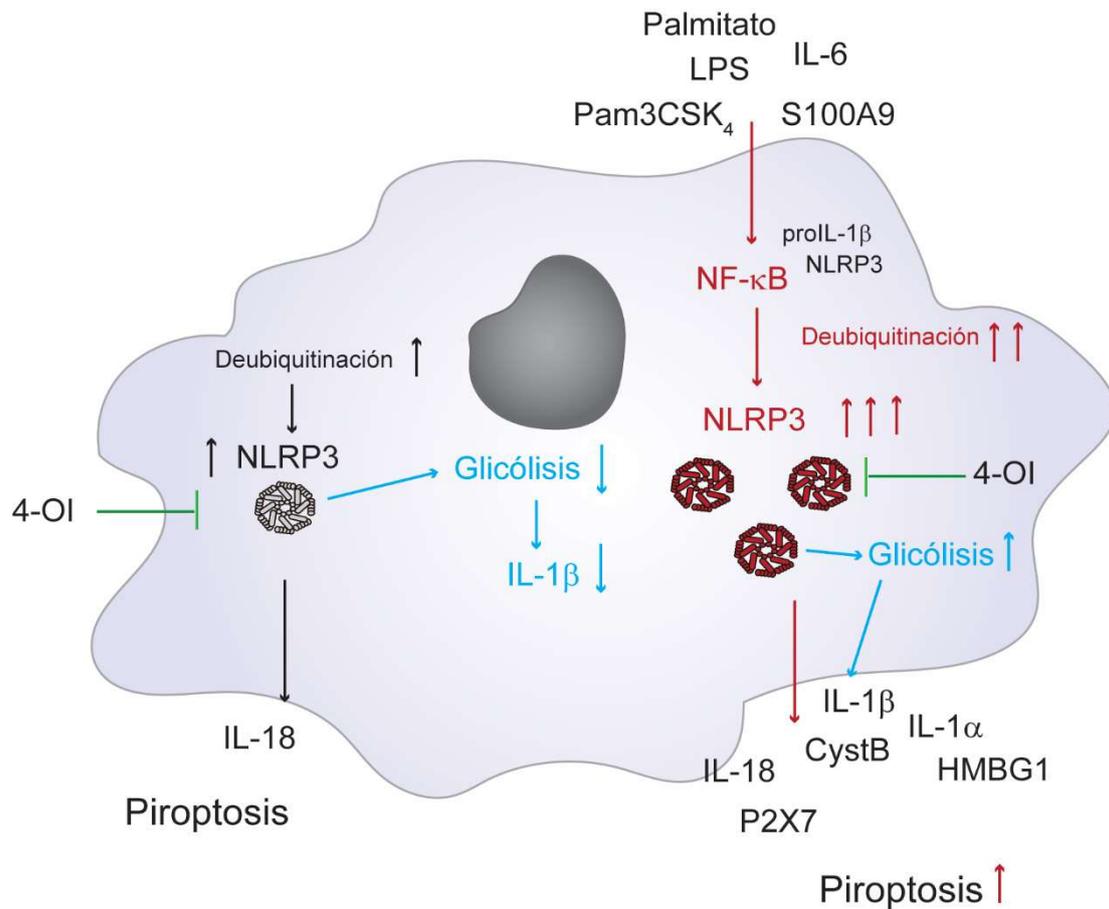


Figura 49. Esquema modelo de la activación de NLRP3 con variantes patogénicas asociadas a CAPS. La activación constitutiva del inflamasoma (línea negra), produce la liberación de IL-18 basal, esta puede ser modulada por la activación de NF-κB (línea roja). La activación constitutiva del inflamasoma NLRP3, afecta a la glicólisis la cual controla la liberación de IL-1β (línea azul), la activación de NF-κB induce un aumento de la glicólisis, pero sigue siendo ineficiente y afecta a IL-1β (línea azul). El compuesto 4-OI bloquea la activación de NLRP3 con variantes patogénicas (línea verde).

CONCLUSIONES

Conclusiones en español

1. Los monocitos de pacientes CAPS presentan una producción constitutiva de oligómeros de ASC, de galectina-3 y de IL-18.
2. El tratamiento con LPS aumenta la activación del inflamasoma NLRP3 con variantes patogénicas.
3. Los monocitos de pacientes con FMF presentan un incremento en la liberación de IL-1 β e IL-18, sin presentar una activación del inflamasoma pirina.
4. La expresión de variantes patogénicas de NLRP3 en macrófagos, produce una activación del inflamasoma, con la consecuente formación de oligómeros de ASC, activación de caspasa-1, procesamiento de GSDMD, liberación de IL-18 y piroptosis.
5. El tratamiento con LPS, Pam3CSK₄, palmitato, S100A9 e IL-6, activa el inflamasoma NLRP3 con variantes patogénicas, siendo esencial para la liberación de IL-1 β .
6. La activación del inflamasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS, se regula por deubiquitininas.
7. La expresión de variantes patogénicas de NLRP3 producen una reprogramación metabólica de la células mieloides, afectando a la glicólisis.
8. La inhibición de la glicólisis por NLRP3 con variantes patogénicas limita la producción de IL-1 β , pero no IL-18.
9. El 4-octilitaconato inhibe la activación del inflamasoma NLRP3 con variantes asociadas a CAPS, reduciendo la activación de caspasa-1, el procesamiento de GSDMD, la liberación de IL-18 y la piroptosis.
10. El 4-octilitaconato bloquea la formación de oligómeros de ASC inducida por variantes patogénicas de NLRP3.
11. Las moléculas E1 y E3, análogas del MCC950, inhiben la señal de cebado y la señal de activación del inflamasoma NLRP3 silvestre y portador de variantes patogénicas asociadas a CAPS.

Conclusiones en inglés

1. Monocytes from CAPS patients present a constitutive production of ASC oligomers, and galectin-3 and IL-18 release.
2. LPS treatment increases NLRP3 inflammasome activation with pathogenic variants associated with CAPS.
3. Monocytes from patients with FMF increase the release of IL-1 β and IL-18, without a basal activation of the pyrin inflammasome.
4. Macrophages expressing pathogenic variants of NLRP3 associated with CAPS present inflammasome activation, with the consequent formation of ASC oligomers, activation of caspase-1, processing of GSDMD, IL-18 release and pyroptosis.
5. LPS, Pam3CSK₄, palmitate, S100A9, and IL-6 increase the activation of the NLRP3 inflammasome with pathogenic variants associated with CAPS, being essential for the release of IL-1 β .
6. The activation of the NLRP3 inflammasome with CAPS-associated variants is regulated by deubiquitinases.
7. The expression of pathogenic variants of NLRP3 produces a metabolic reprogramming in myeloid cells, affecting glycolysis.
8. The inhibition of glycolysis by NLRP3 with pathogenic variants limits the production of IL-1 β , but not the release of IL-18.
9. 4-Octylitaconate inhibits the NLRP3 inflammasome with CAPS-associated variants, reducing caspase-1 activation, GSDMD processing, IL-18 release, and pyroptosis.
10. 4-Octylitaconate blocks the formation of ASC oligomers induced by pathogenic NLRP3 variants.
11. The molecules E1 and E3, analogues of MCC950, inhibit the priming and the activation of the canonical wild-type NLRP3 inflammasome, as well as the NLRP3 with pathogenic variants associated with CAPS.

REFERENCIAS

- Abraham, S. N., & St. John, A. L. (2010). Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nature Reviews Immunology*, *10*(6), 440-452.
- Afonina, I. S., Tynan, G. A., Logue, S. E., Cullen, S. P., Bots, M., Lüthi, A. U., Reeves, E. P., McElvaney, N. G., Medema, J. P., Lavelle, E. C., *et al.* (2011). Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of IL-1 α . *Molecular cell*, *44*(2), 265-278.
- Aizawa, E., Karasawa, T., Watanabe, S., Komada, T., Kimura, H., Kamata, R., Ito, H., Hishida, E., Yamada, N., & Kasahara, T., *et al.* (2020). GSDME-dependent incomplete pyroptosis permits selective IL-1 α release under caspase-1 inhibition. *Science*, *23*(5).
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, *124*(4), 783-801.
- Aksentijevich, I., Masters, S. L., Ferguson, P. J., Dancey, P., Frenkel, J., van Royen-Kerkhoff, A., Laxer, R., Tedgård, U., Cowen, E. W., *et al.* (2009). An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1–receptor antagonist. *New England Journal of Medicine*, *360*(23), 2426-2437.
- Akther, M., Haque, M. E., Park, J., Kang, T.-B., & Lee, K.-H. (2021). NLRP3 ubiquitination—a new approach to target NLRP3 inflammasome activation. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16), 8780.
- Allen, I. C., Wilson, J. E., Schneider, M., Lich, J. D., Roberts, R. A., Arthur, J. C., Woodford, R.-M. T., Davis, B. K., Uronis, J. M., Herfarth, H. H., *et al.* (2012). NLRP12 suppresses colon inflammation and tumorigenesis through the negative regulation of noncanonical NF- κ B signaling. *Immunity*, *36*(5), 742-754.
- Andreeva, L., David, L., Rawson, S., Shen, C., Pasricha, T., Pelegrin, P., & Wu, H. (2021). NLRP3 cages revealed by full-length mouse NLRP3 structure control pathway activation. *Cell*, *184*(26), 6299-6312.
- Angosto-Bazarra, D., Alarcón-Vila, C., Hurtado-Navarro, L., Baños, M. C., Rivers-Auty, J., & Pelegrín, P. (2022). Evolutionary analyses of the gasdermin family suggest conserved roles in infection response despite loss of pore-forming functionality. *BMC biology*, *20*(1), 9.
- Angosto-Bazarra, D., Molina-López, C., & Pelegrín, P. (2022). Physiological and pathophysiological functions of NLRP6: pro-and anti-inflammatory roles. *Communications Biology*, *5*(1), 524.
- Angosto-Bazarra, D., Molina-López, C., Peñín-Franch, A., Hurtado-Navarro, L., & Pelegrín, P. (2021). Techniques to study inflammasome activation and inhibition by small molecules. *Molecules*, *26*(6), 1704.
- Arend, W. P., Joslin, F. G., & Massoni, R. J. (1985). Effects of immune complexes on production by human monocytes of interleukin 1 or an interleukin 1 inhibitor. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *134*(6), 3868-3875.
- Bae, S., Kim, H., Lee, N., Won, C., Kim, H.-R., Hwang, Y., Song, Y. W., Kang, J. S., & Lee, W. J. (2012). α -Enolase expressed on the surfaces of monocytes and macrophages induces robust synovial inflammation in rheumatoid arthritis. *The Journal of Immunology*, *189*(1), 365-372.

REFERENCIAS

- Bailey, J. D., Diotallevi, M., Nicol, T., McNeill, E., Shaw, A., Chuaiphichai, S., Hale, A., Starr, A., Nandi, M., & Stylianou, E. (2019). Nitric oxide modulates metabolic remodeling in inflammatory macrophages through TCA cycle regulation and itaconate accumulation. *Cell Reports*, *28*(1), 218-230.
- Bambouskova, M., Gorvel, L., Lampropoulou, V., Sergushichev, A., Loginicheva, E., Johnson, K., Korenfeld, D., Mathyer, M. E., Kim, H., Huang, *et al.* (2018). Electrophilic properties of itaconate and derivatives regulate the I κ B ζ -ATF3 inflammatory axis. *Nature* *2018* *556*:7702, *556*(7702), 501-504.
- Bandeira-Melo, C., Serra, M. F., Diaz, B. L., Cordeiro, R. S. B., Silva, P. M. R., Lenzi, H. L., Bakhle, Y. S., Serhan, C. N., & Martins, M. A. (2000). Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 and lipoxin A4 accelerate resolution of allergic edema in *Angiostrongylus costaricensis*-infected rats: relationship with concurrent eosinophilia. *The Journal of Immunology*, *164*(2), 1029-1036.
- Baroja-Mazo, A., Martín-Sánchez, F., Gomez, A. I., Martínez, C. M., Amores-Iniesta, J., Compan, V., Barberà-Cremades, M., Yagüe, J., Ruiz-Ortiz, E., Antón, J. *et al.* (2014). The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nature immunology*, *15*(8), 738-748.
- Barry, R., John, S. W., Liccardi, G., Tenev, T., Jaco, I., Chen, C.-H., Choi, J., Kasperkiewicz, P., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E., *et al.* (2018). SUMO-mediated regulation of NLRP3 modulates inflammasome activity. *Nature communications*, *9*(1), 3001.
- Barton, G. M., & Kagan, J. C. (2009). A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nature Reviews Immunology*, *9*(8), 535-542.
- Bauernfeind, F. G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E. S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B. G., Fitzgerald, K. A., *et al.* (2009). Cutting edge: NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *The Journal of Immunology*, *183*(2), 787-791.
- Bonar, S. L., Brydges, S. D., Mueller, J. L., McGeough, M. D., Pena, C., Chen, D., Grimston, S. K., Hickman-Brecks, C. L., Ravindran, S., McAlinden, A., *et al.* (2012). Constitutively activated NLRP3 inflammasome causes inflammation and abnormal skeletal development in mice. *PloS one*, *7*(4), e35979.
- Bossaller, L., Chiang, P.-I., Schmidt-Lauber, C., Ganesan, S., Kaiser, W. J., Rathinam, V. A. K., Mocarski, E. S., Subramanian, D., Green, D. R., Silverman, N., *et al.* (2012). Cutting edge: FAS (CD95) mediates noncanonical IL-1 β and IL-18 maturation via caspase-8 in an RIP3-independent manner. *The Journal of Immunology*, *189*(12), 5508-5512.
- Boucher, D., Monteleone, M., Coll, R. C., Chen, K. W., Ross, C. M., Teo, J. L., Gomez, G. A., Holley, C. L., Bierschenk, D., Stacey, K. J., *et al.* (2018). Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *Journal of Experimental Medicine*, *215*(3), 827-840.

REFERENCIAS

- Braverman, J., & Stanley, S. A. (2017). Nitric oxide modulates macrophage responses to Mycobacterium tuberculosis infection through activation of HIF-1 α and repression of NF- κ B. *The Journal of Immunology*, 199(5), 1805-1816.
- Broz, P., Pelegrín, P., & Shao, F. (2020). The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 20(3), 143-157.
- Broz, P., von Moltke, J., Jones, J. W., Vance, R. E., & Monack, D. M. (2010). Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell host & microbe*, 8(6), 471-483.
- Brydges, S. D., Broderick, L., McGeough, M. D., Pena, C. A., Mueller, J. L., & Hoffman, H. M. (2013). Divergence of IL-1, IL-18, and cell death in NLRP3 inflammasomopathies. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(11), 4695-4705.
- Burzynski, L. C., Humphry, M., Pyrillou, K., Wiggins, K. A., Chan, J. N. E., Figg, N., Kitt, L. L., Summers, C., Tatham, K. C., Martin, P. B., *et al.* (2019). The coagulation and immune systems are directly linked through the activation of interleukin-1 α by thrombin. *Immunity*, 50(4), 1033-1042.
- Campos, T. M., Novais, F. O., Saldanha, M., Costa, R., Lordelo, M., Celestino, D., Sampaio, C., Tavares, N., Arruda, S., Machado, P., *et al.* (2020). Granzyme B produced by natural killer cells enhances inflammatory response and contributes to the immunopathology of cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, 221(6), 973-982.
- Canna, S. W., de Jesus, A. A., Gouni, S., Brooks, S. R., Marrero, B., Liu, Y., DiMattia, M. A., Zaal, K. J. M., Sanchez, G. A. M., Kim, H., *et al.* (2014). An activating NLRP4 inflammasome mutation causes autoinflammation with recurrent macrophage activation syndrome. *Nature genetics*, 46(10), 1140-1146.
- Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., & Goeddel, D. V. (1996). TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature*, 383(6599), 443-446.
- Carruth, L. M., Demczuk, S., & Mizel, S. B. (1991). Involvement of a calpain-like protease in the processing of the murine interleukin 1 alpha precursor. *Journal of Biological Chemistry*, 266(19), 12162-12167.
- Cavalli, G., & Dinarello, C. A. (2018). Anakinra therapy for non-cancer inflammatory diseases. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1157.
- Chandel, N. S. (2021a). Glycolysis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(5), a040535.
- Chandel, N. S. (2021b). Mitochondria. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(3), a040543.
- Chen, J., & Chen, Z. J. (2018). PtdIns4P on dispersed trans-Golgi network mediates NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, 564(7734), 71-76.
- Chen, K. W., Monteleone, M., Boucher, D., Sollberger, G., Ramnath, D., Condon, N. D., von Pein, J. B., Broz, P., Sweet, M. J., & Schroder, K. (2018).

REFERENCIAS

- Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps. *Science immunology*, 3(26), eaar6676.
- Chen, L., Cao, S., Lin, Z., He, S., & Zuo, J. (2021). NOD-like receptors in autoimmune diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 42(11), 1742-1756.
- Chiossone, L., Dumas, P.-Y., Vienne, M., & Vivier, E. (2018). Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nature Reviews Immunology*, 18(11), 671-688.
- Chiu, S., & Bharat, A. (2016). Role of monocytes and macrophages in regulating immune response following lung transplantation. *Current opinion in organ transplantation*, 21(3), 239-245.
- Choi, I., Son, H., & Baek, J.-H. (2021). Tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediates: regulators of immune responses. *Life*, 11(1), 69.
- Cocco, M., Pellegrini, C., Martínez-Banaclocha, H., Giorgis, M., Marini, E., Costale, A., Miglio, G., Fornai, M., Antonioli, L., Lopez-Castejon, G., *et al.* (2017). Development of an acrylate derivative targeting the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory bowel disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(9), 3656-3671.
- Cohen, I., Rider, P., Carmi, Y., Braiman, A., Dotan, S., White, M. R., Voronov, E., Martin, M. U., Dinarello, C. A., & Apte, R. N. (2010). Differential release of chromatin-bound IL-1 α discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(6), 2574-2579.
- Cohen, I., Rider, P., Vornov, E., Tomas, M., Tudor, C., Wegner, M., Brondani, L., Freudenberg, M., Mittler, G., Ferrando-May, E., *et al.* (2015). IL-1 α is a DNA damage sensor linking genotoxic stress signaling to sterile inflammation and innate immunity. *Scientific reports*, 5(1), 14756.
- Coll, R. C., Hill, J. R., Day, C. J., Zamoshnikova, A., Boucher, D., Massey, N. L., Chitty, J. L., Fraser, J. A., Jennings, M. P., Robertson, A. A. B., *et al.* (2019). MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nature chemical biology*, 15(6), 556-559.
- Coll, R. C., Robertson, A. A. B., Chae, J. J., Higgins, S. C., Muñoz-Planillo, R., Inserra, M. C., Vetter, I., Dungan, L. S., Monks, B. G., Stutz, A., *et al.* (2015). A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nature medicine*, 21(3), 248-255.
- Cordes, T., Wallace, M., Michelucci, A., Divakaruni, A. S., Sapcariu, S. C., Sousa, C., Koseki, H., Cabrales, P., Murphy, A. N., Hiller, K., *et al.* (2016). Immuno-responsive gene 1 and itaconate inhibit succinate dehydrogenase to modulate intracellular succinate levels. *Journal of Biological Chemistry*, 291(27), 14274-14284.
- Creagh, E. M., & O'Neill, L. A. J. (2006). TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends in immunology*, 27(8), 352-357.
- Cridland, J. A., Curley, E. Z., Wykes, M. N., Schroder, K., Sweet, M. J., Roberts, T. L., Ragan, M. A., Kassahn, K. S., & Stacey, K. J. (2012). The mammalian

REFERENCIAS

- PYHIN gene family: phylogeny, evolution and expression. *BMC evolutionary biology*, 12, 1-17.
- Dai, Z., Liu, W.-C., Chen, X.-Y., Wang, X., Li, J.-L., & Zhang, X. (2023). Gasdermin D-mediated pyroptosis: mechanisms, diseases, and inhibitors. *Frontiers in Immunology*, 14, 1178662.
- Daniels, M. J. D., Rivers-Auty, J., Schilling, T., Spencer, N. G., Watremez, W., Fasolino, V., Booth, S. J., White, C. S., Baldwin, A. G., Freeman, S., *et al.* (2016). Fenamate NSAIDs inhibit the NLRP3 inflammasome and protect against Alzheimer's disease in rodent models. *Nature communications*, 7(1), 12504.
- de Carvalho, R. V. H., Andrade, W. A., Lima-Junior, D. S., Dilucca, M., de Oliveira, C. V., Wang, K., Nogueira, P. M., Rugani, J. N., Soares, R. P., Beverley, S. M. *et al.* (2019). Leishmania lipophosphoglycan triggers caspase-11 and the non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome. *Cell Reports*, 26(2), 429-437.
- de Torre-Minguela, C., Barberà-Cremades, M., Gómez, A. I., Martín-Sánchez, F., & Pelegrín, P. (2016). Macrophage activation and polarization modify P2X7 receptor secretome influencing the inflammatory process. *Scientific reports*, 6(1), 22586.
- Dick, M. S., Sborgi, L., Rühl, S., Hiller, S., & Broz, P. (2016). ASC filament formation serves as a signal amplification mechanism for inflammasomes. *Nature communications*, 7(1), 11929.
- Dinarello, C. A. (2018). Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological reviews*, 281(1), 8-27.
- Dinarello, C. A., Goldin, N. P., & Wolff, S. M. (1974). Demonstration and characterization of two distinct human leukocytic pyrogens. *The Journal of Experimental Medicine*, 139(6), 1369-1381.
- Dinarello, C. A., Novick, D., Kim, S., & Kaplanski, G. (2013). Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Frontiers in immunology*, 4, 289.
- Ding, J., Wang, K., Liu, W., She, Y., Sun, Q., Shi, J., Sun, H., Wang, D.-C., & Shao, F. (2016). Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature*, 535(7610), 111-116.
- Dodé, C., Le Dû, N., Cuisset, L., Letourneur, F., Berthelot, J.-M., Vaudour, G., Meyrier, A., Watts, R. A., Scott, G. I. D., Nicholls, A., *et al.* (2002). New mutations of CIAS1 that are responsible for Muckle-Wells syndrome and familial cold urticaria: a novel mutation underlies both syndromes. *The American Journal of Human Genetics*, 70(6), 1498-1506.
- Dudeck, A., Dudeck, J., Scholten, J., Petzold, A., Surianarayanan, S., Köhler, A., Peschke, K., Vöhringer, D., Waskow, C., Krieg, T., *et al.* (2011). Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens. *Immunity*, 34(6), 973-984.
- Elinav, E., Strowig, T., Kau, A. L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C. A., Booth, C. J., Peaper, D. R., Bertin, J., Eisenbarth, S. C., Gordon, J. I., *et al.* (2011). NLRP6

REFERENCIAS

- inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell*, 145(5), 745-757.
- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R. M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., & Di Virgilio, F. (2006). The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *The Journal of Immunology*, 176(7), 3877-3883.
- Fields, J. K., Günther, S., & Sundberg, E. J. (2019). Structural basis of IL-1 family cytokine signaling. *Frontiers in immunology*, 10, 1412.
- Franklin, B. S., Bossaller, L., De Nardo, D., Ratter, J. M., Stutz, A., Engels, G., Brenker, C., Nordhoff, M., Mirandola, S. R., Al-Amoudi, A., *et al.* (2014). The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. *Nature immunology*, 15(8), 727-737.
- Freemerman, A. J., Johnson, A. R., Sacks, G. N., Milner, J. J., Kirk, E. L., Troester, M. A., Macintyre, A. N., Goraksha-Hicks, P., Rathmell, J. C., & Makowski, L. (2014). Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 289(11), 7884-7896.
- Fu, J., & Wu, H. (2023). Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation. *Annual Review of Immunology*, 41, 301-316.
- Gaidt, M. M., Ebert, T. S., Chauhan, D., Schmidt, T., Schmid-Burgk, J. L., Rapino, F., Robertson, A. A. B., Cooper, M. A., Graf, T., & Hornung, V. (2016). Human monocytes engage an alternative inflammasome pathway. *Immunity*, 44(4), 833-846.
- Gao, W., Yang, J., Liu, W., Wang, Y., & Shao, F. (2016). Site-specific phosphorylation and microtubule dynamics control Pypin inflammasome activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(33), E4857-E4866.
- Garcia-Culebras, A., Duran-Laforet, V., Pena-Martinez, C., Moraga, A., Ballesteros, I., Cuartero, M. I., de la Parra, J., Palma-Tortosa, S., Hidalgo, A., Corbi, A. L., *et al.* (2019). Role of TLR4 (toll-like receptor 4) in N1/N2 neutrophil programming after stroke. *Stroke*, 50(10), 2922-2932.
- Geering, B., Stoeckle, C., Conus, S., & Simon, H.-U. (2013). Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends in immunology*, 34(8), 398-409.
- Gilmartin, L., Tarleton, C. A., Schuyler, M., Wilson, B. S., & Oliver, J. M. (2008). A comparison of inflammatory mediators released by basophils of asthmatic and control subjects in response to high-affinity IgE receptor aggregation. *International archives of allergy and immunology*, 145(3), 182-192.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Carneiro, L. A. M., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M.-K., Labigne, A., Zähringer, U., *et al.* (2003). Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*, 300(5625), 1584-1587.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J., & Sansonetti, P. J. (2003). Nod2 is a general sensor of

REFERENCIAS

- peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 8869-8872.
- Gordon, S., & Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, 32(5), 593-604.
- Groß, C. J., Mishra, R., Schneider, K. S., Médard, G., Wettmarshausen, J., Dittlein, D. C., Shi, H., Gorka, O., Koenig, P.-A., Fromm, S., *et al.* (2016). K⁺ efflux-independent NLRP3 inflammasome activation by small molecules targeting mitochondria. *Immunity*, 45(4), 761-773.
- Gültekin, Y., Eren, E., & Özören, N. (2014). Overexpressed NLRC3 acts as an anti-inflammatory cytosolic protein. *Journal of innate immunity*, 7(1), 25-36.
- Guo, C., Fulp, J. W., Jiang, Y., Li, X., Chojnacki, J. E., Wu, J., Wang, X.-Y., & Zhang, S. (2017). Development and characterization of a hydroxyl-sulfonamide analogue, 5-chloro-N-[2-(4-hydroxysulfamoyl-phenyl)-ethyl]-2-methoxybenzamide, as a novel NLRP3 inflammasome inhibitor for potential treatment of multiple sclerosis. *ACS chemical neuroscience*, 8(10), 2194-2201.
- Gurung, P., Anand, P. K., Malireddi, R. K., Vande Walle, L., Van Opendenbosch, N., Dillon, C. P., Weinlich, R., Green, D. R., Lamkanfi, M., & Kanneganti, T.-D. (2014). FADD and caspase-8 mediate priming and activation of the canonical and noncanonical Nlrp3 inflammasomes. *The Journal of Immunology*, 192(4), 1835-1846.
- Hafner-Bratkovič, I., Sušjan, P., Lainšček, D., Tapia-Abellán, A., Cerović, K., Kadunc, L., Angosto-Bazarra, D., Pelegrin, P., & Jerala, R. (2018). NLRP3 lacking the leucine-rich repeat domain can be fully activated via the canonical inflammasome pathway. *Nature communications*, 9(1), 5182.
- Hagar, J. A., Powell, D. A., Aachoui, Y., Ernst, R. K., & Miao, E. A. (2013). Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science*, 341(6151), 1250-1253.
- Hai, B., Mao, T., Du, C., Jia, F., Liu, Y., Song, Q., Pan, X., Liu, X., & Zhu, B. (2022). USP14 promotes pyroptosis of human annulus fibrosus cells derived from patients with intervertebral disc degeneration through deubiquitination of NLRP3: USP14 induces deubiquitination of NLRP3. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 54(11), 1720.
- Hara, H., Seregin, S. S., Yang, D., Fukase, K., Chamailard, M., Alnemri, E. S., Inohara, N., Chen, G. Y., & Núñez, G. (2018). The NLRP6 inflammasome recognizes lipoteichoic acid and regulates gram-positive pathogen infection. *Cell*, 175(6), 1651-1664.
- Hazuda, D. J., Strickler, J., Simon, P., & Young, P. R. (1991). Structure-function mapping of interleukin 1 precursors. Cleavage leads to a conformational change in the mature protein. *Journal of Biological Chemistry*, 266(11), 7081-7086.
- He, H., Jiang, H., Chen, Y., Ye, J., Wang, A., Wang, C., Liu, Q., Liang, G., Deng, X., Jiang, W., *et al.* (2018). Oridonin is a covalent NLRP3 inhibitor with strong anti-inflammasome activity. *Nature communications*, 9(1), 2550.

REFERENCIAS

- He, W., Wan, H., Hu, L., Chen, P., Wang, X., Huang, Z., Yang, Z.-H., Zhong, C.-Q., & Han, J. (2015). Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell research*, *25*(12), 1285-1298.
- He, Y., Hara, H., & Núñez, G. (2016). Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends in biochemical sciences*, *41*(12), 1012-1021.
- He, Y., Zeng, M. Y., Yang, D., Motro, B., & Núñez, G. (2016). NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature*, *530*(7590), 354-357.
- He, Z., Riva, M., Björk, P., Swärd, K., Mörgelin, M., Leanderson, T., & Ivars, F. (2016). CD14 is a co-receptor for TLR4 in the S100A9-induced pro-inflammatory response in monocytes. *PLoS One*, *11*(5), e0156377.
- Hijdra, D., Vorselaars, A. D. M., Grutters, J. C., Claessen, A. M. E., & Rijkers, G. T. (2013). Phenotypic characterization of human intermediate monocytes. *Frontiers in immunology*, *4*(23), 339.
- Højen, J. F., Kristensen, M. L. V., McKee, A. S., Wade, M. T., Azam, T., Lunding, L. P., de Graaf, D. M., Swartzwelter, B. J., Wegmann, M., Tolstrup, M., *et al.* (2019). IL-1R3 blockade broadly attenuates the functions of six members of the IL-1 family, revealing their contribution to models of disease. *Nature immunology*, *20*(9), 1138-1149.
- Hoofman, A., Angiari, S., Hester, S., Corcoran, S. E., Runtsch, M. C., Ling, C., Ruzek, M. C., Slivka, P. F., McGettrick, A. F., Banahan, K., *et al.* (2020). The immunomodulatory metabolite itaconate modifies NLRP3 and inhibits inflammasome activation. *Cell Metabolism*, *32*(3), 468-478.
- Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D. R., Latz, E., & Fitzgerald, K. A. (2009). AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*, *458*(7237), 514-518.
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Kono, H., Rock, K. L., Fitzgerald, K. A., & Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature immunology*, *9*(8), 847-856.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.-K., Schlee, M., & Hartmann, G. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *science*, *314*(5801), 994-997.
- Hoss, F., Rodriguez-Alcazar, J. F., & Latz, E. (2017). Assembly and regulation of ASC specks. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *74*, 1211-1229.
- Hoyle, C., Green, J. P., Allan, S. M., Brough, D., & Lemarchand, E. (2022). Itaconate and fumarate derivatives inhibit priming and activation of the canonical NLRP3 inflammasome in macrophages. *Immunology*, *165*(4), 460-480.
- Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*, *4*(1), 44-57.

REFERENCIAS

- Huang, Y., Jiang, H., Chen, Y., Wang, X., Yang, Y., Tao, J., Deng, X., Liang, G., Zhang, H., Jiang, W., *et al.* (2018). Tranilast directly targets NLRP 3 to treat inflammasome-driven diseases. *EMBO molecular medicine*, 10(4), e8689.
- Huang, Y., Wang, H., Hao, Y., Lin, H., Dong, M., Ye, J., Song, L., Wang, Y., Li, Q., Shan, B., *et al.* (2020). Myeloid PTEN promotes chemotherapy-induced NLRP3-inflammasome activation and antitumour immunity. *Nature cell biology*, 22(6), 716-727.
- Hurgin, V., Novick, D., Werman, A., Dinarello, C. A., & Rubinstein, M. (2007). Antiviral and immunoregulatory activities of IFN- γ depend on constitutively expressed IL-1 α . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(12), 5044-5049.
- Hurtado-Navarro, L., Baroja-Mazo, A., Martínez-Banaclocha, H., & Pelegrín, P. (2022). Assessment of ASC oligomerization by flow cytometry. *The Inflammasome: Methods and Protocols* (pp. 1-9). Springer.
- Hwangbo, H., Ji, S. Y., Kim, M. Y., Kim, S. Y., Lee, H., Kim, G.-Y., Kim, S., Cheong, J., & Choi, Y. H. (2021). Anti-inflammatory effect of auranofin on palmitic acid and LPS-induced inflammatory response by modulating TLR4 and NOX4-mediated NF- κ B signaling pathway in RAW264. 7 macrophages. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5920.
- Isobe, Y., Kato, T., & Arita, M. (2012). Emerging roles of eosinophils and eosinophil-derived lipid mediators in the resolution of inflammation. *Frontiers in immunology*, 3, 270.
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, 327(5963), 291-295.
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology*, 16(4), 343-353.
- Janeway, C. A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 54, 1-13.
- Janeway Jr, C. A. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunology today*, 13(1), 11-16.
- Janeway Jr, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology*, 20(1), 197-216.
- Jiang, H., He, H., Chen, Y., Huang, W., Cheng, J., Ye, J., Wang, A., Tao, J., Wang, C., Liu, Q., *et al.* (2017). Identification of a selective and direct NLRP3 inhibitor to treat inflammatory disorders. *Journal of Experimental Medicine*, 214(11), 3219-3238.
- Jiang, H., Shi, H., Sun, M., Wang, Y., Meng, Q., Guo, P., Cao, Y., Chen, J., Gao, X., Li, E., *et al.* (2016). PFKFB3-driven macrophage glycolytic metabolism is a crucial component of innate antiviral defense. *The Journal of Immunology*, 197(7), 2880-2890.
- Juliana, C., Fernandes-Alnemri, T., Kang, S., Farias, A., Qin, F., & Alnemri, E. S. (2012). Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3

REFERENCIAS

- inflammasome activation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(43), 36617-36622.
- Juliana, C., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Datta, P., Solorzano, L., Yu, J.-W., Meng, R., Quong, A. A., Latz, E., Scott, C. P., *et al.* (2010). Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. *Journal of Biological Chemistry*, 285(13), 9792-9802.
- Jurica, M. S., Mesecar, A., Heath, P. J., Shi, W., Nowak, T., & Stoddard, B. L. (1998). The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1, 6-bisphosphate. *Structure*, 6(2), 195-210.
- Kanneganti, T.-D. (2010). Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nature Reviews Immunology*, 10(10), 688-698.
- Kayagaki, N., Kornfeld, O. S., Lee, B. L., Stowe, I. B., O'Rourke, K., Li, Q., Sandoval, W., Yan, D., Kang, J., Xu, M., *et al.* (2021). NINJ1 mediates plasma membrane rupture during lytic cell death. *Nature*, 591(7848), 131-136.
- Kayagaki, N., Stowe, I. B., Lee, B. L., O'Rourke, K., Anderson, K., Warming, S., Cuellar, T., Haley, B., Roose-Girma, M., Phung, Q. T., *et al.* (2015). Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*, 526(7575), 666-671.
- Kayagaki, N., Wong, M. T., Stowe, I. B., Ramani, S. R., Gonzalez, L. C., Akashi-Takamura, S., Miyake, K., Zhang, J., Lee, W. P., Muszyński, A., *et al.* (2013). Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science*, 341(6151), 1246-1249.
- Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., & He, Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation. *International journal of molecular sciences*, 20(13), 3328.
- Kierans, S. J., & Taylor, C. T. (2021). Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *The Journal of physiology*, 599(1), 23-37.
- Kobayashi, E. H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Hayashi, M., Sekine, H., Tanaka, N., Moriguchi, T., Motohashi, H., Nakayama, K., *et al.* (2016). Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nature communications* 2016 7:1, 7(1), 1-14.
- Kobayashi, T., Kouzaki, H., & Kita, H. (2010). Human eosinophils recognize endogenous danger signal crystalline uric acid and produce proinflammatory cytokines mediated by autocrine ATP. *The Journal of Immunology*, 184(11), 6350-6358.
- Komander, D., & Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annual review of biochemistry*, 81, 203-229.
- Körver-Keularts, I. M. L. W., Wang, P., Waterval, H. W. A. H., Kluijtmans, L. A. J., Wevers, R. A., Langhans, C., Scott, C., Habets, D. D. J., & Bierau, J. (2018). Fast and accurate quantitative organic acid analysis with LC-QTOF/MS facilitates screening of patients for inborn errors of metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 41(3), 415-424.

REFERENCIAS

- Krumm, B., Meng, X., Li, Y., Xiang, Y., & Deng, J. (2008). Structural basis for antagonism of human interleukin 18 by poxvirus interleukin 18-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 20711-20715.
- Kurt-Jones, E. A., Beller, D. I., Mizel, S. B., & Unanue, E. R. (1985). Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(4), 1204-1208.
- Lampropoulou, V., Sergushichev, A., Bambouskova, M., Nair, S., Vincent, E. E., Loginicheva, E., Cervantes-Barragan, L., Ma, X., Huang, S. C.-C., Griss, T., *et al.* (2016). Itaconate links inhibition of succinate dehydrogenase with macrophage metabolic remodeling and regulation of inflammation. *Cell metabolism*, 24(1), 158-166.
- Latz, E., Xiao, T. S., & Stutz, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews Immunology*, 13(6), 397-411.
- Levy, B. D., Clish, C. B., Schmidt, B., Gronert, K., & Serhan, C. N. (2001). Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nature immunology*, 2(7), 612-619.
- Li, D., & Wu, M. (2021). Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 291.
- Liao, S.-T., Han, C., Xu, D.-Q., Fu, X.-W., Wang, J.-S., & Kong, L.-Y. (2019). 4-Octyl itaconate inhibits aerobic glycolysis by targeting GAPDH to exert anti-inflammatory effects. *Nature communications*, 10(1), 5091.
- Liston, A., & Masters, S. L. (2017). Homeostasis-altering molecular processes as mechanisms of inflammasome activation. *Nature Reviews Immunology*, 17(3), 208-214.
- Littlewood-Evans, A., Sarret, S., Apfel, V., Loesle, P., Dawson, J., Zhang, J., Muller, A., Tigani, B., Kneuer, R., Patel, S., *et al.* (2016). GPR91 senses extracellular succinate released from inflammatory macrophages and exacerbates rheumatoid arthritis. *Journal of Experimental Medicine*, 213(9), 1655-1662.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S.-C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, 2(1), 1-9.
- Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V. G., Wu, H., & Lieberman, J. (2016). Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*, 535(7610), 153-158.
- Loo, Y.-M., & Gale, M. (2011). Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity*, 34(5), 680-692.
- Makita, N., Hizukuri, Y., Yamashiro, K., Murakawa, M., & Hayashi, Y. (2015). IL-10 enhances the phenotype of M2 macrophages induced by IL-4 and confers the ability to increase eosinophil migration. *International immunology*, 27(3), 131-141.
- Mangan, M. S. J., Olhava, E. J., Roush, W. R., Seidel, H. M., Glick, G. D., & Latz, E. (2018). Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nature reviews Drug discovery*, 17(8), 588-606.

REFERENCIAS

- Mantovani, A., Dinarello, C. A., Molgora, M., & Garlanda, C. (2019). Interleukin-1 and related cytokines in the regulation of inflammation and immunity. *Immunity*, *50*(4), 778-795.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*, *25*(12), 677-686.
- Marchetti, C., Swartzwelter, B., Gamboni, F., Neff, C. P., Richter, K., Azam, T., Carta, S., Tengesdal, I., Nemkov, T., D'Alessandro, A. *et al.* (2018). OLT1177, a β -sulfonyl nitrile compound, safe in humans, inhibits the NLRP3 inflammasome and reverses the metabolic cost of inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(7), E1530-E1539.
- Marchetti, C., Swartzwelter, B., Koenders, M. I., Azam, T., Tengesdal, I. W., Powers, N., de Graaf, D. M., Dinarello, C. A., & Joosten, L. A. B. (2018). NLRP3 inflammasome inhibitor OLT1177 suppresses joint inflammation in murine models of acute arthritis. *Arthritis research & therapy*, *20*(1), 1-11.
- Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D. M., Vucic, D., French, D. M., Lee, W. P., Roose-Girma, M., Erickson, S., & Dixit, V. M. (2004). Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*, *430*(6996), 213-218.
- Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, *14*(2), 1-10.
- Martinez-Espinosa, I., Serrato, J. A., & Ortiz-Quintero, B. (2021). Role of IL-10-producing natural killer cells in the regulatory mechanisms of inflammation during systemic infection. *Biomolecules*, *12*(1), 4.
- Martinon, F., Burns, K., & Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Molecular cell*, *10*(2), 417-426.
- Martinon, F., Pétrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., & Tschopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, *440*(7081), 237-241.
- Martín-Sánchez, F., Compan, V., & Pelegrín, P. (2016). Measuring NLR oligomerization III: detection of NLRP3 complex by bioluminescence resonance energy transfer. *NLR Proteins: Methods and Protocols*, 159-168.
- Masters, S. L., Lagou, V., Jéru, I., Baker, P. J., Van Eyck, L., Parry, D. A., Lawless, D., De Nardo, D., Garcia-Perez, J. E., Dagley, L. F., *et al.* (2016). Familial autoinflammation with neutrophilic dermatosis reveals a regulatory mechanism of pyrin activation. *Science translational medicine*, *8*(332), 332ra45-332ra45.
- Maurer, J., Hoene, M., & Weigert, C. (2021). Signals from the circle: Tricarboxylic acid cycle intermediates as myometabokines. *Metabolites*, *11*(8), 474.
- Millet, P., Vachharajani, V., McPhail, L., Yoza, B., & McCall, C. E. (2016). GAPDH binding to TNF- α mRNA contributes to posttranscriptional repression in monocytes: a novel mechanism of communication between inflammation and metabolism. *The Journal of Immunology*, *196*(6), 2541-2551.

REFERENCIAS

- Mills, E. L., Ryan, D. G., Prag, H. A., Dikovskaya, D., Menon, D., Zaslon, Z., Jedrychowski, M. P., Costa, A. S. H., Higgins, M., Hams, E., *et al.* (2018). Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1. *Nature*, 556(7699), 113-117.
- Mortimer, L., Moreau, F., MacDonald, J. A., & Chadee, K. (2016). NLRP3 inflammasome inhibition is disrupted in a group of auto-inflammatory disease CAPS mutations. *Nature immunology*, 17(10), 1176-1186.
- Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K., & Modolell, M. (1998). Murine macrophages secrete interferon γ upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: a novel pathway of autocrine macrophage activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 187(12), 2103-2108.
- Muñoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martínez-Colón, G., Smith, B. L., Rajendiran, T. M., & Núñez, G. (2013). K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*, 38(6), 1142-1153.
- Murphy, K., & Weaver, C. (2016). *Janeway's immunobiology*. Garland science.
- Muzio, M., Ni, J., Feng, P., & Dixit, V. M. (1997). IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*, 278(5343), 1612-1615.
- Nadif, R., Zerimech, F., Bouzigon, E., & Matran, R. (2013). The role of eosinophils and basophils in allergic diseases considering genetic findings. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 13(5), 507-513.
- Netea, M. G., Balkwill, F., Chonchol, M., Cominelli, F., Donath, M. Y., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Golenbock, D., Gresnigt, M. S., Heneka, M. T., Hoffman, H., *et al.* (2017). A guiding map for inflammation. *Nature immunology*, 18(8), 826-831.
- Netea, M. G., Domínguez-Andrés, J., Barreiro, L. B., Chavakis, T., Divangahi, M., Fuchs, E., Joosten, L. A. B., van der Meer, J. W. M., Mhlanga, M. M., Mulder, *et al.* (2020). Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 20(6), 375-388.
- Niu, T., De Rosny, C., Chautard, S., Rey, A., Patoli, D., Gros Lambert, M., Cosson, C., Lagrange, B., Zhang, Z., Visvikis, O., *et al.* (2021). NLRP3 phosphorylation in its LRR domain critically regulates inflammasome assembly. *Nature communications*, 12(1), 5862.
- Novick, D., Elbirt, D., Miller, G., Dinarello, C. A., Rubinstein, M., & Stoeberl, Z. M. (2010). High circulating levels of free interleukin-18 in patients with active SLE in the presence of elevated levels of interleukin-18 binding protein. *Journal of autoimmunity*, 34(2), 121-126.
- Novick, D., Kim, S.-H., Fantuzzi, G., Reznikov, L. L., Dinarello, C. A., & Rubinstein, M. (1999). Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity*, 10(1), 127-136.
- Ochoa, M. C., Minute, L., Rodríguez, I., Garasa, S., Pérez-Ruiz, E., Inogés, S., Melero, I., & Berraondo, P. (2017). Antibody-dependent cell cytotoxicity:

REFERENCIAS

- immunotherapy strategies enhancing effector NK cells. *Immunology and cell biology*, 95(4), 347-355.
- Omoto, Y., Tokime, K., Yamanaka, K., Habe, K., Morioka, T., Kurokawa, I., Tsutsui, H., Yamanishi, K., Nakanishi, K., & Mizutani, H. (2006). Human mast cell chymase cleaves pro-IL-18 and generates a novel and biologically active IL-18 fragment. *The Journal of Immunology*, 177(12), 8315-8319.
- Omoto, Y., Yamanaka, K., Tokime, K., Kitano, S., Kakeda, M., Akeda, T., Kurokawa, I., Gabazza, E. C., Tsutsui, H., Katayama, N., *et al.* (2010). Granzyme B is a novel interleukin-18 converting enzyme. *Journal of dermatological science*, 59(2), 129-135.
- Onomoto, K., Onoguchi, K., & Yoneyama, M. (2021). Regulation of RIG-I-like receptor-mediated signaling: interaction between host and viral factors. *Cellular & molecular immunology*, 18(3), 539-555.
- Oronsky, B., Caroën, S., & Reid, T. (2022). What Exactly Is Inflammation (and What Is It Not?). *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 14905.
- O'Shea, J. J., Gadina, M., & Siegel, R. M. (2019). Cytokines and cytokine receptors. *Clinical immunology* (pp. 127-155). Elsevier.
- Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T., & Seya, T. (2003). TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon- β induction. *Nature immunology*, 4(2), 161-167.
- Palazón-Riquelme, P., Worboys, J. D., Green, J., Valera, A., Martín-Sánchez, F., Pellegrini, C., Brough, D., & López-Castejón, G. (2018). USP7 and USP47 deubiquitinases regulate NLRP3 inflammasome activation. *EMBO reports*, 19(10), e44766.
- Palsson-McDermott, E. M., Curtis, A. M., Goel, G., Lauterbach, M. A. R., Sheedy, F. J., Gleeson, L. E., van den Bosch, M. W. M., Quinn, S. R., Domingo-Fernandez, R., Johnston, D. G. W., *et al.* (2015). Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1 α activity and IL-1 β induction and is a critical determinant of the Warburg effect in LPS-activated macrophages. *Cell Metabolism*, 21(1), 65-80.
- Pandey, A., Shen, C., Feng, S., & Man, S. M. (2021). Cell biology of inflammasome activation. *Trends in cell biology*, 31(11), 924-939.
- Pascual, M., Calvo-Rodriguez, M., Núñez, L., Villalobos, C., Ureña, J., & Guerri, C. (2021). Toll-like receptors in neuroinflammation, neurodegeneration, and alcohol-induced brain damage. *IUBMB life*, 73(7), 900-915.
- Passlick, B., Flieger, D., & Ziegler-Heitbrock, H. W. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*, 74(7), 2527-2534.
- Pelegriñ, P., & Surprenant, A. (2009). Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1 β release through pyrophosphates. *The EMBO journal*, 28(14), 2114-2127.
- Peng, Z., Li, X., Xing, D., Du, X., Wang, Z., Liu, G., & Li, X. (2018). Nobiletin alleviates palmitic acid-induced NLRP3 inflammasome activation in a sirtuin

REFERENCIAS

- 1-dependent manner in AML-12 cells. *Molecular Medicine Reports*, 18(6), 5815-5822.
- Perregaux, D. G., McNiff, P., Laliberte, R., Hawryluk, N., Peurano, H., Stam, E., Egger, J., Griffiths, R., Dombroski, M. A., & Gabel, C. A. (2001). Identification and characterization of a novel class of interleukin-1 post-translational processing inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299(1), 187-197.
- Petrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., & Tschopp, J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death & Differentiation*, 14(9), 1583-1589.
- Pflug, K. M., & Sitcheran, R. (2020). Targeting NF- κ B-inducing kinase (NIK) in immunity, inflammation, and cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8470.
- Pichler, A., Fatouros, C., Lee, H., & Eisenhardt, N. (2017). SUMO conjugation—a mechanistic view. *Biomolecular concepts*, 8(1), 13-36.
- Poli, V., & Zanoni, I. (2023). Neutrophil intrinsic and extrinsic regulation of NETosis in health and disease. *Trends in Microbiology*, 31(3), 280-293.
- Prieur, A.-M., Griscelli, C., Kaufmann, M.-T., & Dayer, J.-M. (1987). Specific interleukin-1 inhibitor in serum and urine of children with systemic juvenile chronic arthritis. *The Lancet*, 330(8570), 1240-1242.
- Py, B. F., Kim, M.-S., Vakifahmetoglu-Norberg, H., & Yuan, J. (2013). Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. *Molecular Cell*, 49(2), 331-338.
- Qiao, Y., Wang, P., Qi, J., Zhang, L., & Gao, C. (2012). TLR-induced NF- κ B activation regulates NLRP3 expression in murine macrophages. *FEBS letters*, 586(7), 1022-1026.
- Qin, W., Qin, K. E., Zhang, Y., Jia, W., Chen, Y., Cheng, B. O., Peng, L., Chen, N., Liu, Y., Zhou, W., *et al.* (2019). S-glycosylation-based cysteine profiling reveals regulation of glycolysis by itaconate. *Nature chemical biology*, 15(10), 983-991.
- Qin, Y., Li, Q., Liang, W., Yan, R., Tong, L., Jia, M., Zhao, C., & Zhao, W. (2021). TRIM28 SUMOylates and stabilizes NLRP3 to facilitate inflammasome activation. *Nature communications*, 12(1), 4794.
- Radian, A. D., Khare, S., Chu, L. H., Dorfleutner, A., & Stehlik, C. (2015). ATP binding by NLRP7 is required for inflammasome activation in response to bacterial lipopeptides. *Molecular immunology*, 67(2), 294-302.
- Ramachandran, A., Kumar, B., Waris, G., & Everly, D. (2021). Deubiquitination and Activation of the NLRP3 Inflammasome by UCHL5 in HCV-Infected Cells. *Microbiology Spectrum*, 9(1), 10-1128.
- Ramsey, N., Kazmi, W., Phelan, M., Lozano-Ojalvo, D., & Berin, M. C. (2023). JAK1 inhibition with abrocitinib decreases allergen-specific basophil and T-cell activation in pediatric peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: Global*, 2(3), 100103.

REFERENCIAS

- Rayamajhi, M., Zak, D. E., Chavarria-Smith, J., Vance, R. E., & Miao, E. A. (2013). Cutting edge: Mouse NAIP1 detects the type III secretion system needle protein. *The Journal of Immunology*, 191(8), 3986-3989.
- Rehwinkel, J., & Gack, M. U. (2020). RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nature Reviews Immunology*, 20(9), 537-551.
- Ren, G., Zhang, X., Xiao, Y., Zhang, W., Wang, Y., Ma, W., Wang, X., Song, P., Lai, L., Chen, H., *et al.* (2019). ABRO1 promotes NLRP3 inflammasome activation through regulation of NLRP3 deubiquitination. *The EMBO journal*, 38(6), e100376.
- Rider, P., Carmi, Y., Guttman, O., Braiman, A., Cohen, I., Voronov, E., White, M. R., Dinarello, C. A., & Apte, R. N. (2011). IL-1 α and IL-1 β recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *The Journal of Immunology*, 187(9), 4835-4843.
- Ross, C., Chan, A. H., von Pein, J. B., Maddugoda, M. P., Boucher, D., & Schroder, K. (2022). Inflammatory caspases: toward a unified model for caspase activation by inflammasomes. *Annual review of immunology*, 40, 249-269.
- Rühl, S., Shkarina, K., Demarco, B., Heilig, R., Santos, J. C., & Broz, P. (2018). ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. *Science*, 362(6417), 956-960.
- Rynne, M., Maclean, C., Bybee, A., McDermott, M. F., & Emery, P. (2006). Hearing improvement in a patient with variant Muckle-Wells syndrome in response to interleukin 1 receptor antagonism. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 65(4), 533-534.
- Saeed, S., Quintin, J., Kerstens, H. H. D., Rao, N. A., Aghajani-refah, A., Matarese, F., Cheng, S.-C., Ratter, J., Berentsen, K., van der Ent, M. A., *et al.* (2014). Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*, 345(6204), 1251086.
- Saeedi-Boroujeni, A., Mahmoudian-Sani, M.-R., Nashibi, R., Houshmandfar, S., Tahmaseby Gandomkari, S., & Khodadadi, A. (2021). Tranilast: a potential anti-inflammatory and NLRP3 inflammasome inhibitor drug for COVID-19. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 43(3), 247-258.
- Saijo, S., Fujikado, N., Furuta, T., Chung, S., Kotaki, H., Seki, K., Sudo, K., Akira, S., Adachi, Y., Ohno, N., *et al.* (2007). Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nature immunology*, 8(1), 39-46.
- Saijo, S., Ikeda, S., Yamabe, K., Kakuta, S., Ishigame, H., Akitsu, A., Fujikado, N., Kusaka, T., Kubo, S., Chung, S., *et al.* (2010). Dectin-2 recognition of α -mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity*, 32(5), 681-691.
- Sancho, D., & Reis e Sousa, C. (2012). Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Annual review of immunology*, 30, 491-529.
- Sattler, S. (2017). The role of the immune system beyond the fight against infection. *The immunology of cardiovascular homeostasis and pathology*, 3-14.

REFERENCIAS

- Sborgi, L., Ravotti, F., Dandey, V. P., Dick, M. S., Mazur, A., Reckel, S., Chami, M., Scherer, S., Huber, M., Böckmann, A., *et al.* (2015). Structure and assembly of the mouse ASC inflammasome by combined NMR spectroscopy and cryo-electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(43), 13237-13242.
- Sborgi, L., Rühl, S., Mulvihill, E., Pipercevic, J., Heilig, R., Stahlberg, H., Farady, C. J., Müller, D. J., Broz, P., & Hiller, S. (2016). GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *The EMBO journal*, *35*(16), 1766-1778.
- Schmacke, N. A., O'Duill, F., Gaidt, M. M., Szymanska, I., Kamper, J. M., Schmid-Burgk, J. L., Mädler, S. C., Mackens-Kiani, T., Kozaki, T., Chauhan, D., *et al.* (2022). IKK β primes inflammasome formation by recruiting NLRP3 to the trans-Golgi network. *Immunity*, *55*(12), 2271-2284.
- Schnappauf, O., Chae, J. J., Kastner, D. L., & Aksentijevich, I. (2019). The pyrin inflammasome in health and disease. *Frontiers in immunology*, *10*, 1745.
- Segura, E., & Amigorena, S. (2013). Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends in immunology*, *34*(9), 440-445.
- Serhan, C. N., Brain, S. D., Buckley, C. D., Gilroy, D. W., Haslett, C., O'Neill, L. A. J., Perretti, M., Rossi, A. G., & Wallace, J. L. (2007). Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *The FASEB journal*, *21*(2), 325.
- Serhan, C. N., & Levy, B. D. (2018). Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *The Journal of Clinical Investigation*, *128*(7), 2657-2669.
- Shen, C., Li, R., Negro, R., Cheng, J., Vora, S. M., Fu, T.-M., Wang, A., He, K., Andreeva, L., Gao, P., *et al.* (2021). Phase separation drives RNA virus-induced activation of the NLRP6 inflammasome. *Cell*, *184*(23), 5759-5774.
- Sherman, B. T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M. W., Lane, H. C., Imamichi, T., & Chang, W. (2022). DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic acids research*, *50*(W1), W216-W221.
- Shi, H., Wang, Y., Li, X., Zhan, X., Tang, M., Fina, M., Su, L., Pratt, D., Bu, C. H., Hildebrand, S., *et al.* (2016). NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. *Nature immunology*, *17*(3), 250-258.
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F., & Shao, F. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, *526*(7575), 660-665.
- Shi, Y., Lv, Q., Zheng, M., Sun, H., & Shi, F. (2021). NLRP3 inflammasome inhibitor INF39 attenuated NLRP3 assembly in macrophages. *International Immunopharmacology*, *92*, 107358.
- Smeekens, S. P., Ng, A., Kumar, V., Johnson, M. D., Plantinga, T. S., Van Diemen, C., Arts, P., Verwiel, E. T. P., Gresnigt, M. S., Fransen, K., *et al.* (2013).

REFERENCIAS

- Functional genomics identifies type I interferon pathway as central for host defense against *Candida albicans*. *Nature communications*, 4(1), 1342.
- Smith, D. E., Hanna, R., Friend, D., Moore, H., Chen, H., Farese, A. M., MacVittie, T. J., Virca, G. D., & Sims, J. E. (2003). The soluble form of IL-1 receptor accessory protein enhances the ability of soluble type II IL-1 receptor to inhibit IL-1 action. *Immunity*, 18(1), 87-96.
- Song, H., Liu, B., Huai, W., Yu, Z., Wang, W., Zhao, J., Han, L., Jiang, G., Zhang, L., Gao, C., *et al.* (2016). The E3 ubiquitin ligase TRIM31 attenuates NLRP3 inflammasome activation by promoting proteasomal degradation of NLRP3. *Nature communications*, 7(1), 13727.
- Song, N., & Li, T. (2018). Regulation of NLRP3 inflammasome by phosphorylation. *Frontiers in immunology*, 9, 2305.
- Song, N., Liu, Z.-S., Xue, W., Bai, Z.-F., Wang, Q.-Y., Dai, J., Liu, X., Huang, Y.-J., Cai, H., Zhan, X.-Y., *et al.* (2017). NLRP3 phosphorylation is an essential priming event for inflammasome activation. *Molecular Cell*, 68(1), 185-197.
- Spalinger, M. R., Kasper, S., Gottier, C., Lang, S., Atrott, K., Vavricka, S. R., Scharl, S., Gutte, P. M., Grütter, M. G., Beer, H.-D., *et al.* (2016). NLRP3 tyrosine phosphorylation is controlled by protein tyrosine phosphatase PTPN22. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(5), 1783-1800.
- Speakman, E. A., Dambuza, I. M., Salazar, F., & Brown, G. D. (2020). T cell antifungal immunity and the role of C-type lectin receptors. *Trends in immunology*, 41(1), 61-76.
- Stojanov, S., Lapidus, S., Chitkara, P., Feder, H., Salazar, J. C., Fleisher, T. A., Brown, M. R., Edwards, K. M., Ward, M. M., Colbert, R. A., *et al.* (2011). Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis (PFAPA) is a disorder of innate immunity and Th1 activation responsive to IL-1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(17), 7148-7153.
- Strandmark, J., Steinfeldt, S., Berek, C., Köhl, A. A., Rausch, S., & Hartmann, S. (2017). Eosinophils are required to suppress Th2 responses in Peyer's patches during intestinal infection by nematodes. *Mucosal Immunology*, 10(3), 661-672.
- Stutz, A., Kolbe, C.-C., Stahl, R., Horvath, G. L., Franklin, B. S., van Ray, O., Brinkschulte, R., Geyer, M., Meissner, F., & Latz, E. (2017). NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain. *Journal of Experimental Medicine*, 214(6), 1725-1736.
- Sugawara, S., Uehara, A., Nochi, T., Yamaguchi, T., Ueda, H., Sugiyama, A., Hanzawa, K., Kumagai, K., Okamura, H., & Takada, H. (2001). Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. *The Journal of Immunology*, 167(11), 6568-6575.
- Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., Beger, R., Daykin, C. A., Fan, T. W.-M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J. L., *et al.* (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: chemical analysis working group (CAWG) metabolomics standards initiative (MSI). *Metabolomics*, 3, 211-221.

REFERENCIAS

- Swain, A., Bambouskova, M., Kim, H., Andhey, P. S., Duncan, D., Auclair, K., Chubukov, V., Simons, D. M., Roddy, T. P., Stewart, K. M., *et al.* (2020). Comparative evaluation of itaconate and its derivatives reveals divergent inflammasome and type I interferon regulation in macrophages. *Nature metabolism*, 2(7), 594-602.
- Swanson, J. A., & Watts, C. (1995). Macropinocytosis. *Trends in cell biology*, 5(11), 424-428.
- Swanson, K. V., Deng, M., & Ting, J. P.-Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews Immunology*, 19(8), 477-489.
- Takahashi, T., Ellingson, M. K., Wong, P., Israelow, B., Lucas, C., Klein, J., Silva, J., Mao, T., Oh, J. E., Tokuyama, M., *et al.* (2020). Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature*, 588(7837), 315-320.
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805-820.
- Tannahill, G. M., Curtis, A. M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E. M., McGettrick, A. F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N. J., Kelly, B., Foley, N. H., *et al.* (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature*, 496(7444), 238-242.
- Tapia-Abellán, A., Angosto-Bazarra, D., Alarcón-Vila, C., Baños, M. C., Hafner-Bratkovič, I., Oliva, B., & Pelegrín, P. (2021). Sensing low intracellular potassium by NLRP3 results in a stable open structure that promotes inflammasome activation. *Science advances*, 7(38), eabf4468.
- Tapia-Abellán, A., Angosto-Bazarra, D., Martínez-Banaclocha, H., de Torre-Minguela, C., Cerón-Carrasco, J. P., Pérez-Sánchez, H., Arostegui, J. I., & Pelegrin, P. (2019). MCC950 closes the active conformation of NLRP3 to an inactive state. *Nature chemical biology*, 15(6), 560-564.
- TeSlaa, T., Ralser, M., Fan, J., & Rabinowitz, J. D. (2023). The pentose phosphate pathway in health and disease. *Nature metabolism*, 5(8), 1275-1289.
- Theoharides, T. C., Alysandratos, K.-D., Angelidou, A., Delivanis, D.-A., Sismanopoulos, N., Zhang, B., Asadi, S., Vasiadi, M., Weng, Z., Miniati, A., *et al.* (2012). Mast cells and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(1), 21-33.
- Thomas, C. A., Li, Y., Kodama, T., Suzuki, H., Silverstein, S. C., & El Khoury, J. (2000). Protection from lethal Gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 191(1), 147-156.
- Towne, J. E., Renshaw, B. R., Douangpanya, J., Lipsky, B. P., Shen, M., Gabel, C. A., & Sims, J. E. (2011). Interleukin-36 (IL-36) ligands require processing for full agonist (IL-36 α , IL-36 β , and IL-36 γ) or antagonist (IL-36Ra) activity. *Journal of Biological Chemistry*, 286(49), 42594-42602.

REFERENCIAS

- Tsuchiya, K., Hosojima, S., Hara, H., Kushiyama, H., Mahib, M. R., Kinoshita, T., & Suda, T. (2021). Gasdermin D mediates the maturation and release of IL-1 α downstream of inflammasomes. *Cell Reports*, *34*(12).
- Turvey, S. E., & Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2), S24-S32.
- Vaira, S., Johnson, T., Hirbe, A. C., Alhawagri, M., Anwisyte, I., Sammut, B., O'Neal, J., Zou, W., Weilbaecher, K. N., Faccio, R., & Veis Novack, D. (2008). RelB is the NF- κ B subunit downstream of NIK responsible for osteoclast differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(10), 3897-3902.
- Van den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C. J., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K., & Van der Werf, M. J. (2006). Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC genomics*, *7*, 1-15.
- Van den Bossche, J., O'Neill, L. A., & Menon, D. (2017). Macrophage immunometabolism: where are we (going)? *Trends in immunology*, *38*(6), 395-406.
- Van Opdenbosch, N., & Lamkanfi, M. (2019). Caspases in cell death, inflammation, and disease. *Immunity*, *50*(6), 1352-1364.
- Verstak, B., Nagpal, K., Bottomley, S. P., Golenbock, D. T., Hertzog, P. J., & Mansell, A. (2009). MyD88 adapter-like (Mal)/TIRAP interaction with TRAF6 is critical for TLR2-and TLR4-mediated NF- κ B proinflammatory responses. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(36), 24192-24203.
- Viganò, E., Diamond, C. E., Spreafico, R., Balachander, A., Sobota, R. M., & Mortellaro, A. (2015). Human caspase-4 and caspase-5 regulate the one-step non-canonical inflammasome activation in monocytes. *Nature communications*, *6*(1), 8761.
- Villalba, E. N., de la Fuente, E. G., Gutierrez, D. C., Moraleta, F. P., Rodilla, J. Y., Angulo, D. M., & Estebarez, J. L. L. (2016). Muckle-Wells syndrome: a case report with an NLRP3 T348M mutation. *Pediatric Dermatology*, *33*(5), e311-e314.
- Wan, P., Zhang, Q., Liu, W., Jia, Y., Ai, S., Wang, T., Wang, W., Pan, P., Yang, G., Xiang, Q., *et al.* (2019). Cullin1 binds and promotes NLRP3 ubiquitination to repress systematic inflammasome activation. *The FASEB Journal*, *33*(4), 5793-5807.
- Wang, D., Zhang, S., Li, L., Liu, X., Mei, K., & Wang, X. (2010). Structural insights into the assembly and activation of IL-1 β with its receptors. *Nature immunology*, *11*(10), 905-911.
- Wang, K., Sun, Q. I., Zhong, X., Zeng, M., Zeng, H., Shi, X., Li, Z., Wang, Y., Zhao, Q., Shao, F., *et al.* (2020). Structural mechanism for GSDMD targeting by autoprocessed caspases in pyroptosis. *Cell*, *180*(5), 941-955.
- Wang, P., Zhu, S., Yang, L., Cui, S., Pan, W., Jackson, R., Zheng, Y., Rongvaux, A., Sun, Q., Yang, G., *et al.* (2015). Nlrp6 regulates intestinal antiviral innate immunity. *Science*, *350*(6262), 826-830.

REFERENCIAS

- Wculek, S. K., Dunphy, G., Heras-Murillo, I., Mastrangelo, A., & Sancho, D. (2022). Metabolism of tissue macrophages in homeostasis and pathology. *Cellular & molecular immunology*, 19(3), 384-408.
- Weber, A. N. R., Tapia-Abellán, A., Liu, X., Dickhöfer, S., Aróstegui, J. I., Pelegrín, P., Welzel, T., & Kuemmerle-Deschner, J. B. (2022). Effective ex vivo inhibition of cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS)-associated mutant NLRP3 inflammasome by MCC950/CRID3. *Rheumatology*, 61(10), e299-e313.
- Wu, C.-J., Conze, D. B., Li, T., Srinivasula, S. M., & Ashwell, J. D. (2006). Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF- κ B activation. *Nature cell biology*, 8(4), 398-406.
- Wu, D., Molofsky, A. B., Liang, H.-E., Ricardo-Gonzalez, R. R., Jouihan, H. A., Bando, J. K., Chawla, A., & Locksley, R. M. (2011). Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science*, 332(6026), 243-247.
- Wu, R., Chen, F., Wang, N., Tang, D., & Kang, R. (2020). ACOD1 in immunometabolism and disease. *Cellular & molecular immunology*, 17(8), 822-833.
- Wüthrich, M., Deepe Jr, G. S., & Klein, B. (2012). Adaptive immunity to fungi. *Annual review of immunology*, 30, 115-148.
- Xia, X., Cui, J., Wang, H. Y., Zhu, L., Matsueda, S., Wang, Q., Yang, X., Hong, J., Songyang, Z., Chen, Z. J., *et al.* (2011). NLRX1 negatively regulates TLR-induced NF- κ B signaling by targeting TRAF6 and IKK. *Immunity*, 34(6), 843-853.
- Xiao, L., Magupalli, V. G., & Wu, H. (2023). Cryo-EM structures of the active NLRP3 inflammasome disc. *Nature*, 613(7944), 595-600.
- Xie, M., Yu, Y., Kang, R., Zhu, S., Yang, L., Zeng, L., Sun, X., Yang, M., Billiar, T. R., Wang, H., *et al.* (2016). PKM2-dependent glycolysis promotes NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. *Nature communications*, 7(1), 13280.
- Xu, H., Yang, J., Gao, W., Li, L., Li, P., Zhang, L., Gong, Y.-N., Peng, X., Xi, J. J., Chen, S., *et al.* (2014). Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. *Nature*, 513(7517), 237-241.
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., & Akira, S. (2002). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- β promoter in the Toll-like receptor signaling. *The Journal of Immunology*, 169(12), 6668-6672.
- Yang, X., Yang, F., Wang, W., Lin, G., Hu, Z., Han, Z., Qi, Y., Zhang, L., Wang, J., Sui, S.-F., *et al.* (2018). Structural basis for specific flagellin recognition by the NLR protein NAIP5. *Cell research*, 28(1), 35-47.
- Yang, Y., Wang, H., Kouadir, M., Song, H., & Shi, F. (2019). Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell death & disease*, 10(2), 128.
- Yeretssian, G., Labbé, K., & Saleh, M. (2008). Molecular regulation of inflammation and cell death. *Cytokine*, 43(3), 380-390.

REFERENCIAS

- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.-M., Gale, M., Akira, S., *et al.* (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *The Journal of Immunology*, 175(5), 2851-2858.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., & Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature immunology*, 5(7), 730-737.
- Yoshimoto, T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K., Kashiwamura, S., Okamura, H., Akira, S., & Nakanishi, K. (1998). IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN- γ production. *The Journal of Immunology*, 161(7), 3400-3407.
- Yoshimoto, T., Tsutsui, H., Tominaga, K., Hoshino, K., Okamura, H., Akira, S., Paul, W. E., & Nakanishi, K. (1999). IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 13962-13966.
- Zangiabadi, S., & Abdul-Sater, A. A. (2022). Regulation of the NLRP3 inflammasome by posttranslational modifications. *The Journal of Immunology*, 208(2), 286-292.
- Zanoni, I., Tan, Y., Di Gioia, M., Broggi, A., Ruan, J., Shi, J., Donado, C. A., Shao, F., Wu, H., Springstead, J. R., *et al.* (2016). An endogenous caspase-11 ligand elicits interleukin-1 release from living dendritic cells. *Science*, 352(6290), 1232-1236.
- Zhang, Y., Lin, Z., Chen, D., & He, Y. (2021). CY-09 attenuates the progression of osteoarthritis via inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 553, 119-125.
- Zhang, Z., Meszaros, G., He, W., Xu, Y., de Fatima Magliarelli, H., Mailly, L., Mihlan, M., Liu, Y., Puig Gámez, M., Goginashvili, A., *et al.* (2017). Protein kinase D at the Golgi controls NLRP3 inflammasome activation. *Journal of Experimental Medicine*, 214(9), 2671-2693.
- Zhao, G., Zhang, T., Ma, X., Jiang, K., Wu, H., Qiu, C., Guo, M., & Deng, G. (2017). Oridonin attenuates the release of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-induced RAW264. 7 cells and acute lung injury. *Oncotarget*, 8(40), 68153.
- Zhao, H., Wu, L., Yan, G., Chen, Y., Zhou, M., Wu, Y., & Li, Y. (2021). Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 263.
- Zhao, Y., Yang, J., Shi, J., Gong, Y.-N., Lu, Q., Xu, H., Liu, L., & Shao, F. (2011). The NLR4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature*, 477(7366), 596-600.
- Zheng, Y., Humphry, M., Maguire, J. J., Bennett, M. R., & Clarke, M. C. H. (2013). Intracellular interleukin-1 receptor 2 binding prevents cleavage and activity of interleukin-1 α , controlling necrosis-induced sterile inflammation. *Immunity*, 38(2), 285-295.

REFERENCIAS

Zhou, Y., Wang, W., Zhong, L., Wang, L., Ma, M., Tang, X., Li, Z., Wang, C., Gou, L., Zhang, T., *et al.* (2022). Clinical and genetic spectrum of 14 cases of NLRP3-associated autoinflammatory disease (NLRP3-AID) in China and a review of the literature. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 17(1), 1-8.

RESUMEN EN INGLÉS

Introduction

The innate immune system is the body's first barrier of defense against infection or tissue damage, composed of a large and diverse number of cells including macrophages and monocytes. These cells contain pattern recognition receptors (PRRs) (Bauernfeind et al., 2009; Kawai & Akira, 2010) capable of recognizing a wide variety of exogenous or endogenous signals. A subfamily of these PRRs are the NOD-like receptors (NLRs), of which the intracellular receptor NLRP3 is noteworthy. It is capable of forming a multiprotein complex together with the proteins ASC and caspase-1, named inflammasome, which is highly relevant to the inflammatory response. NLRP3 is the most characterized inflammasome to date due to the wide variety of triggering signals and its involvement in the development of numerous pathologies, one of them being cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) (Dodé et al., 2002). This syndrome is a hereditary autoinflammatory disorder that results from the gain-of-function mutations in the *NLRP3* gene resulting in the autoactivation of the NLRP3 inflammasome and an overproduction of the proinflammatory cytokine IL-1 β . CAPS syndrome comprises 3 phenotypes depending on their severity, familial cold autoinflammatory syndrome (FCAS) is the mildest phenotype, Muckle-Wells syndrome (MWS) is the intermediate phenotype, and neonatal-onset multisystem inflammatory disease or chronic infantile neurologic cutaneous articular syndrome (NOMID/CINCA), which is the most severe phenotype (Booshehri & Hoffman, 2019; Cuisset et al., 2011). However, this syndrome is considered as a continuum and there is an overlapping of these three phenotypes. The canonical activation of the wild-type NLRP3 requires a priming signal that transcribes the protein itself and the cytokine IL-1 β , and a second signal that produces the activation of NLRP3 and the formation of the inflammasome. On the contrary, the pathogenic variants of NLRP3 which are associated with CAPS, a single signal is required, therefore this inflammasome being known as a hypersensitive inflammasome (Tapia-Abellán et al., 2019). Nevertheless, the activation and regulation mechanism of mutant NLRP3 is still poorly known. On the other hand, the study of the metabolism in relation to the immune system is a growing field of study. It has been described that metabolic pathways are involved in the progress of inflammation and anti-inflammatory responses (O'Neill et al., 2016). In fact, numerous studies show the relevance of the glycolysis for the correct development of inflammation (Palsson-McDermott et al., 2015; Xie et al., 2016), however, how the pathogenic variants of NLRP3 associated with CAPS can affect metabolism is not described. Another relevant autoinflammatory disease for this Thesis the Familial Mediterranean Fever (FMF), which is due to pathogenic variants in the

MEFV gene (which encodes the pyrin protein), producing an overactivation in the pyrin inflammasome, with the consequent release of IL-1 β .

Objectives

In this Thesis the following objectives have been proposed:

1. Determine and characterize the activation of the NLRP3 inflammasome with pathogenic variants associated with CAPS syndrome.
2. Study the effect of NF- κ B inducers on the activation of NLRP3 with pathogenic variants associated with CAPS.
3. Study the involvement of deubiquitinases in the activation of NLRP3 with variants associated with CAPS.
4. Elucidate the function of the NLRP3 inflammasome with CAPS-associated variants in the immunometabolism of myeloid cells.
5. Characterize the effect of 4-octylitaconate on the activation of the NLRP3 inflammasome with CAPS-associated variants.
6. Identify new NLRP3 inhibitors of the activation of NLRP3 with variants associated with CAPS syndrome.

Materials and methods

In this Thesis, *ex vivo* assays have been carried out on peripheral blood samples from healthy donors, patients with CAPS carrying different pathogenic variants of NLRP3 (p.A439T, p.T348M, p.R260W and p.D303N) in heterozygosity and samples from patients with FMF carrying the pathogenic variant p.M649I of *MEFV* in homozygosity. From these samples, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by centrifugation using Ficoll gradient. Once isolated, the cells were seeded in 24-well plates at a concentration of 5×10^5 cells/well and stimulated in the presence or absence of NF- κ B inducers (LPS, Pam3CSK₄, palmitate, S100A9 and IL-6), deubiquitinases inhibitors (G5 and b-AP15) or the specific NLRP3 inhibitor (MCC950) for 2, 3, 4 and 6h. After stimulation, the supernatants were collected and the release of galectin-3, TNF- α , IL-1 β , and IL-18 was measured by ELISA, in parallel the formation of ASC oligomers was measured by flow cytometry in monocytes.

In this study, *in vitro* assays have also been performed on immortalized *Nlrp3*^{-/-} mouse macrophages with a doxycycline-inducible system to express human wild-type NLRP3 or different pathogenic variants of NLRP3-associated with CAPS (p.R260W, p.T348M, and p. D303N), as a control, these macrophages were also transduced with an empty vector. These macrophages were stimulated in presence or absence of doxycycline at different concentrations and times to control the expression of NLRP3, in the presence or absence of NF- κ B inducers (LPS, Pam3CSK₄, palmitate, S100A9 and IL-6), deubiquitinase inhibitors (G5, PR-619 and b-AP15), hexokinase inhibitor 2-deoxy-D-glucose, 4-octylitaconate or pyruvate. These macrophages were used to determine

the activation of the mutant NLRP3 inflammasome, and for this purpose, numerous techniques were used: Western blot and ELISA for protein quantification, immunofluorescence for the quantification of cell with ASC oligomers, evaluation of real-time metabolism by Seahorse technique, and transcriptomic and metabolomic analysis.

In other *in vitro* assays, macrophages derived from bone marrow of wild-type mice have also been used to test of effectiveness of 26 molecules in inhibiting NLRP3. In these assays, the cells were stimulated with LPS (as a priming signal) and with different canonical activators of the NLRP3 inflammasome (ATP, nigericin or silica) in the presence or absence of the different molecules. The cell lysates and supernatants were used for the detection of proinflammatory cytokines by ELISA and the evaluation of the inflammasome activation by Western blot. In this Thesis, Raw 264.7 macrophages with a reporter gene to detect the activation of NF- κ B have also been used. In addition, HEK293T cells, have been used to characterize the compound 4-octylitaconate on NLRP3 with the pathogenic variant p.D303N using bioluminescence resonance energy transfer technique, fluorescence microscopy and flow cytometry.

Results

The pathogenic variants of NLRP3 associated with CAPS induce a constitutive activation of the inflammasome, and the induction of NF- κ B and deubiquitinases are involved in its positive regulation. A higher number of ASC oligomers, as indicative of inflammasome activation, and a basal release of the cell death marker galectin-3 and the cytokine IL-18 are observed in samples from CAPS patients, compared to healthy donors. Furthermore, in the recombinant mouse immortalized macrophage system, the expression of NLRP3 with CAPS-associated pathogenic variants, but not wild-type NLRP3, resulted in a constitutive formation of ASC oligomers, with the consequent activation of caspase-1, GSDMD processing, IL-18 release, and pyroptosis dependent on the expression level of the mutated NLRP3 protein. This constitutive activation of the inflammasome was dependent on NLRP3 as it was reversed by the presence of the specific NLRP3 inhibitor MCC950. On the other hand, samples from FMF patients with pathogenic variants in the *MEFV* gene did not show a constitutive activation of the pyrin inflammasome but had an exacerbated release of IL-18 and IL-1 β , which could be due to a higher transcriptional expression of these cytokines.

The induction of NF- κ B by LPS increased the number of ASC oligomers and IL-1 β release in CAPS patients compared to healthy donors. Furthermore, in the presence of LPS, immortalized macrophages expressing the p.D303N variant of NLRP3 showed increased GSDMD processing, IL-18 release, and pyroptosis. Similarly, the induction of

NF- κ B with the endogenous components palmitate, S100A9, and IL-6, as well as the TLR agonists LPS and Pam3CSK₄, produced the release of IL-1 β and increased inflammasome activation, only in macrophages that expressing the pathogenic variants of NLRP3. The induction of NF- κ B also produced the release of other proteins IL-1 α , P2X7, HMBG1, and cystatin B from macrophages expressing NLRP3 with CAPS-associated pathogenic variants. These pro-inflammatory proteins could be involved in the development of the inflammatory flares in CAPS patients. On the other hand, the use of deubiquitinase inhibitors in macrophages expressing the p.D303N variant of NLRP3 resulted in a reduction in GSDMD processing and basal IL-18 release. Similar results were obtained in samples from CAPS patients, showing that the deubiquitination process favored the activation of the NLRP3 inflammasome with CAPS-associated pathogenic variants.

The expression of NLRP3 with CAPS-associated pathogenic variants produced a metabolic reprogramming of myeloid cells that affected glycolysis and IL-1 β production. Monocytes from CAPS patients and immortalized macrophages expressing the p.D303N variant showed an abundance of metabolites related to lipids, amino acids, and nucleotides compared with control conditions. Furthermore, macrophages expressing the p.D303N variant showed a reduction in the expression of glycolytic genes that were restored by the presence of MCC950, which was reflected by a lower glycolytic capacity and production of lactate, pyruvate, and ATP. This glycolysis deficiency affected the production of IL-1 β , but not IL-18.

In this Thesis, the action of the compound 4-octylitaconate (4-OI) on the activation of the NLRP3 inflammasome with pathogenic variants associated to CAPS was also evaluated in *in vitro* assays of immortalized mouse macrophages that expressed different NLRP3 variants. The treatment with 4-OI blocked caspase-1 activation, GSDMD processing, IL-18 release, and basal pyroptosis dependent on the mutant inflammasome, inhibiting the formation of ASC oligomers, without affecting the conformation of NLRP3.

Finally, in this Thesis, 26 molecules with the capacity to interact with the ATPase region of NLRP3 that were computationally identified as potential inhibitors were tested. Macrophages derived from bone marrow of wild-type mice stimulated with LPS and with canonical activators of the NLRP3 inflammasome (nigericin, ATP or silica) in the presence of the different molecules were used. From the 26 molecules tested, only E1 and E3 produced a decrease in the release of IL-1 β and decreased the activation of caspase-1 and GSDMD processing. However, macrophages treated with LPS in the

presence of these two compounds also showed an impairment of the expression of IL-1 β and NLRP3, suggesting that both E1 and E3 inhibited the priming signal and the activation signal of NLRP3.

Discussion

The results obtained in this Thesis from *in vitro* and *ex vivo* assays support that the expression of NLRP3 with pathogenic variants associated with CAPS leads to a constitutive activation of the NLRP3 inflammasome. This is in line with studies that have reported that in recombinant models and in *in vivo* models with pathogenic NLRP3 variants a basal activation of this inflammasome without LPS treatment (Bonar et al., 2012; Tapia-Abellán et al., 2019). In addition, CAPS patients suffer inflammatory flares without any apparent infection (Corcoran et al., 2020; Kitley et al., 2010), suggesting they have a hypersensitive inflammasome. In contrast, this Thesis found in *ex vivo* assays from FMF patients an exacerbated release of IL-18 and IL-1 β , which is not due to constitutive activation of the pyrin inflammasome but seems to be due to an increase in the expression of these genes, this in line with numerous studies (Ibrahim et al., 2014; Moghaddas et al., 2017). However, a report shows basal GSDMD processing and IL-1 β release as pyrin inflammasome-dependent using a recombinant system expressing the pathogenic variants of *MEFV* (Spel et al., 2022). Furthermore, this Thesis, also described that the induction of NF- κ B modulates basal activation in the NLRP3 inflammasome with pathogenic variants associated with CAPS. NF- κ B induction is essential for the release of IL-1 β (Hooftman et al., 2020; Tapia-Abellán et al., 2019), here we highlight the action of endogenous molecules (palmitate, S100A9 and IL-6) as inducers of NF- κ B, suggesting that these molecules could be involved in the inflammatory flares of patients with CAPS. In support, several studies reveal high levels in plasma of S100A9 and IL-6 (Lachmann et al., 2009; Wittkowski et al., 2011). It is known that the ubiquitination/deubiquitination process is key in the activation of the wild-type NLRP3 inflammasome (Juliana et al., 2012; Palazón-Riquelme et al., 2018). In this Thesis, deubiquitinases have been involved in the activation of the NLRP3 inflammasome with pathogenic variants, favoring the formation of this complex. This supports a previous study that use a deubiquitinases inhibitors to treat mice carrying pathogenic variants of NLRP3 (Ren et al., 2021).

Metabolism is a key factor for the development of the inflammatory response, depending on the signal, cells show specific metabolic reprogramming (Palsson-McDermott et al., 2015). Studies reveal the dependence on glycolysis in the development of the inflammatory response and the production of IL-1 β (Palsson-

McDermott et al., 2015). This Thesis shows that the expression of pathogenic variants of NLRP3 produces a metabolic reprogramming that affects glycolysis, which decreases the production of IL-1 β as a possible regulatory mechanism to prevent inflammatory flares in CAPS.

In this Thesis, the role of 4-OI on the activation of the NLRP3 inflammasome with pathogenic variants associated with CAPS has also been studied, showing that this compound can block the basal activation of the inflammasome, agreeing with a previous study where the action of 4-OI in CAPS patient samples treated with LPS was tested (Hooftman et al., 2020). Additionally, two molecules, E1 and E3, have been described in this Thesis with potential action on the activation of NLRP3 with pathogenic variants associated with CAPS.

The results of this Thesis shed new light into the origins of non-infectious inflammatory flares in CAPS and propose new targets and novel compounds for the development of novel therapies for CAPS.

Conclusions

1. Monocytes from CAPS patients present a constitutive production of ASC oligomers, and galectin-3 and IL-18 release.
2. LPS treatment increases NLRP3 inflammasome activation with pathogenic variants associated with CAPS.
3. Monocytes from patients with FMF increase the release of IL-1 β and IL-18, without a basal activation of the pyrin inflammasome.
4. Macrophages expressing pathogenic variants of NLRP3 associated with CAPS present inflammasome activation, with the consequent formation of ASC oligomers, activation of caspase-1, processing of GSDMD, IL-18 release and pyroptosis.
5. LPS, Pam3CSK₄, palmitate, S100A9, and IL-6 increase the activation of the NLRP3 inflammasome with pathogenic variants associated with CAPS, being essential for the release of IL-1 β .
6. The activation of the NLRP3 inflammasome with CAPS-associated variants is regulated by deubiquitinases.
7. The expression of pathogenic variants of NLRP3 produces a metabolic reprogramming in myeloid cells, affecting glycolysis.
8. The inhibition of glycolysis by NLRP3 with pathogenic variants limits the production of IL-1 β , but not the release of IL-18.

9. 4-Octylitaconate inhibits the NLRP3 inflammasome with CAPS-associated variants, reducing caspase-1 activation, GSDMD processing, IL-18 release, and pyroptosis.
10. 4-Octylitaconate blocks the formation of ASC oligomers induced by pathogenic NLRP3 variants.
11. The molecules E1 and E3, analogues of MCC950, inhibit the priming and the activation of the canonical wild-type NLRP3 inflammasome, as well as the NLRP3 with pathogenic variants associated with CAPS.

PUBLICACIONES ASOCIADAS A ESTA TESIS

1. Artículos publicados

1. Angosto-Bazarra, D., **Molina-Lopez, C. #.**, Penin-Franch, A.#, Hurtado-Navarro, L. # & Pelegrin, P. (2021). *Techniques to Study Inflammasome Activation and Inhibition by Small Molecules*. *Molecules*, 26(6). [doi:10.3390/molecules26061704](https://doi.org/10.3390/molecules26061704) (# misma contribución).
2. Ionescu, D., Penin-Franch, A., Mensa-Vilaro, A., Castillo, P., Hurtado-Navarro, L., **Molina-Lopez, C.**, Romero-Chala, S., Plaza, S., Fabregat, V., Bujan, S., Marques, J., Casals, F., Yague, J., Oliva, B., Fernandez-Pereira, L. M., Pelegrin, P. & Arostegui, J. I. (2022). *First Description of Late-Onset Autoinflammatory Disease Due to Somatic NLRC4 Mosaicism*. *Arthritis Rheumatol*, 74(4), 692-699. [doi: 10.1002/art.41999](https://doi.org/10.1002/art.41999)
3. García-Villalba, J., Hurtado-Navarro, L., Penin-Franch, A., **Molina-López, C.**, Martínez-Alarcón, L., Angosto-Bazarra, D., Baroja-Mazo, A. & Pelegrín, P. (2022). *Soluble P2X7 receptor is elevated in the plasma of COVID-19 patients and correlates with disease severity*. *Front Immunol* 18(13), 894470. [doi: 10.3389/fimmu.2022.894470](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.894470)
4. Pizzuto, M., Hurtado-Navarro, L. #, **Molina-Lopez, C#.**, Soubhye, J., Gelbcke, M., Rodriguez-Lopez, S, Ruyschaert, JM., & Pelegrin, P. (2022). *Ornithine Lipid Activates Both TLR4 and the non-canonical NLRP3 Inflammasome*. *BioRxiv*, [doi: https://doi.org/10.1101/2022.01.28.477396](https://doi.org/10.1101/2022.01.28.477396) (# misma contribución).
5. Angosto-Bazarra, D., **Molina-López, C.**, & Pelegrín, P. (2022). *Physiological and pathophysiological functions of NLRP6: pro- and anti-inflammatory roles*. *Communications Biology*, 5(1), 524. [doi: 10.1038/s42003-022-03491-w](https://doi.org/10.1038/s42003-022-03491-w)

2. Artículos aceptados

1. **Molina-López C**, Hurtado-Navarro L, García CJ, Angosto-Bazarra VD, Vallejo F, Tapia-Abellán A, Marques-Soares JR, Vargas C, Bujan-Rivas S, Tomás-Barberán FA, Arostegui JI, Pelegrin P (2023). *Pathogenic NLRP3 mutants forms constitutively active inflammasomes resulting in immune-metabolic limitation of IL-1 β production*. Aceptado en *Nature Communications*.

3. Artículos en preparación

1. **Molina-Lopez C**, Hurtado-Navarro L, O' Neill LAJ, Pelegrin P. *4-octylitaconate blocks the constitutive activation of NLRP3 inflammasome of Cryopirin-associated to periodic syndrome* (en preparación).

PUBLICACIONES ASOCIADAS A ESTA TESIS

2. **Molina-Lopez C**, Pelegrin P. *The pathogenic NLRP3 mutation p.D303N exacerbates the proinflammatory response of macrophages* (en preparación).
3. Hurtado-Navarro L#, **Molina-Lopez C**#, García-Noguera D, Mesa del Castillo P, Pelegrin P. *Monocytes from Familial Mediterranean fever patients have normal inflammasome activation but results in exacerbated IL-1 β and IL-18 release* (en preparación, # misma contribución).

