

Universidad de la República

Facultad de Ciencias

PEDECIBA Biología

TESIS DE MAESTRÍA

Sub-área: Biología molecular y celular

**Caracterización de nuevos mecanismos anti-
inflamatorios de la hidroxiclороquina y sus potenciales
implicancias en el tratamiento de Lupus Eritematoso
Sistémico**

B.C. Maria Eugenia Schroeder

Orientador: Dr. Marcelo Hill

Co-orientador: Dr. Ernesto Cairoli

Laboratorio de Inmunoregulación e inflamación. Institut Pasteur de Montevideo

Tribunal defensa: Dr. Eduardo Osinaga, Dr. Carlos Batthyany, Dra. Ana Ferreira

Indice

Resumen	3
Abreviaciones	4
Introducción	7
Antimaláricos.....	7
Mecanismos anti-inflamatorios de los antimaláricos por su acción en el pH....	13
<u>Canales iónicos</u>	16
Canales de K ⁺ activados por Ca ⁺⁺ en monocitos y macrófagos.....	24
<u>Lupus eritematoso sistémico</u>	33
Etiopatogenia del LES.....	36
• Deficiencia de remoción de células necróticas en LES.....	38
• NETosis en LES.....	41
• Células presentadoras de antígeno en la RIA y tolerancia periférica.....	44
• ICs-NETs-IFM-LES.....	46
• <u>Inflamasoma</u>	48
Hipótesis de trabajo	52
Objetivos generales	54
Objetivos específicos	54
Materiales y métodos	55
Resultados	76
1. Analizar si la HCQ es capaz de inhibir la producción de IL-1 β en APCs.....	76
2. Caracterizar si la HCQ modula el procesamiento post-traducciona l de la pro-IL-1 β por modulación de la activación del IFM.....	79
3. Caracterización de mecanismos de control del IFM por la HCQ.....	82
Discusión	96
Conclusiones y perspectivas	107
Referencias	110

Resumen

Los antimaláricos han mostrado tener efectos beneficiosos en la enfermedad de Lupus eritematoso sistémico (LES). La hidroxicloroquina (HCQ) es un antimalárico, siendo la piedra angular del tratamiento del LES (Ruiz Irastorza et al. 2008). Sin embargo, las bases moleculares de su mecanismo anti-inflamatorio son todavía muy mal comprendidas. Consideramos que la identificación de blancos moleculares de la HCQ, permitiría contribuir a la racionalización de su uso a nivel clínico. Considerando que la HCQ es un inhibidor de canales iónicos, y que la regulación de la activación de canales iónicos ha sido asociado a múltiples patologías autoinmunes, es que creemos que este podría ser un novedoso mecanismos anti-inflamatorios de la HCQ ya que no se ha asociado esta propiedad de acción en canales iónicos, con la capacidad inmunomoduladora de esta droga. Planteamos también que la HCQ sería capaz de bloquear la secreción de una de las citoquinas pro-inflamatorias más potentes, la IL-1 β , a través de la modulación del metabolismo iónico de células presentadoras de antígeno. La forma inactiva de esta citoquina debe ser clivada por la Caspasa-1 para generar la forma activa. La Caspasa-1 es activada por un complejo multiproteico denominado “inflammasoma” (IFM). Se ha propuesto que este complejo multiproteico se encuentra fuertemente regulado por los niveles citoplasmáticos de K⁺ y Ca⁺⁺. Evidencia sostiene que para la activación del IFM (NLRP3), es necesario una reducción de los niveles intracelulares de K⁺ ante estímulos variados como son el ATP, nigericina entre otros. La HCQ es una droga derivada de la quinina, potente inhibidor de canales iónicos, particularmente de K⁺. Los resultados obtenidos en este trabajo de maestría muestran que la HCQ inhibe la activación del IFM y secreción de IL-1 β en macrófagos humanos. Estos resultados fueron obtenidos cuando el IFM de estos macrófagos fué activado con ATP, pero no con nigericina y buffer sin K⁺. Se cuantificó el K⁺ intracelular y se observó que la HCQ inhibió la salida de K⁺ cuando se estimulan los macrófagos con ATP pero no con nigericina. Se cuantificó el Ca⁺⁺ intracelular y se observó un aumento de Ca⁺⁺ en presencia de HCQ. Esto llevó a pensar que la HCQ podría estar actuando “downstream” a la liberación del Ca⁺⁺, inhibiendo canales de K⁺ sensibles al Ca⁺⁺ como son BKCa y KCa3.1. Se llevó a cabo la estimulación del IFM con activadores farmacológicos de estos canales en presencia y ausencia de HCQ y se observó que la HCQ inhibe la secreción de IL-1 β en ambos casos. En concordancia con estos resultados, estudios en electrofisiología en macrófagos muestran que la HCQ inhibe la conductancia de K⁺, dependientes de Ca⁺⁺ de manera dosis dependiente. Además se observó que la secreción de IL-1 β fue inhibida por el inhibidor del canal BKCa, iberiotoxina cuando los macrófagos fueron estimulados con NS1610 (activador de BKCa) y por Clotrimazole (inhibidor de KCa3.1) cuando los macrófagos fueron estimulados con NS309 (activador de KCa3.1). Nuestros resultados muestran que la HCQ inhibe canales de K⁺ activados Ca⁺⁺. Esto podría ser la causa de la inhibición de la activación del IFM, siendo este un novedoso mecanismo anti-inflamatorio de la HCQ y una potencial nueva estrategia para el tratamiento de patologías inflamatorias donde se ha visto que estos canales de K⁺ activados Ca⁺⁺ juegan un rol en la patogenia de la enfermedad.

Abreviaciones

HCQ	Hidroxicloroquina
LES	Lupus eritematoso sistémico
APC	Células presentadoras de antígeno
IFM	Inflamasoma
NLRP3	Nod-like-receptor-P3
ATP	Adenosina tri-fosfato
IBTx	Iberiotoxina
TEA	Tri-etil-amina
SI	Sistema inmune
EII	enfermedades inflamatorias inmuno-mediadas
EAs	enfermedades autoinmunes sistémicas
EM	Esclerosis múltiple
AR	Artritis reumatoidea
EA	enfermedades autoinmunes
ICs	inmunocomplejos
SNC	sistema nervioso central
GWAS	estudios de asociación genómica
SNPs	polimorfismos de un nucléotido
SI	sistema inmune
DAMPs	patrones moleculares asociados a daño
HMGB1	del inglés high mobility group box 1
pCDs	células dendríticas plasmocitoides
IFN – I	interferón de tipo I
NETs	trampas extracelulares de neutrófilos
ARN	ácido ribonucleico
ADN	ácido desoxi-ribonucleico
TLR	receptor de tipo toll
CDs	células dendríticas
mCDs	células dendríticas mieloides
IL – 10	interleuquina 10
PAMPs	patrones moleculares asociados a patógenos
RI	respuesta inmune

MDM	macrófagos derivados de monocitos
SII	sistema inmune innato
SIA	sistema inmune adaptativo
PAFF	factor activador de plaquetas
ADNs	ADN de doble hebra
DNasa-I	enzima DNasa de tipo I
MPO	Mieloperoxidasa (enzima-antígeno de neutrófilos expuesto en NETs)
LL – 37	Lactoferrina (enzima-antígeno de neutrófilos expuesto en NETs)
BAFF	factor activador de células B
CD 80	proteína de co-estimulación presente en APCs para activación de células T
CD 86	proteína de co-estimulación presente en APCs para activación de células T
CD 40 86	proteína de co-estimulación presente en APCs para activación de células T
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
Treg	Células T reguladoras
IL - 1β	Interleuquina beta
IL - 12	interleuquina 12
IL - 6	interleuquina 6
TNF – α	factor alfa de necrosis tumoral
Th	linfocitos T helper
Th17	linfocitos T helper 17
TGF – β	factor beta de transformación del crecimiento
IL – 10	interleuquina- 10
MLR/lpr	modelo murino de LES
RII	respuesta inmune innata
RIA	respuesta inmune adaptativa
NLR	receptor de tipo NOD
ASC	IFM Adaptor Protein Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing CARD
NF – Kβ	factor nuclear- KB
TLR4	receptor de tipo toll 4
ARNm	ácido ribo-nucleico mensajero
LPS	lipopolisacáridos
MP	membrana plasmática
ROS	especies reactivas de oxígeno
mROS	especies reactivas de oxígeno mitocondrial
RE	retículo endoplasmático

V_m	potencial de membrana
V_r	potencial de membrana en reposo
P	permeabilidad de membrana
V_{rev}	potencial de reversión
IP₃	inositol tri-fosfato
CRAC	canales activados por liberación de Calcio
SOCE	entrada de calcio regulada por almacenes intracelulares
K_{ir}	canal de potasio rectificador entrante
K_{DR}	canal de potasio rectificador tardío
MIM	membrana interna mitocondrial
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate (activador de células del SI)
M – CSF	factor estimulante de colonias de macrófagos
GM – CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
RVD	regulación de la disminución de volumen celular
TEA	tri-etil-amina
EAE	encefalomielitis experimental autoinmune (Modelo animal de esclerosis múltiple)
PMN	células polimorfonucleares
PBMCs	célula mononuclear de sangre periférica
BMDCs	células dendríticas de médula ósea
hCDs	células dendríticas humanas
PBS	buffer salino de fosfato
C	conductancia
I	intensidad de corriente iónica
A/F	densidad de corriente iónica
SFB	suero fetal bovino
BMDM	macrófagos derivados de médula ósea
ATA	ácido tricloro acético
NS1619	Activador de canal BKCa
NS309	Activador de canal KCa _{3.1}
Iberiotoxina	Inhibidor de canal BKCa
Clotrimazole	Inhibidor de canal KCa _{3.1}

Introducción

Este trabajo de maestría se centró en la búsqueda de novedosos mecanismos anti-inflamatorios de la HCQ (Figura 1). Esta droga es un antimalárico, siendo la piedra angular del tratamiento del LES, como tratamiento modulador de la respuesta inmune (Ruiz-Irastorza et al. 2008). Los antimaláricos se encuentran entre las drogas más antiguas utilizadas para el tratamiento de enfermedades autoinmune sistémicas (EAS) como el LES y la artritis reumatoidea (AR). En el año 1630 la condesa de Chinchón esposa del virrey de Perú fué curada de “fiebres”, por un misterioso polvo administrado por un sacerdote jesuita. El polvo fué obtenido de árboles de bosques conocidos como “chinchona trees”. El contenido de dicho polvo “mágico” era Quinina. Posteriormente durante la segunda Guerra Mundial, cuando millones de soldados anglo americanos recibieron profilaxis contra la Malaria, se observó que los síntomas reumáticos de pacientes tratados con quinina o antimaláricos sintéticos como quinacrina, mejoraron. La quinacrina fué patentada en el año 1930. También existe evidencia de la utilización de quinina en el siglo XVI para el Lupus cutáneo. Estas observaciones llevaron a que pacientes que padecían de AR y LES fueran tratados con Quinacrina, CQ e HCQ. La CQ fué sintetizada por primera vez en el año 1943 y la HCQ salió al mercado en el año 1955.

Antimaláricos:

Entre los anti-maláricos se encuentran la CQ e HCQ. Estos compuestos son 4-aminoquinolonas, siendo bases débiles (Figura 1). Como se puede observar en la Figura 1, la quinacrina se diferencia de la CQ en la presencia de un anillo bencénico. Algunos de los aspectos de la farmacología y metabolismo de antimaláricos se mencionan en el trabajo de

Wallace et al. (2012). La CQ es entre dos a tres veces más potente que la HCQ, pero el riesgo de retinopatía de la CQ es mayor (Scherbel et al. 1957, Block et al. 1998).

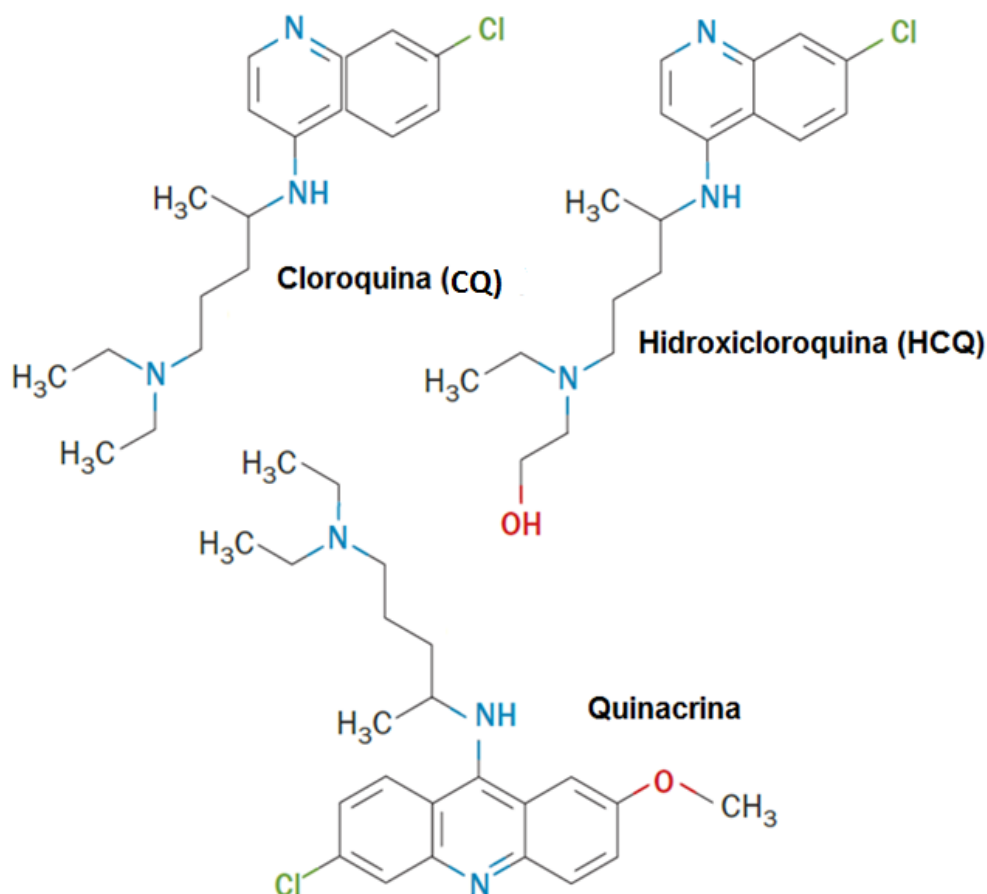
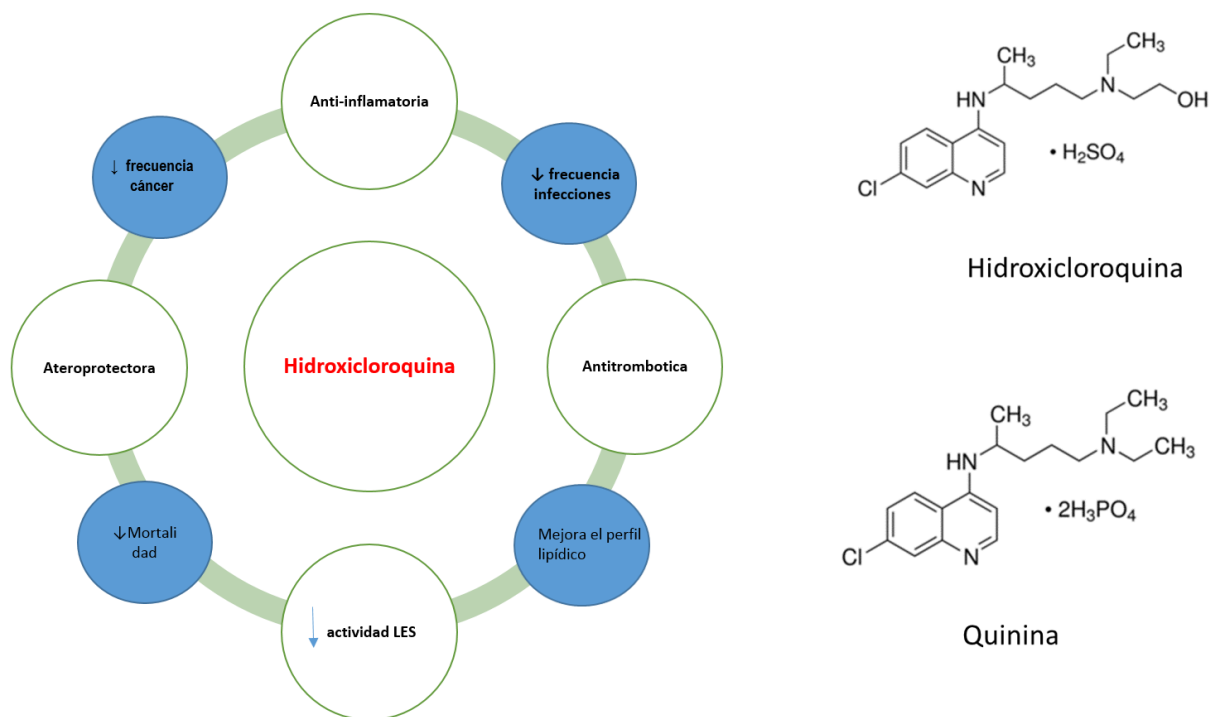


Figura 1. Antimaláricos utilizados para síntomas reumáticos. Farmacología y metabolismo.

Absorción: La CQ, HCQ y Quinacrina tienen una muy buena biodisponibilidad luego de su administración oral. Estas drogas se distribuyen ampliamente en los tejidos, tienen afinidad por tejidos pigmentados como la piel, y no son retenidos en el tejido adiposo. En referencia al **metabolismo de la HCQ**, el primer pasaje donde es metabolizado es por el citocromo P450 y resulta en enantiómeros-S y enantiómeros-R. De los dos tipos, el enantiómero-S de la HCQ tiene una corta vida media y niveles en la sangre más bajos. Entre el 21-47 % de la dosis es excretada sin ser metabolizada. **Excreción:** Entre el 40-50 % de la dosis es excretada a nivel renal, y una pequeña cantidad es excretada en materia fecal, a través de la piel y en la leche materna. Los antimaláricos tienen una vida media de eliminación de aproximadamente 40 días, pero son detectadas en tejidos por períodos más prolongados, hasta 5 años (Scherbel et al. 1957) (Figura tomada y modificada de Wallace et al. 2012).

La HCQ es considerado como un antirreumático de acción lenta y ha mostrado múltiples beneficios en LES logrando una disminución en la actividad de la enfermedad, reduciendo el número de secuelas en cada uno de los episodios, alcanzando así una significativa disminución de la morbimortalidad (Figura 2). Este hecho ha sido demostrado en pacientes latinoamericanos, como lo describieron los trabajos de la cohorte del Grupo Latino Americano de Estudio del Lupus (GLADEL 2004) evidenciando que el empleo de antimaláricos por más de seis meses se asocia con una reducción significativa en la tasa de mortalidad (Shinjo et al. 2010). La multiplicidad de beneficios ha sido recientemente sintetizada en la revisión del Dr. Guillermo Ruiz Irastorza, revisión sistemática que afirma que la HCQ es la piedra angular del tratamiento del LES (Ruiz Irastorza et al. 2010, Ruiz-Irastorza et al. 2008). En la Figura 2 se resumen los beneficios de la HCQ, mencionados en el trabajo de (Ruiz Irastorza et al. 2010, Costedoat et al. 2010).



Ruiz Irastorza G, Ann Rheum Dis 2010, 69: 20-8; Costedoat-Chalumeau N, Joint Bone Spine 2010, 77:4-5.

Figura 2. Beneficios reportados de la HCQ. Se han reportado múltiples beneficios de la HCQ en los pacientes con LES que han sido tratados con HCQ. Se ha observado una disminución en la

frecuencia de cáncer, ateroprotección, disminución de la mortalidad, disminución de los empujes en LES, mejora del perfil lipídico, es antitrombótica, disminuye la frecuencia de infecciones y es anti-inflamatoria. Esta figura es un resumen de beneficios mencionados en el trabajo de Irastorza et al. 2010, y de Costeadot et al. 2010.

Los beneficios de la HCQ en LES además de realizarlos a través de la modulación de la respuesta inmune, los realiza disminuyendo la dosis media de corticoesteroides que se administra a estos pacientes (Petri et al. 1994), disminuyendo el número de eventos tromboticos arteriales y venosos (Tektonidou et al. 2009), disminuyendo los niveles de lipoproteínas de baja densidad a tres meses de haber iniciado su administración (Cairolí et al. 2012), disminuyendo el número de infecciones graves y de neoplasias malignas a largo plazo (Ruiz-Irastorza et al. 2007, 2009).

A pesar de que se han observado múltiples efectos beneficiosos de la HCQ en el LES, es importante mencionar que los mecanismos de control de la inflamación en la patogenia de LES, AR, así como los blancos moleculares a través de los cuales la HCQ modula la respuesta inmunológica son todavía pobremente comprendidos (Rainsford et al. 2015, Lee et al. 2011). Actualmente se dispone de múltiples tratamientos para LES, entre estos se encuentran los anti-inflamatorios no esteroideos (AINES), corticoides, intercambio de plasma en caso de que el paciente este en riesgo de muerte con el fin de eliminar los anticuerpos autoreactivos e ICs dañinos, pero la piedra angular del tratamiento de LES es la HCQ (Irastorza et al. 2008). Otras tratamientos utilizados más caros, son los anticuerpos monoclonales como Rituximab anticuerpo quimérico anti- CD20, que elimina las células B transitoriamente y se dispone de otros tratamientos, pero muchos se encuentran todavía están en fase de estudio. Todos estos tratamientos tienen limitaciones y efectos secundarios.

Antagonista de R-IL-1, Anakinra logró mejoría clínica y serológica en pacientes con LES (Ostendorf et al., 2005)

HCQ "Piedra angular tratamiento de LES"

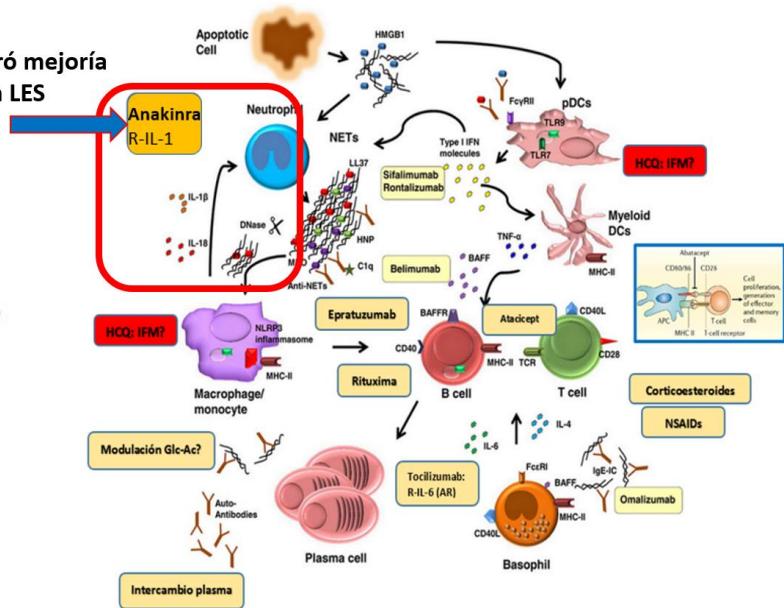


Figura 3. Tratamientos actualmente utilizados y en estudio para el LES. Son múltiples los tratamientos actualmente disponibles y en estudio para el LES. Estudios preliminares con el antagonista del receptor de IL-1, Anakinra, han obtenido una buena respuesta clínica pero hasta el momento la piedra angular del tratamiento de LES es la HCQ (Tomado y modificado de Dema et. al 2014).

Dentro de los tratamientos estudiados, se han realizado estudios preliminares con Anakinra, siendo este un antagonista del receptor de IL-1, donde se ha encontrado mejoría clínica y serológica en pacientes con LES, pero hasta el momento la piedra angular del tratamiento de LES es la HCQ (Ruiz Irastorza et al. 2010).

El co-orientador de este trabajo de Maestría, el Dr. Ernesto Cairoli utiliza cotidianamente la HCQ para el tratamiento de pacientes con LES en la Clínica Médica C. Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UDELAR.

Tratamientos para LES	Blanco molecular / celular
NSAIDS (AINEs)	Cox-1 Cox-2
Corticosteroides inmunosupresores	Múltiple
Intercambio plasma	IgG autoreactivos / ICs dañinos
Modulación glicosilación IgG ?	IgG
Hidroxicloroquina /Cloroquina	Múltiple (se detalla más adelante)
Terapias biológicas	
Rituximab	CD20
Belimumab	BAFF (Blys) Estimulante
Tocilizumab (AR)	Receptor IL-6
Epratuzumab	CD22
Omalizumab (En estudio)	IgE (IC)
Abatacept (En estudio)	CD 80/CD86
Sifalimumab (En estudio)	IFN- α
Rontalizumab (En estudio)	IFN- α
Infliximab (En estudio)	Antagonista TNF- α
Tofacitinib (AR En estudio LES)	Inhibidor de JAK 1 JAK 3
Lulizumab	Receptor CD28
Ibrutinib	Btk

Terapias celulares	
Transplante de células madre hematopoyéticas HSC (En estudio)	
Transplante de células madre Mesenquimales MSCs (En estudio)	
Células dendríticas tolerogénicas (En estudio)	
Expansión de Tregs ex vivo (En estudio)	
Terapia peptídica	
Peptido spliceosomal (En estudio)	
Peptido derivado de anticuerpo anti-DNA (En estudio)	

Tabla 1. Algunos tratamientos actualmente utilizados y en estudio para LES. Dentro de los tratamientos actualmente utilizados, se encuentran los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) y antimaláricos como Quinina, CQ, HCQ. También se dispone de terapias biológicas, terapias celulares y terapias peptídicas. Esta tabla fué realizada a partir de datos de (Malgorzata et al. 2015, Cairoli et al. 2012, Mo Yin Mok et al. 2016)

Mecanismos anti-inflamatorios de los antimaláricos por su acción en el pH

Los anti-maláricos parecieran tener diferentes mecanismos anti-inflamatorios como se muestra en la Figura 4, mediante la interferencia en la acidificación de lisosomas y autofagosomas de células fagocíticas, debido a que estos compuestos son bases débiles con tropismo por estos organelos. De esta manera alteran la expresión de moléculas del MHC de tipo II, y por lo tanto la presentación de antígeno en las células presentadoras de antígeno (APCs) como son las células dendríticas (CDs) y macrófagos (Hsing et al. 2005, Fox et al. 1993, 1993 b, 1996). Esta alteración del pH lisosomal se lo ha asociado también a la disminución de la activación de receptores TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 que se encuentran en compartimentos intracelulares donde se les presenta material nuclear extraño (antígenos) a través de receptores que medien fagocitosis como son los receptores Fc γ presentes en la MP de CDs o linfocitos B o antígenos solos (DeBouteiller et al. 2005, Rutz et al. 2004). Estos receptores TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se encuentran inactivos y deben ser activados por enzimas proteolíticas dependiente del medio ácido en los endolisosomas para poder unirse al antígeno. De esta manera la acción de los antimaláricos estarían inhibiendo cascadas de respuestas inflamatorias inducidas por estos receptores TLR, como es la expresión de citoquinas como el IFN-I mediante aumento de pH. También autoantígenos extracelulares como moléculas de ADN pueden ser endocitados y posteriormente reconocidos por receptores TLR en el medio intracelular, llevando a la producción de interferones de tipo I y de citoquinas pro-inflamatorias (Marshak-Rothstein et al. 2006). Como fué mencionado previamente el IFN- α tiene un rol fundamental en la patogénesis de LES, llamada “interferonopatía o IFN- α signature” (Vallin et al. 1999). La NETosis también pareciera tener un rol muy importante en la secreción de IFN- α a través de la estimulación de las pDCs (García-Romo. 2011). El IFN-I tiene diferentes blancos celulares como son los linfocitos B, linfocitos T y células polimorfonucleares

la activación de más pDCs, perpetuando así un ciclo vicioso (Ronnlblom et al. 2006). El IFN- α promueve la supervivencia de células T, la respuesta regulada positivamente hacia Th1, la proliferación de células TCD8+ y la supresión de células Tregs. El IFN- α también estimula al desarrollo de células B, induciendo BAFF y la maduración y supervivencia de células B (Ronnlblom et al. 2006). Además en la presencia de interferones e ICs induce a que las células PMN hagan NETosis que estimula la secreción de IFN- 1 y activación de pDCs (Figura 3) quizás por TLRs (Wallace et al. 2001). El IFN- α también promueve la maduración de monocitos y DCs, regulando positivamente la expresión de moléculas co-estimuladoras como las moléculas de MHC y estimula síntesis de IL- 10 (Aman et al. 1996) e IL- 12 por DCs (Ronnlblom et al. 2011). **Abreviaciones** dsDNA, ADN doble hebra; ER, Retículo Endoplasmático; IRF, factor regulador de interferón; NET, trampa extracelular de neutrófilos; pDC, célula dendrítica plasmocitoide; PMN, células polimorfonucleares; SLE, Lupus eritematoso sistémico; ssRNA, ARN de simple hebra; Th1, célula T helper de tipo 1; TLR, Toll-like receptor; T_{REG} cell, célula T reguladora (Tomado y modificado de Wallace et al. 2012).

A pesar de que los antimaláricos han demostrado tener múltiples efectos beneficiosos en el LES y AR, y que la HCQ es considerada el tratamiento “gold standard” para el LES (Ruiz Irastorza et al. 2008) es sorprendente que los mecanismos a través de los cuales la HCQ controla la inflamación en estas patologías, así como blancos moleculares controlados por esta, sean pobremente comprendidos (Rainsord et al.2015). Por lo que creemos que la generación de nuevos conocimientos en esta área podría contribuir a la racionalización de su uso a nivel clínico.

Resulta interesante que la HCQ es una droga derivada de la Quinina. La quinina es conocida por ser un potente inhibidor de canales iónicos, particularmente de K⁺. La HCQ es también un inhibidor de canales iónicos (Ponce-Balbuena et al. 2012). La HCQ también se ha asociado a la inhibición de canales iónicos (Capel et al., 2015). Trabajos como el de (Feske et al. 2015) muestran que los canales iónicos son reguladores claves de la respuesta inmune innata y adaptativa. Sin embargo para nuestro conocimiento, los efectos anti-inflamatorios de la HCQ hasta el momento no han sido asociados a su capacidad de modular el metabolismo iónico.

Canales iónicos

Los canales iónicos son una gran familia de proteínas de membrana que forman poros ion selectivo o no selectivo como son los receptores ionotrópicos P2X7 presentes en la membrana plasmática (MP) de macrófagos y CDs. Los canales iónicos son importantes para la realización de muchas funciones celulares como son las respuestas inmunes innatas y adaptativas, mediante la regulación de flujos iónicos. Los canales iónicos presentes en los diferentes tipos celulares pueden contribuir a la generación e respuestas inmunes, mediante la la regulación del potencial de membrana (V_m). Este V_m depende de la concentración de los iones más abundantes a ambos lados de la MP, como son los iones Na^+ , K^+ y Cl^- , que componen el medio intra y extracelular. La concentración de estos iones y por tanto el V_m depende también de la permeabilidad de la MP para cada uno de estos iones, como puede observarse en la ecuación de Goldman (Figura 5). Se puede determinar el V_m mediante la ecuación de Goldman en condición de célula en reposo (V_r), es decir cuando no hay flujo neto de iones a través de la MP.

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_e}$$

Figura 5. Ecuación de Goldman para determinación del potencial de membrana de una célula en reposo. Siendo V_m : diferencia de potencial a ambos lados de la MP P : permeabilidad para un ion determinado en la MP y la concentración de cada uno de los iones a ambos lados de la MP.

En caso de que las células se encuentren en condición de reposo, el V_m se acerca al potencial

de equilibrio del ion K^+ (V_{rev}), ya que la P de la MP en esta condición es superior para el K^+ que para los demás iones. Por lo tanto el V_m en condición de reposo (V_r) sería muy cercano al V_{rev} del ion K^+ y el V_m se podría determinar mediante la siguiente ecuación:

$$V_m \cong \frac{RT}{zF} \ln \left[\frac{K^+}{K^+} \right]_e$$

Las células del sistema inmune (SI), expresan en la MP diferentes transportadores y canales iónicos que regulan el flujo de iones como el K^+ , Ca^{++} y Cl^- entre otros. De esta manera se regula el V_m y se dan vías de señalización mediante flujos iónicos para la realización de diferentes funciones celulares como son la expresión génica, apoptosis, proliferación celular, migración y fagocitosis entre otras. Estos canales juegan roles claves en células excitables como las neuronas y células del músculo cardíaco, así como en células no excitables como son las células del SI. Entre los iones fundamentales para la realización de importantes funciones celulares se encuentran los iones de K^+ y Ca^{++} . Para la regulación de su flujo, la MP de estas células cuenta con canales iónicos de K^+ y de Ca^{++} entre otros. Uno de los flujos iónicos más estudiados debido a su importancia en la generación de respuestas celulares, es el flujo de Ca^{++} . Este es caracterizado por oscilaciones de Ca^{++} a nivel citosólico. En la regulación de oscilaciones del ion Ca^{++} en el citosol, se encuentran implicados diversos canales iónicos de K^+ , Ca^{++} , Na^+ y Cl^- . Cuando la célula se encuentra en reposo, hay una distribución asimétrica para iones como son el Na^+ y el K^+ a través de la MP. Esta asimetría es mantenida por la bomba Na^+/K^+ -ATPasa que intercambia dos iones K^+ hacia el citosol celular cada tres iones de Na^+ que hace que salga desde el interior celular hacia el medio extracelular (Figura 6). Esto lleva a que haya una diferencia de gradiente electroquímico para estos iones a ambos lados de la MP en condición

de reposo entre el interior celular, siendo la composición de K^+ en el medio citosólico de 140 mM y en el medio extracelular una concentración de K^+ de 5 mM. El **potencial de membrana (V_m)** en reposo es cercano a -70 mV.

Na^+/K^+ ATPasa

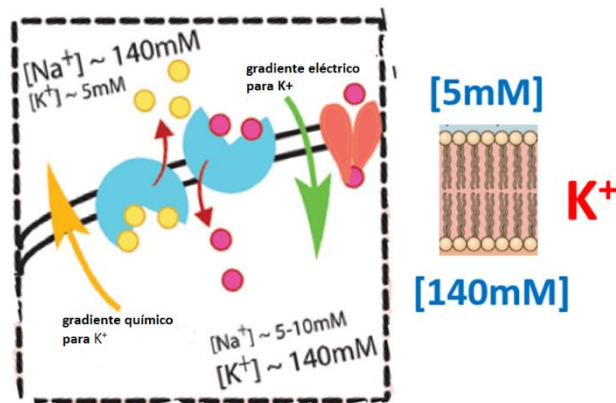


Figura 6. La bomba de Na^+/K^+ transporta iones activamente generando un gradiente electroquímico de Na^+ y K^+ a ambos lados de la MP. Esta bomba de Na^+/K^+ es una proteína transmembrana que intercambia tres iones de Na^+ que salen hacia el medio extracelular, cada dos iones de K^+ que ingresan desde el medio extracelular al citosol. Este es un transporte activo, con gasto de ATP. De esta manera se genera una distribución iónica asimétrica de los iones Na^+ y el K^+ a través de la MP (Tomado y modificado de Prochnicki et al. 2016)

Muchas respuestas biológicas se dan mediante segundos mensajeros como el ion Ca^{++} . Un estímulo que induzca una entrada o salida de este ion promovería un alejamiento del V_r . El contenido de Ca^{++} citosólico controla muchos procesos celulares como la expresión génica, contracción, crecimiento, apoptosis y secreción de citoquinas entre otras (Carafoli et al. 2002). En macrófagos humanos, la señalización de Ca^{++} intracelular se ha asociado con varias respuestas inmunológicas como son la fagocitosis y secreción de citoquinas en respuesta a ATP extracelular (Hickman-Davis et al. 2002; Hanley et al. 2004). Por esta razón, la células mantienen un estricto control de la concentración del Ca^{++} citosólico para que un aumento de

Ca^{++} por encima de un umbral, pueda desencadenar respuestas celulares. Por lo tanto la homeóstasis del Ca^{++} es muy importante para el funcionamiento normal de la célula debido a su rol como segundo mensajero en diversas funciones celulares. El aumento de Ca^{++} en el citosol, se ha asociado con la activación de un complejo multiproteico pro-inflamatorio presente en células del SI entre otras denominado inflammasoma (IFM), cuya activación se da por captación de este ion en la mitocondria. Por esto el flujo de este ion Ca^{++} es cuidadosamente regulado y en este proceso de la regulación del Ca^{++} participan diferentes canales iónicos y transportadores presentes en la MP, y organelos que almacenan Ca^{++} en el interior celular, participando de la regulación de su concentración, como son la mitocondria y el retículo endoplasmático (RE). Estos organelos son los principales sitios de almacenamiento del Ca^{++} en el interior celular. La concentración del Ca^{++} intracelular en células del SI puede darse por liberación de Ca^{++} de almacenes intracelulares como el RE o a través de la entrada de Ca^{++} desde el medio extracelular, mediante diferentes canales iónicos permeables al Ca^{++} como son los canales de entrada de calcio regulada por almacenes intracelulares de Ca^{++} (SOCE del inglés: store operated calcium entry). Esta vía de entrada de Ca^{++} por SOCE, es una de las más importantes en células no-excitables. SOCE ha sido ampliamente estudiado en células del sistema inmune adaptativo (SIA) como los linfocitos T, pero poco se sabe en células del sistema inmune innato (SII) Parekh et al. 2005.

Por otro lado, los canales de K^+ son importantes para las diferentes funciones celulares, por su rol en el establecimiento del voltaje de reposo de las células (V_r), osea cuando no hay flujo iónico neto a través de la MP y son los canales iónicos más numerosos en las células del sistema inmune (SI). Desde hace muchos años, se conocen una gran variedad de canales de K^+ (Ince et al. 1987). Se ha visto que la expresión de canales iónicos y la actividad de los canales depende del origen celular, de las condiciones de cultivo, tiempo de cultivo como por ejemplo en presencia de LPS, PMA (del inglés: phorbol mystrate acetate), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y factor estimulante de colonias macrófago-granulocíticas

(GM-CSF del inglés "granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor) como fue estudiado en los siguientes trabajos en macrófagos (Gallin et al. 1984, Gallin et al. 1988, Randriamampita et al. 1987, Ypey et al. 1984, Nelson et al. 1990, Eder et al. 1997). En el trabajo de De Coursey et al. 1996, se analizó la variación de expresión de canales iónicos durante la diferenciación a macrófagos con PMA en la línea celular monocítica humana, THP-1. Trabajos como el de Gallin et al. 1988, Gallin et al. 1991 han mostrado que la expresión de canales iónicos en monocitos, macrófagos humanos y líneas celulares de macrófagos va variando durante la maduración, diferenciación o activación de estas células. Entre los canales de K^+ que han sido descritos en monocitos y macrófagos humanos y murinos pueden encontrarse cuatro clases principales: **1) canales de K^+ dependiente de voltaje (Kv)** activados por despolarización o hiperpolarización de V_m , como los canales Kir (2TM/1P) como Kir 2.1 y Kv 1.3, **2) canales de K^+ activados por Ca^{++}** como los canales BKCa, sKCa y KCa3.1, formados por 6 segmentos transmembrana (TM) y un dominio de poro (P) (6TM/1P) activados por Ca^{++} y/o V_m . Estos son canales selectivos al K^+ con seis/siete dominios transmembrana y se clasifican por la conductancia como conductancia grande (BKCa), intermedia (KCa3.1) y pequeña conductancia (sKCa) teniendo una sensibilidad diferente al Ca^{++} (Wei et al. 2005). Trabajos han mostrado que la sensibilidad al Ca^{++} depende del canal y del tipo celular del cual proviene el canal **3) Canales de K^+ activados por Na^+** y **4) Canales de K^+ activados por unión de ligando** como los canales de la familia P2X en donde P2X7 se activa por unión de ATP. Los canales de K^+ sensibles al Ca^{++} , KCa3.1 y sKCa han mostrado ser importantes en la entrada de Ca^{++} regulado por SOCE en los linfocitos T (Srivastava et al. 2006, Fanger et al. 2001). Un canal que ha mostrado también tener un rol fundamental en la regulación de entrada de Ca^{++} a través de la modulación del V_m , son los canales de K^+ rectificadores entrantes que se activan induciendo una entrada de K^+ en condiciones de hiperpolarización a V_m muy negativos ($V_m < V_r$). Estos fueron identificados como canales Kir (del inglés: inward rectifier) en macrófagos diferenciados a partir de THP-1 por DeCoursey et al. (1996), quien observó que estos canales solamente se encontraban

presentes en macrófagos y no en monocitos derivados de la línea celular monocítica humana THP-1. Trabajos posteriores identificaron un canal denominado Kir2.1, inhibidos por el antimalárico Cloroquina (CQ) por Franchini et al. (2004). El canal Kir2.1 ha sido encontrado en macrófagos diferenciados de THP-1 por DeCoursey et al. (1996) aumentando su expresión al aumentar la diferenciación de estas células. El trabajo de Rodriguez-Menchaca et al. (2008) ha mostrado que los canales Kir2.1 son bloqueados por el antimalárico CQ, en la línea celular HEK 293. Luego los canales Kv1.3 a pesar de ser muy conocidos por su rol fundamental en la regulación de V_m como ya se ha visto en macrófagos alveolares humanos (Mackenzie et al 2003), trabajos como el de De Coursey et al. (1996) muestran que los monocitos THP-1 presentan este canal, disminuyendo su expresión a medida que las células THP-1 se diferencian con PMA. Entre los canales iónicos que se han asociado a enfermedades autoinmunes, se encuentran los canales de K^+ activados por Ca^{++} (Raychaudhuri et al.2016., Friebel et al.2015., Tanner et al., 2015., Hu et al., 2012).

Los canales iónicos parecieran jugar un rol en la regulación de la respuesta inmune a diferentes niveles, como es la modulación de la RII y RIA a través de la regulación de la activación del IFM.

En la actividad experimental de este trabajo se estudiaron algunos canales de Ca^{++} y K^+ que han sido reportados en MP de macrófagos humanos y murinos que pensamos podrían encontrarse implicados en la regulación de la activación de este complejo IFM. Entre estos canales, se encuentran los canales de la familia TRP (canales sensores del medio extracelular. Algunos de estos canales, se activan en medio con bajo contenido de K^+ (como los canales TRPM7) que ya han sido asociados con la activación del IFM (Compan et al. 2012), canales purinérgicos como P_2X_7 , y canales de K^+ sensibles al Ca^{++} como son BKCa, IKCa, y sKCa.

P₂X₇

Entre los receptores purinérgicos están los de tipo P₂, siendo estos receptores de ATP. Estos pueden dividirse en receptores metabotrópicos P₂Y, que están asociados a proteína G, y receptores P₂X ionotrópicos que son canales iónicos selectivos de cationes (K⁺, Na⁺, K⁺) Desai et al. (2014). Los macrófagos murinos y humano expresan una gran variedad de receptores de tipo P₂X y P₂Y (Coutinho-Silva et al. 2005; Alonso-Torre et al. 1993; Hanley et al. 2004). Los receptores P₂Y se encuentran acoplados a proteína G y al unirse a ATP, activan PLC e inducen la producción de IP₃ y la liberación de Ca⁺⁺ del RE. Los receptores de tipo P₂X tienen una afinidad significativamente menor para el ATP, por lo que para ser activados se necesitan concentraciones elevadas de ATP en el medio extracelular del orden de mili molar. Mientras que se ha visto que los canales de tipo P₂Y en macrófagos murinos con concentraciones de ATP entre 10 - 100µM se induce un aumento del Ca⁺⁺ citosólico transitorio. Como se mencionó previamente el aumento de ATP a concentraciones mili molar en el medio extracelular, puede provocar un aumento de Ca⁺⁺ citosólico más sostenido y elevado que el inducido a concentraciones de ATP menores. Este gran aumento de Ca⁺⁺ es posible mediante la entrada de este ion desde el medio extracelular, como es necesario para la activación del IFM. Este aumento de ATP en el orden de mili molar en el medio extracelular, puede darse durante un daño masivo de tejidos como sucede en el LES. Una diferencia importante entre P₂X₇ y otros miembros de la familia P₂X es que la activación de P₂X₇, se da a elevadas concentraciones de ATP entre 0,5 y 3 mM (Hanley et al. 2012). Estos canales al ser activados por elevadas concentraciones de ATP (mM), inducen la entrada de Ca⁺⁺ y Na⁺ extracelular, y una salida de K⁺ hacia el medio extracelular asociado a la activación del IFM (Perragaux et al. 1996). En monocitos humanos se ha visto que la activación de canales P₂X₇ se encuentra asociada a la secreción de IL- 1β, Caspasa- 1 y a la muerte por piroptosis (Wan-ting He et al. 2015).

Canales TRP

Se conocen una gran cantidad de canales de la familia TRP en el SI, que se dividen en seis subgrupos, según su composición química y estructura en TRPC, TRPM, TRPV, TRPA, PRPML, y TRPML. Estos canales responden a una gran variedad de estímulos ambientales como son la temperatura, pH, osmolalidad entre otros, siendo canales sensores de lo que sucede a su alrededor (Vaeth et al. 2015). Estos canales se han estudiado ampliamente en neuronas y en células del SII y SIA. Son canales relativamente no selectivos y permeables al Ca^{++} , Na^+ y otros cationes (Billeter et al. 2014; Moran et al. 2011). Entre los canales TRP asociados a la inflamación, se encuentra el canal TRPM2 que se lo ha asociado como protector en inflamación mediante la modulación de la producción de ROS. Además se ha reportado que macrófagos donde se ha delecionado este canal TRPM2, son resistentes a la activación de NLRP3 inducida por cristales de aluminio (Di et al. 2011; Zhong et al. 2013). Estos canales TRP han sido asociados a la regulación del volumen en macrófagos RVD (del inglés: regulatory volume decrease). En soluciones extracelulares sin K^+ así como en presencia de ATP, se observó liberación de IL- 1β en monocitos humanos (Perragaux et al. 1996). En el trabajo de Compan et al. (2012) se observó que concentraciones bajas de K^+ inducían hinchazon y disminución de las concentraciones citosólicas de K^+ y Cl^- en macrófagos THP-1, activándose así RVD, siendo éste controlado por TRP mediante entrada de Ca^{++} extracelular. Durante RVD se activan también canales de K^+ y Cl^- o co-transportadores de K^+/Cl^- en la MP. En el trabajo de Compan et al. (2012) se muestra que estos canales TRP modulan el aumento de Ca^{++} citosólico necesario para la salida de K^+ , así como el aumento de Ca^{++} por ingreso de este ion desde el medio extracelular a través de TRP (farmacológicamente similar a TRPM7), y para la activación de NLRP3. Además en este mismo trabajo se estudió la expresión de los canales TRP en macrófagos de THP-1 donde observaron que los canales TRPV2 y TRPM7 son los más ampliamente expresados en estas células, por lo que la entrada de Ca^{++} a través de TRP

parecería tener un rol fundamental en la activación de NLRP3 en soluciones con un bajo contenido de K^+ .

Canales de K^+ activados por Ca^{++} en monocitos y macrófagos

En macrófagos humanos se han reportado canales de K^+ sensibles al Ca^{++} como se muestra en la (Figura 7) y canales de K^+ sensibles al Ca^{++} en la línea celular monocítica humana THP-1 (Figura 8). Los macrófagos de esta línea celular, diferenciados con PMA, fueron estudiados por DeCoursey en el año 1996 (Figura 8). El antimalárico CQ inhibe la activación del IFM en fagocitos mononucleares tanto *in vivo* como *in vitro* (Schorn et al. 2011).

Diversos trabajos han mostrado que la Quinina inhibe canales K^+ activados por Ca^{++} en diferentes tejidos como son BKCa, IKCa y sKCa (Bokvist et al. 1990; Mancilla et al. 1990; Cook et al. 1985; Burgess et al. 1981; Reichstein et al. 1981; Malik-Hall et al. 2000; Alonso-Torre et al. 1993). Perragaux en el año 1996, encontró que la quinina inhibía la secreción de IL- 1β en monocitos humanos activados con LPS y ATP.

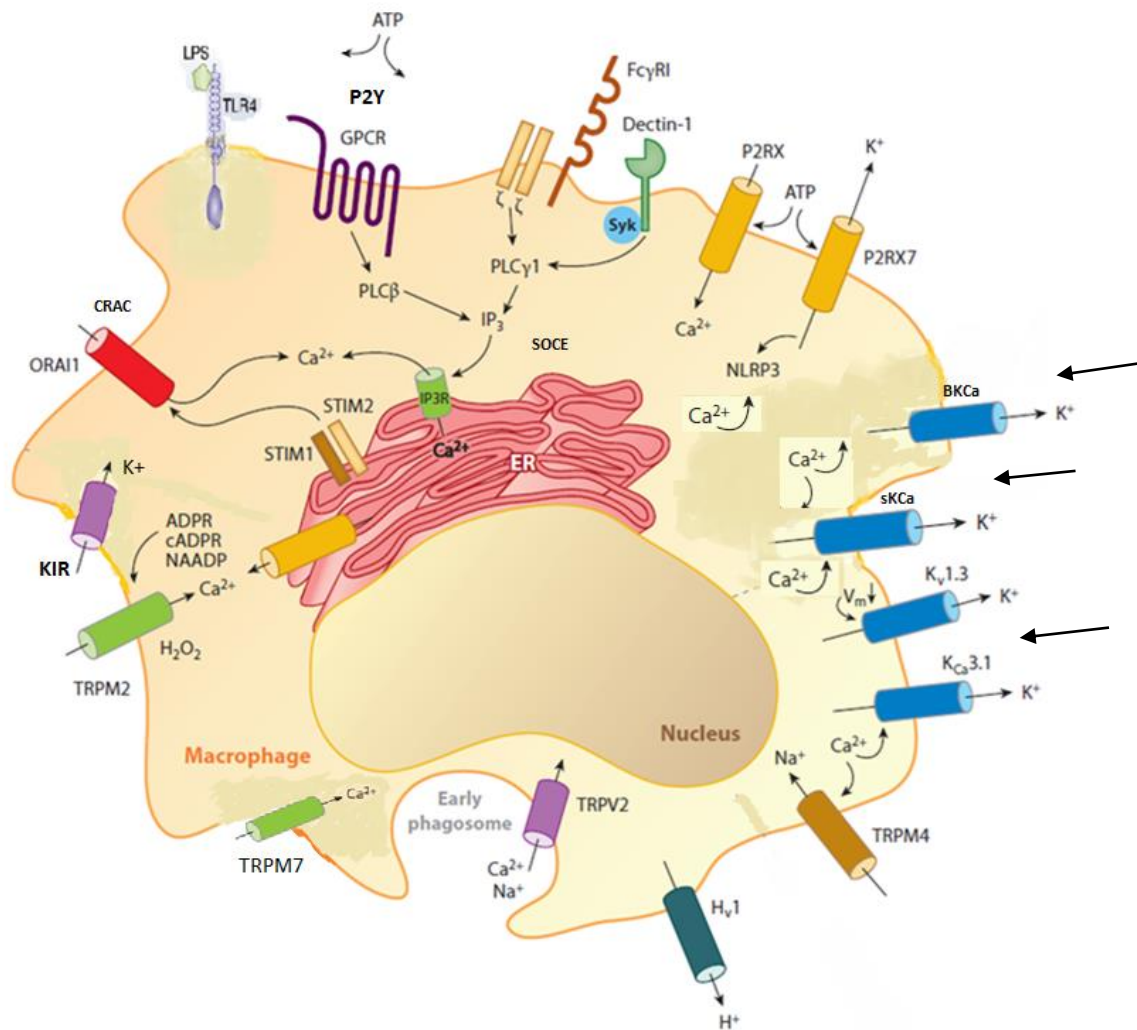


Figura 7. Canales y receptores iónicos en macrófagos humanos: Los macrófagos expresan una variedad de receptores, canales catiónicos de K^+ y Ca^{++} . El V_m requerido para la activación de SOCE por CRAC es establecido por canales de salida de K^+ como son $K_v1.3$, $K_{Ca3.1}$ y canales de Na^+ . Siendo activados por voltaje y Ca^{++} respectivamente y canales de Na^+ como $TRPM4$ es activado por Ca^{++} . DeCoursey et al. (1996) muestra que $K_v1.3$ disminuye su expresión a medida que los monocitos THP-1 se diferencian a macrófagos. Canales de entrada de Ca^{++} como $TRPM2$, $TRPV2$, $TRPM7$ son regulados por ROS (H_2O_2) y han sido asociados a la activación de $NLRP3$, el segundo es un sensor osmótico no selectivo para Ca^{++} asociado a la fagocitosis mediando la entrada de Na^+ y no de Ca^{++} , y el tercero es un canal de Ca^{++} que regula RVD asociado a $NLRP3$ (Compan et al. 2012). Los canales Kir son canales de K^+ rectificadores entrantes que se activan ante hiperpolarización de V_m . Canales de K^+ activados por Ca^{++} como $BKCa$ y $sKCa$ (DeCoursey et al. 1996). Receptores purinérgicos $P2Y$ activados por ATP inducen un aumento de Ca^{++} por PLC-B e IP_3 . Los receptores ionotrópicos $P2X7$ son activados por ligando (ATP), con un rol dual mediando la entrada de Ca^{++} extracelular y salida de K^+ para activación de $NLRP3$. El canal de H^+ asociado con el complejo oxidasa NADPH (no se muestra) es esencial para la generación de ROS en macrófagos. Abreviaciones: CRAC, canal de Ca^{++} activado por liberación de Ca^{++} , ER, Retículo endoplasmático; GPCR, receptor acoplado a proteína G; $NLRP3$, familia de NLR, conteniendo el dominio Pyrin; ROS, especies reactivas de oxígeno; SOCE, entrada de Ca^{++} operada por almacenamiento; TLR, receptor de tipo Toll; TRP, potencial receptor transitorio (Tomado y modificado de Feske et al. 2015)

Expresión de canales iónicos durante la diferenciación de línea celular THP-1				
Canal iónico	Monocitos sin diferenciar		Macrófagos diferenciados con PMA	
	% Expresión	Amplitud	% Expresión	Amplitud
I_{DR} (pA)	99 (81/82)	378 ± 339 (57)	4 (2/45)	60
I_{SK} (nS)	100 (22/22)	2.3 ± 1.8 (21)	100 (5/5)	
I_{BK} (no. in patch)	0 (0/24)		38 (11/29)	14 ± 16 (9)
I_{IR} (nS)	1 (1/82)	1.8	70 (31/44)	5.6 ± 5.5 (28)
I_H (pA/pF)	present	16.6 ± 8.8 (10)	present	7.2 ± 5.2 (22)
I_{cat} (nS)	66 (37/56)		present	32 ± 33 (6)
I_{Cl}	89 (8/9)		100 (12/12)	

Figura 8. Canales de K^+ dependientes de Ca^{++} encontrados en macrófagos THP-1 diferenciados con PMA. Se han encontrado canales de tipo Kir en los macrófagos THP-1, canales de Cl^- , y también canales de K^+ dependientes de Ca^{++} . Entre estos canales se indican con una flecha los canales de K^+ dependientes de Ca^{++} BKCa y sKCa (Tomado y modificado de De Coursey et al. 1996)

BKCa

Este canal es también conocido como SLO1, MaxiK, KCa1.1 o KCNMA1 y se encuentra expresado tanto en MP de macrófagos humanos alveolares como en la membrana interna mitocondrial (MIM) en macrófagos humanos diferenciados con PMA a partir de la línea celular monocítica humana THP-1, como se muestra en la Figura 8 (Papavlassopoulos et al. 2006, Szabo et al. 2014, De Coursey et al. 1996). También se observó su expresión en macrófagos humanos diferenciados a partir de monocitos de sangre periférica (Gallin et al. 1984). Estudios en electrofisiología han mostrado que este es un canal altamente selectivo al K^+ , con una conductancia de canal único de alrededor de 100 - 250 pS en soluciones con igual concentración de K^+ a ambos lados de la MP (K^+ simétrico). La activación de estos canales en macrófagos humanos, puede darse por un aumento de Ca^{++} citosólico o aumento de Ca^{++} en la

matriz mitocondrial, aunque tienen una baja sensibilidad al Ca^{++} en comparación con KCa3.1 y sKCa (Gallin et al. 1984). También puede activarse a V_m muy positivos (despolarizaciones elevadas ≥ 100 mV) como puede darse por un gran aumento de Ca^{++} citosólico, siendo sensibles al V_m (a diferencia de los canales KCa3.1 y sKCa). La despolarización de la MP, induciría la activación de este canal, cuya conductancia es de 130 pS en una concentración de K^+ extracelular de 5 mM de K^+ y de 240 pS en K^+ simétrico (Gallin et al. 1984). En condición de despolarización, el V_m es mayor que el V_r pudiendo activarse estos canales, con una salida de K^+ hacia el medio extracelular para restablecer el V_r . Estos canales BKCa se encuentran activos a una concentración de Ca^{++} citosólico de $1 \mu\text{M}$ y su expresión aumenta a medida que aumenta la diferenciación de macrófagos THP-1 con PMA (Figura 8). El canal BKCa está compuesto por una subunidad α y una subunidad β , y se ha visto que la expresión de estas subunidades, depende del tipo celular. La subunidad α es codificada por el gen *slo* en el cromosoma 10 q 22.3, con 7 segmentos transmembrana (S0-S6) con un grupo N-terminal y un C-terminal del lado citosólico. Los dominios S1-S6 se pliegan similar a los canales de K^+ dependientes, teniendo un dominio de poro entre S5 y S6, sensor de voltaje en S4 (Meera et al. 1997). Los aminoácidos cargados negativamente en la zona (COO^-) terminal le confieren sensibilidad al Ca^{++} (Wei et al. 1994). Luego tiene un dominio S0 transmembrana, y una subunidad β que actúa como modulador del canal para potenciar la sensibilidad al Ca^{++} , así como la propiedad de unión a toxinas (Tseng-Crank et al. 1996; Wei et al. 2005). Activadores conocidos de BKCa son NS1619 que puede utilizarse tanto para los canales presentes en membrana plasmática (MP) como en MIM (Sato et al. 2005) e inhibidores conocidos son iberiotoxina (toxina de escorpión), Charybdotoxina (Gallin et al. 1988), Paxilina, Quinina y un bloqueante no selectivo de canales de K^+ como es la tetra-etil-amina (TEA). Estos canales se encuentran ampliamente expresados en diferentes tipos de células excitables, pero también en células no excitables como los macrófagos humanos diferenciados de monocitos de sangre periférica y línea THP-1 (Gallin et al. 1988, DeCoursey et al. 1996). Se ha visto que la

transcripción de BKCa ocurre durante la diferenciación de macrófagos humanos alveolares *in vivo* (Papavlassopoulos et al. 2006). Por lo que la procedencia, condiciones y tiempo en cultivo son aspectos importantes a considerar al momento de estudio de estos canales. Estos canales han sido asociados

BKCa

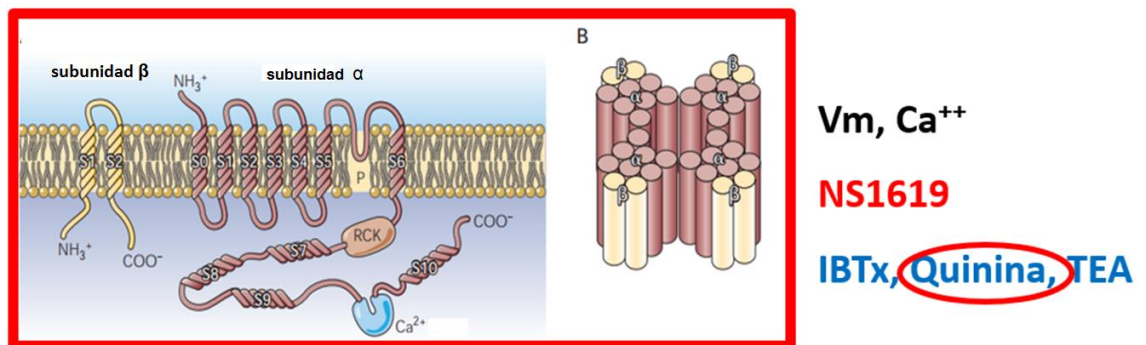


Figura 9. Estructura de los canales BKCa en la MP de macrófagos. Estos canales están formados por una subunidad α (S9 - S10) y una subunidad β con siete dominios transmembrana, con un poro entre S5 y S6 y un grupo cercano al grupo carboxilo (COO^-) terminal que hace que este canal sea sensible al Ca^{2+} . Estos canales son activados por despolarización ($V_m > V_r$), y por aumento de Ca^{2+} . Siendo activado por NS1619 e inhibido por IBTx, Quinina y TEA (Tomado y modificada de Ledoux et al. 2006).

IKCa (KCa3.1)

Este canal es codificado por el gen KCNN4, siendo también conocido como KCa3.1, IK1, hSK4, KCa4 y como "Gardos-channel" (Wei et al. 2005). Se han encontrado en la MP y en la MIM de macrófagos (Szabo et al. 2014). Se encuentran formados por seis dominios transmembrana un poro entre S1 y S6 y un grupo amino (NH_3^+) y carboxilo terminal (COO^-) del lado citosólico, siendo este último el que hace que este canal sea muy sensible al Ca^{2+} (Figura

10). Este es un canal de K^+ activados por Ca^{++} insensibles al cambio de V_m y una vez activados inducen la salida de K^+ hacia el medio extracelular. En el trabajo de Gallin et al. (1984) se observó que en macrófagos humanos diferenciados a partir de monocitos de sangre periférica hay corrientes de K^+ de menor conductancia que BKCa, menor a 20 pS, insensible a TEA, a diferencia de las corrientes de larga conductancia como BKCa que es bloqueada por TEA 10 mM. Mediante estudios de electrofisiología se ha visto que estos canales se expresan en diferentes tejidos corporales, entre ellos células sanguíneas como eritrocitos, monocitos, macrófagos como microglia (Grygorczyk et al. 1983., Jensen et al. 1998., Maezawa et al. 2012). Evidencia apoya que la expresión de KCa3.1 se encuentra asociada a diferentes funciones de las células siendo su expresión regulada positivamente durante la activación de los macrófagos residentes del SNC como es la microglia (Maezawa et al. 2012). Estos canales tienen una conductancia de canal único de 11- 40 pS, menor a la conductancia de BKCa, siendo muy sensible al Ca^{++} intracelular, más sensibles que BKCa, pero insensibles al V_m . La conductancia de estos canales es de 28 pS en solución fisiológica y 37 pS en solución de K^+ simétrica (Gallin. 1989). Se ha visto además que este canal se activa durante la oscilación de Ca^{++} inducida por activación de receptores P2Y con bajo contenido de ATP extracelular en el rango μM , en macrófagos humanos derivados de monocitos de sangre periférica (Hanley et al. 2004). También se ha encontrado que pueden ser activados por entrada de Ca^{++} a través de canales CRAC en la MP y parecieran estar estrechamente asociados a SOCE prolongando la entrada de Ca^{++} mediante hiperpolarización y facilitando así la recarga de Ca^{++} en RE en macrófagos humanos (Gao et al. 2010). El KCa3.1 indirectamente modula la proliferación de células T mediante su influencia en el influjo de Ca^{++} a través de canales SOCE (Srivastava et al. 2006). Ya ha sido ampliamente asociado el mecanismo SOCE - CRAC - KCa3.1 en células del SI como son los linfocitos T_H , pero poco se sabe de estos canales en células de la inmunidad innata. Entre los activadores farmacológicos de KCa3.1 se encuentran NS309, 1- EBIO e inhibidores como Charybdotoxina, Clotrimazole, TRAM-34, Bario y Quinina (Gallin et al. 1991,

Malik-Hall et al. 2000). Estos canales han sido asociados a la migración de leucocitos durante la RI y en la regulación de volumen celular (Schwab et al. 2007, Jensen et al. 1998). Existen evidencias que muestran que el bloqueo del canal KCa3.1 con Clotrimazole previene de la deshidratación en pacientes con anemia drepanocítica (Brugnara et al. 1996). Estos datos confirman la importancia de estos canales iónicos en la regulación del volumen celular. Trabajos como el de Dolga et al. (2012) proponen que estos canales podrían tener un efecto protector como reguladores de la activación de la microglia en neuroinflamación y neurodegeneración mediante la regulación del Ca^{++} citosólico, inhibiendo respuestas inflamatorias de la microglia, evitándose así el daño neuronal. Además se ha mostrado que el bloqueo de estos canales inhiben la respuesta inflamatoria en un modelo animal de EM como es el modelo EAE (del inglés: experimental autoimmune encephalitis) como fué estudiado en el trabajo de Reich et al. (2005). Por lo que la modulación de este canal podría ser un novedoso blanco para estrategias terapéuticas como ya fué propuesto por Lam et al. (2011).

KCa3.1

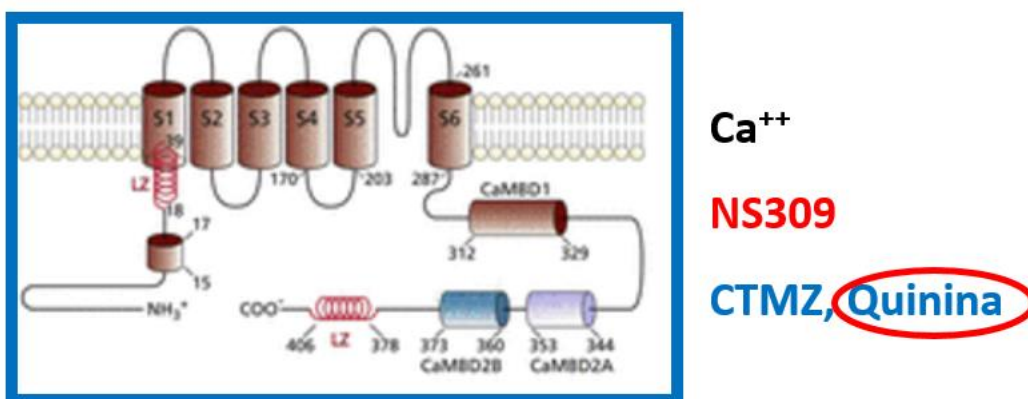


Figura 10. Estructura del canal KCa3.1 en la MP. Este canal se encuentra formado por seis dominios transmembrana, un poro entre S1 y S6 y un grupo amino (NH³⁺) y carboxilo terminal (COO⁻). Este grupo carboxilo lo hace muy sensible al Ca⁺⁺ siendo activados por aumento de Ca⁺⁺ y por NS309, e inhibido por IBTx y Quinina (Tomado de Morales et al. 2013).

sKCa

Se han encontrado estos canales en la MP de microglia y en la MIM de células de cobayo (Szabo et al. 2014). También se ha encontrado en monocitos y macrófagos THP-1 estudiados mediante electrofisiología con la técnica patch clamp en célula entera por DeCoursey et al. 1996 (Figura 8). Estos son canales con una conductancia menor que BKCa e KCa3.1 de 4- 14 pS en K^+ simétrico y es por esto que se lo denomina de pequeña conductancia. Tienen una gran sensibilidad siendo activados por aumento de Ca^{++} citosólico, pero insensible a las variaciones de V_m (Wei et al. 2005). Se encuentran abundantemente expresados en el SNC y en células del SI como son los linfocitos T (Kohler et al. 1996). Estan compuestos por seis dominios transmembrana con dominio amino (NH_3^+) y carboxilo (COO^-) terminal que le da una elevada sensibilidad al Ca^{++} (Xia et al. 1998) Figura 11. Estos canales son activados por NS309, 1- EBIO, D- CE BIO y son bloqueados por péptido de veneno de abeja, como es la apamina, toxina de escorpión scyllatoxina (Wei et al. 2005) y también son bloqueados por TEA, Bario y Quinina.

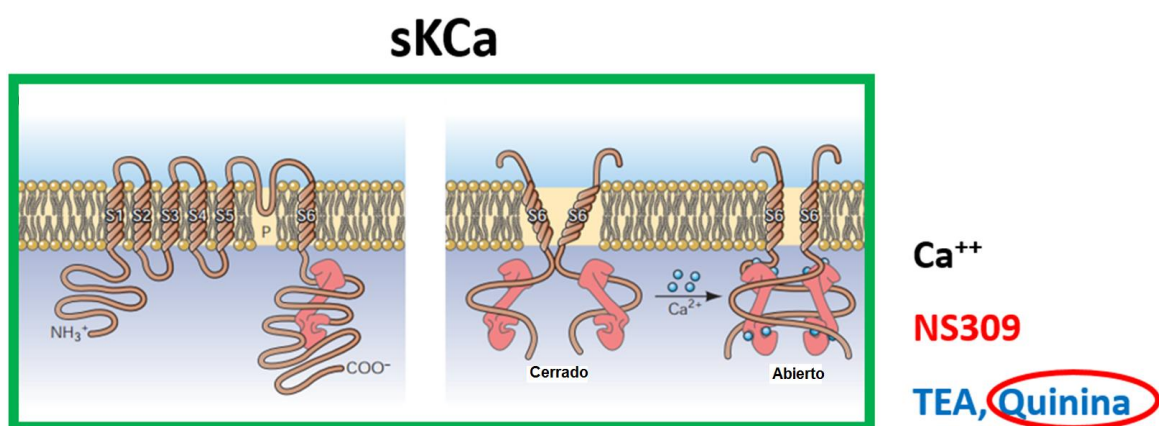


Figura 11. Estructura de canales sKCa en MP. Estos canales están formados por una subunidad α y subunidad β y seis dominios transmembrana, con un poro entre S5 y S6 y un grupo carboxilo terminal (COO^-) que los hace sensible al Ca^{++} y a calmodulina. Estos canales son activados por aumento de Ca^{++} e insensibles al cambio de V_m . Son además activados por NS309 e inhibido por Quinina y TEA (Tomado y modificada de Ledoux et al. 2006).

Trabajos como el de Dolga et al. (2012) proponen que estos canales son reguladores de la activación de la microglia en neuroinflamación y neurodegeneración. La regulación de la homeóstasis del Ca^{++} mediante estos canales, podría tener un efecto protector de respuestas inflamatorias por modulación de la activación de microglia evitándose así un daño neuronal. Por lo que la modulación de estos canales podría ser de gran utilidad en diversos desórdenes neurodegenerativos donde un proceso inflamatorio forma parte de la progresión de la enfermedad como ha sido propuesto por Dolga et al. (2012). Además los canales SK3 son los canales de K^+ activados por Ca^{++} más abundantes en neutrófilos y se lo ha asociado con la generación de NETs inducida independientemente de la enzima NADPH oxidasa presente en estas células (Douda et al. 2015). La generación de NETs se está estudiando mucho últimamente por su rol en LES como fué mencionado previamente. Por lo que la modulación de este canal podría ser un novedoso blanco para estrategias terapéuticas en LES y patologías neurodegenerativas entre otras. Entre las patologías inflamatorias en donde se ha visto juega un rol el IFM, está el LES.

Trabajos recientes sostienen que el complejo multiproteico caracterizado por el grupo pionero de Jurg Tschopp, denominado “inflammasoma” (IFM) (Schroder et al. 2010), se encuentra desregulado y tiene un rol clave en la patogénesis del LES (Kahlenberg et al. 2014, 2014b). Además en estudios preliminares con el antagonista del receptor de IL-1, Anakinra, se ha obtenido una buena respuesta clínica. Por lo que diversas evidencias sostienen un rol clave del IFM en la patogenia de la enfermedad del LES.

Lupus eritematoso sistémico

El LES es una enfermedad inflamatoria crónica multisistémica, que puede aparecer a cualquier edad pero afecta principalmente a mujeres jóvenes en edad gestacional activa entre 20 y 40 años, con una relación mujeres: hombres de 9:1 en adultez y con una relación menor en pediatría de 4:1 y de mayor gravedad (Tarr et al. 2015, Kamphuis et al. 2010, Webb R et al. 2011). Esta es una enfermedad autoinmune (EA) con presentaciones clínicas muy heterogéneas pudiendo ser desde leve a una enfermedad que lleve a la muerte, presentando una gran diversidad de manifestaciones clínicas con períodos de exacerbación y remisión (Tsokos et al. 2011; D’Cruz et al. 2007). Además los síntomas pueden solaparse con síntomas de otras patologías haciendo el diagnóstico un proceso complejo y un gran desafío para los clínicos. Esta patología se caracteriza por la formación de una elevada cantidad de autoanticuerpos, una alterada función de componentes de la vía del complemento, y un elevado depósito de inmunocomplejos (ICs) en diferentes partes del organismo (Tarr et al. 2015). Este depósito de ICs (unión de autoantígeno con auto-anticuerpo) lleva a algunas de las variadas manifestaciones clínicas del LES como son la nefritis, glomerulonefritis, proteinuria, afectación articular, artritis transitoria (a diferencia de en AR), fiebre, cansancio, úlcera de boca, disminución de peso, serositis (pleuritis y/o pericarditis), manifestaciones cutáneas, sarpullido en forma de mariposa (depósito de inmunoglobulinas y complemento en unión dérmico-epidérmica), afectación del sistema nervioso central (SNC), y de articulaciones pequeñas con un patrón inflamatorio, o erosiva de hueso provocando deformidad de articulaciones, y en algunas ocasiones trombosis. También se observan manifestaciones hematológicas causando citopenias frecuentes como son leucopenia, linfopenia, trombocitopenia, anemia, síndrome anti-fosfolipídico en 5 - 15 % de los pacientes con LES, abortos recurrentes, trombosis vascular, manifestaciones renales como glomerulonefritis entre otros. Es una patología que puede afectar a todos los tejidos del cuerpo, además de que

puede predisponer para el desarrollo de otras patologías inflamatorias graves como es la EM. La causa exacta del LES es desconocida, pero se cree que en la patogenia de la enfermedad de LES participan 5 grandes factores como se muestra en (Figura 12), 1) *Un componente hereditario o genético*, asociado a una mayor predisposición al desarrollo del LES, aunque en escasos casos el LES puede ser asociado con la deficiencia de un único gen asociado a componentes del sistema del complemento gen de C1q y C4 (Moser et al. 2009, Tsokos et al. 2000). Esta deficiencia en componentes del complemento favorecería a la disminución de la limpieza de células apoptóticas que pasarían a una fase de necrosis, un tipo de muerte celular más pro-inflamatoria. Diferentes estudios genómicos de asociación (GWAS) del inglés: “Genome-wide association studies”, apoyan que la patología de LES es el resultado de una combinación de alteraciones en un gran número de genes (Rhodes et al. 2008; Cooper et al. 1999). Se ha visto que la mayoría de los polimorfismos genéticos “SNPs” (del inglés: single nucleotide polymorphisms) asociados con LES se encuentran dentro de regiones de ADN codificantes de moléculas relacionadas con la respuesta inmune (Harley et al. 1998). Se han identificado SNPs asociados con el LES para genes cuyos productos podrían contribuir al funcionamiento anormal de las células T en LES CD3- ξ (Gorman et al. 2008) y PP2Ac (Tan et al. 2011). 2) Por otro lado, factores ambientales también parecieran predisponer al desarrollo de LES, destacándose la radiación UV e infecciones virales, como agentes gatilladores, compuestos químicos y drogas (Edwards et al. 2005). En el caso de infecciones virales, podría inducirse una respuesta autoinmune por mimetismo molecular. La radiación U.V. podría provocar daño de tejido aumentando así la exposición del sistema inmunitario (SI) a antígenos propios (auto-antígenos) 3) Un diálogo alterado entre componentes del SI, habitualmente denominado “cross-talk”, con fallas en el sistema de regulación linfocitario y una alteración en la cooperación de linfocitos T y B con la sobreproducción de anticuerpos contra antígenos propios, también se ha propuesto que juega un rol en el desarrollo de LES (Tsokos et al. 2011, D’Cruz et al. 2007. 4) También se ha asociado un componente hormonal, observándose una

gran influencia estrogénica, lo que hace que la enfermedad sea más prevalente en mujeres. Por otro lado, en LES se observa además una alteración en la remoción de remanentes celulares, llevando a que sean una fuente constante de autoantígenos y señales de daño (del inglés: damage associated molecular patterns “DAMPs”), promoviendo la formación de ICs, y producción de citoquinas pro-inflamatorias, como principales condicionantes que conducen a la pérdida de la auto-tolerancia. 5) También se ha asociado una componente epigenética al desarrollo de LES.

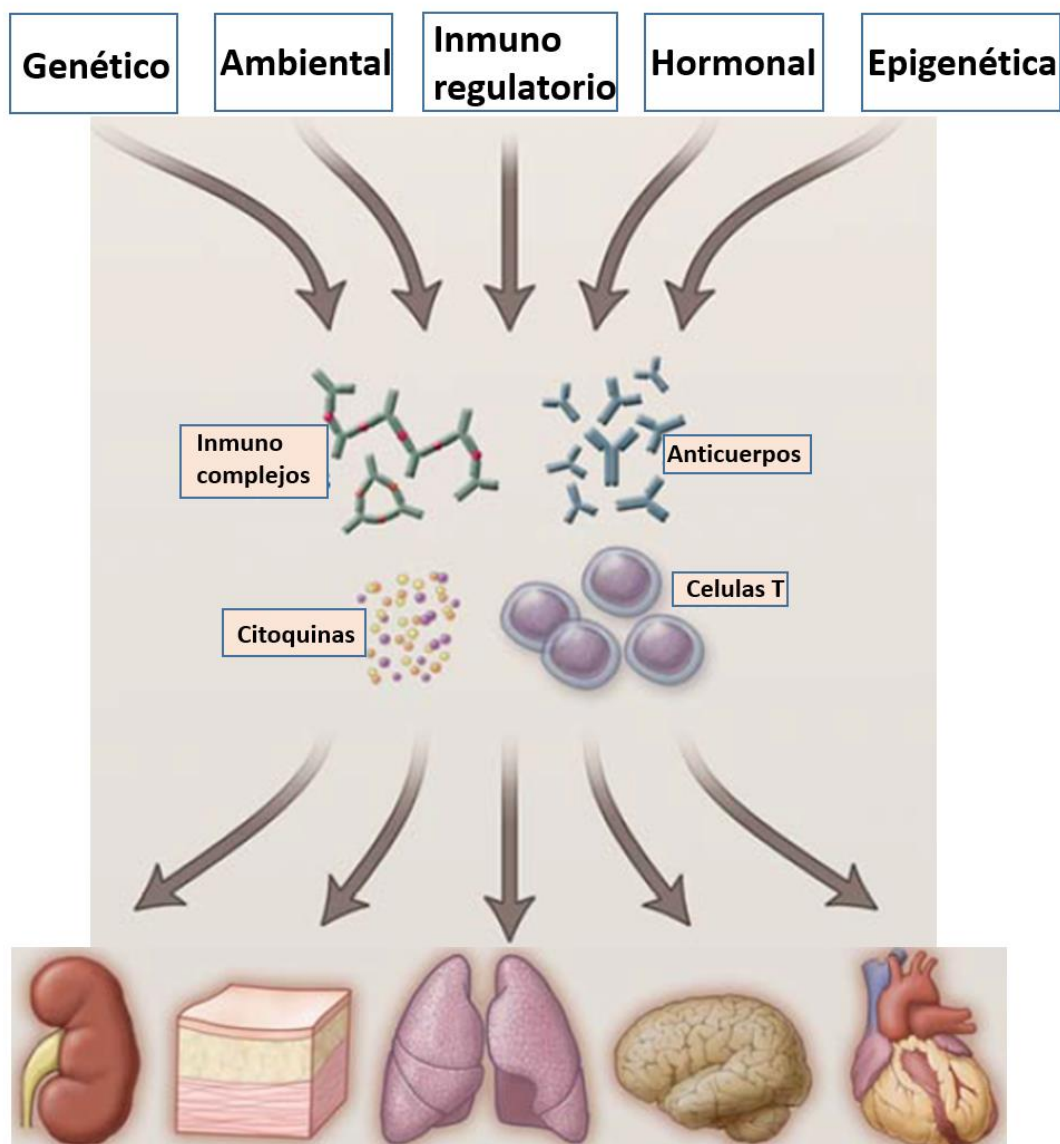


Figura 12. Se cree que en la patogénesis de la enfermedad de LES participan cinco grandes factores. Un componente genético, ambiental, alteración inmuno-regulatorio, hormonal y epigenético. Factores que actúan secuencialmente o simultáneamente en el SI. La acción de

estos factores patogénicos resultaría en la generación de autoanticuerpos, ICs, células T inflamatorias o autoreactivas, y citoquinas inflamatorias que pueden iniciar y amplificar la inflamación y dañar varios órganos (Tomado y modificado de Tsokos et al. 2011).

Etiopatogenia del LES

La etiopatogenia del LES es compleja, pero entre los componentes que se han propuesto que juegan un rol en su etiopatogenia, se encuentran las células necróticas que liberan autoantígenos como ARN, ADN de doble hebra y HMGB1 (del inglés: “high mobility group box 1), células dendríticas plasmocitoides (pCDs) que una vez activadas por autoantígenos, liberan IFN- α , células T y B autoreactivas generadoras de autoanticuerpos, antígenos unidos a autoanticuerpos denominados “inmunocomplejos”, neutrófilos y la liberación de redes extracelulares de cromatina con contenido intracelular de neutrófilos denominados “NETs” (del inglés: neutrophil extracellular traps) donde se liberan redes de cromatina intracelular con contenido nuclear y citosólico de los neutrófilos (Figura 13).

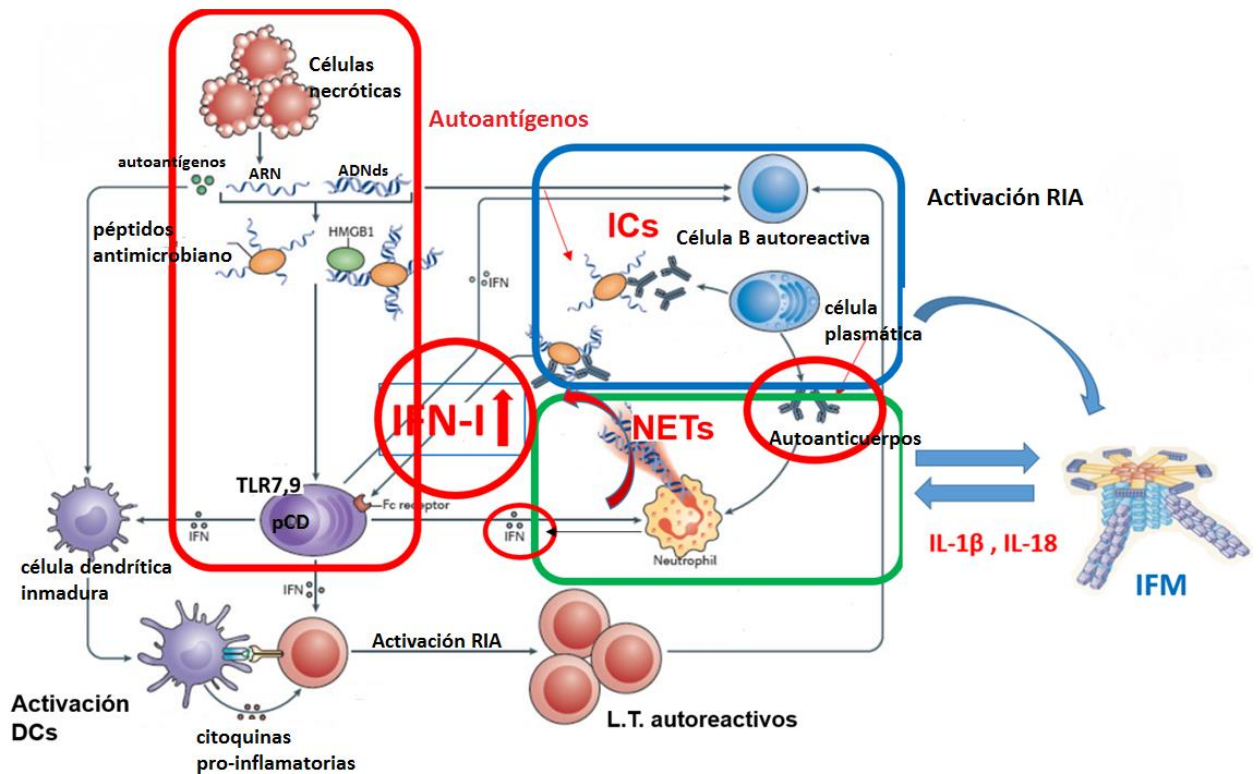


Figura 13. Etiopatogenia del LES. La acumulación de células apoptóticas deficientemente removidas debido a una deficiencia en la remoción de estas debido a una deficiencia en la función fagocítica de los macrófagos y de los componentes del complemento C1q y C4. Esta deficiencia favorecería la acumulación de células apoptóticas que al no ser removidas pasan a una fase de necrosis con liberación de una gran cantidad de auto-antígenos del interior celular como son las moléculas de ARN, ADN y HMGB1. Estos autoantígenos estimulan la activación de células dendríticas plasmocitoides (pDC) por reconocimiento de estos autoantígenos mediante receptores de tipo Toll (TLR 7 y 9). Las pCDs activas secretan interferón de tipo I (IFN-I) que tiene múltiples blancos celulares como son las células dendríticas inmaduras (CDs), que en presencia de IFN- I y autoantígenos pueden ser activadas y promover la ruptura de la tolerancia inmunológica. Las pCDs activas podrían promover la activación de células dendríticas mieloides (mDCs), y estas la activación de células T autoreactivas. Estas últimas en presencia de un ambiente inflamatorio son capaces a su vez de activar los linfocitos B autoreactivos, que previamente se encontraron con autoantígenos, ser activados y diferenciarse a células plasmáticas secretoras de autoanticuerpos . La generación de una gran cantidad de autoanticuerpos e ICs es característico de LES, que podrían promover la activación de los neutrófilos y la generación de redes extracelulares de ADN (NETs). El IFN- I también promueve la liberación de NETs y a su vez la generación de autoanticuerpos por las células B autoreactivas que fueron previamente activadas por las células T. Las NETs y los ICs favorecen además la activación de un complejo multiproteico denominado “inflammasoma” (IFM) generándose así un ciclo vicioso entre todos los factores proteicos y celulares mencionados previamente como se muestra en la Figura 3 (Tomado y modificado de Liu et al. 2012).

Deficiencia en la remoción de células necróticas en el LES

En el LES se cree que los diferentes tipos de muerte celular “suicida” como apoptosis, necrosis y las NETosis contribuyen a que haya una fuente constante de autoantígenos con un rol en la etiología y patogenia del LES (Ippolito et al. 2011, Bouts et al. 2012, Mahajan et al. 2016). La apoptosis, es un tipo de muerte que en condiciones normales se da de una manera altamente organizada, intentando mantener la integridad de la membrana celular el mayor tiempo posible, evitando así el derramamiento de autoantígenos, previniéndose que estas células pasen a una fase de necrosis, siendo esta pro-inflamatoria debido a que es acompañada de una ruptura de membrana celular. La ruptura de la membrana celular hace que sean una fuente potencial de autoantígenos nucleares que son típicamente reconocidos por autoanticuerpos en pacientes con LES (Bilyy et al. 2012). Normalmente cuando una célula hace apoptosis *in vivo*, es reconocida, ingerida, y rápidamente degradada en una manera “inmunológicamente silenciosa”. Para esto las células apoptóticas exponen y secretan diferentes señales en la MP del lado del medio extracelular, con el fin de ser rápida y eficientemente ingeridas por fagocitos profesionales como son los macrófagos, capacitados para ingerir las células moribundas en presencia de señales como es la fosfatidilserina (Peter et al. 2010, Voll et al. 1997, Fadok et al. 2001, Shao et al. 2011, Hochreiter-Hufford et al. 2013). Una vez fagocitados los restos apoptóticos, los fagocitos liberan citoquinas anti-inflamatorias como la interleuquina- 10 (IL- 10), facilitándose así una respuesta de tolerancia hacia componentes propios (Voll et al. 1997). Entre los autoantígenos liberados se encuentran patrones moleculares asociados a daño (PAMPs) del (inglés: pathogen associated molecular patterns) y DAMPs (del inglés: damage associated molecular patterns) entre ellas HMGB1, ATP, ácido úrico, y ácido hialurónico, siendo estos posibles activadores de la respuesta inmune, como se da en el LES (Rehman et al. 2001., Henson et al. 2006., Ravichandran et al. 2007.,

Savill et al. 1997). Los macrófagos derivados de monocitos (MDM) encontrados en pacientes con LES tienen una reducción en la capacidad fagocítica, característica de los fagocitos profesionales. Estos macrófagos muestran un tamaño disminuido y una capacidad disminuida en comparación con células aisladas de la sangre de donores sanos (Hermann et al. 1998). En el LES hay una remoción insuficiente de células post-apoptóticas, por darse un defecto en la fagocitosis realizada por los macrófagos. Estos macrófagos han sido denominados “lazy macrophages” (Muñoz et al. 2005). Por otro lado, se ha visto en el LES que también hay deficiencias en la proteína del complemento C1q, siendo esta proteína fundamental para la remoción de células apoptóticas. Esto se da por reconocimiento mediante receptores del sistema del complemento en células fagocíticas como son los macrófagos y neutrófilos (Mayadas et al. 2009, 2014). De esta manera se contribuiría a la disminución de la limpieza de células apoptóticas, siendo estos defectos jugadores claves en el desarrollo y mantenimiento del LES (Lu et al. 2008, Roumenina et al. 2011). La elevada exposición de autoantígenos al sistema inmunitario innato (SII), podría inducir su activación, dándose un ambiente pro-inflamatorio para la activación de células del sistema inmune adaptativo (SIA) como son los linfocitos T y linfocitos B autoreactivos que puedan estar presentes. Una reducción en la eliminación de células apoptóticas podría llevar a un proceso inflamatorio y a una producción de autoanticuerpos a partir de la activación del SIA (Vermes et al. 1997, Wu X et al. 2001, Kono et al. 2008, Urbonaviciute et al. 2008). Además durante la fagocitosis de células necróticas mediada por células fagocíticas como son los macrófagos, se secretan citoquinas pro-inflamatorias como son la IL- 1 β , IL- 18, IL- 8, IFN- α , TNF- β , promoviéndose así la inflamación, que contribuiría así a un aumento de daño en los tejidos (Muñoz et al. 2009). De esta manera podría inducirse la formación de los ICs circulantes característicos de la enfermedad de LES. Los ICs generados al unirse y acumularse en tejidos, o depositarse en la piel o en la micro-circulación generan el daño característico en estos sitios (Muñoz et al. 2010). La acumulación de autoantígenos podría inducir la activación de pCDs por reconocimiento de estos a través de

receptores de tipo Toll (TLR) en el interior de estas células presentadoras de antígenos (APCs) cuando los autoantígenos son endocitados. También podrían activarse a través del reconocimiento de la región Fc de los ICs, ya que las APCs tienen receptores de tipo Fc en la MP. La activación de las pDCs podría activar la secreción de IFN- α característico del LES, llamada también “interferonopatía” como es mencionado en el reciente trabajo de (Hagberg et al. 2015). Por otro lado una deposición de ICs y activación de procesos inflamatorios, podría llevar a que haya un severo daño orgánico que favorecería el ciclo vicioso de acumulación de células necróticas secundarias llevando al desarrollo de la enfermedad de LES (Figura 15). En LES, el proceso de apoptosis que en condiciones normales era “silencioso inmunológicamente”, se vuelve una fuente de autoantígenos dañinos y señales inmunoestimuladoras propensa a sostener respuestas autoinmunes crónicas. Mientras que en individuos sanos algunas de las células apoptóticas que siguen una necrosis secundaria, son rápidamente degradadas y removidas asegurando así el mantenimiento del estado de tolerancia inmunológica (Gaipl et al. 2003, Rekvig et al. 2012, Gaipl et al. 2004).

En resumen, la Figura 13 del LES, muestra que la combinación de un ambiente pro-inflamatorio debido a una gran cantidad de muerte celular por necrosis, debido a una limpieza defectuosa de células moribundas y la liberación de autoantígenos llevaría a la activación de APCs como son las CD_s y pCD_s, llevando a una ruptura de la tolerancia a lo propio, con la consecuente activación de linfocitos T autoreactivos presentes en periferia. Estas células T autoreactivas podrían a su vez activar a las células B autoreactivas generadoras de autoanticuerpos que se encontraron con autoantígenos como son HMGB1, ADN de doble hebra (ADNds) y ARN de las células necróticas. Los autoanticuerpos generados al unirse a los autoantígenos, formarían los ICs, siendo estos promotores del daño a nivel sistémico que se observa en esta patología.

NETosis en LES

Últimamente se está estudiando mucho el rol de las “NETs” en el desarrollo de enfermedades autoinmunes como el LES (Darrah et al.2012, Kahlenberg et al. 2013). Los neutrófilos son los granulocitos más abundantes en la sangre, siendo cruciales en la primer línea de defensa inmunológica contra infecciones microbianas. En condición de estrés o inflamación, se induce un aumento de neutrófilos en la circulación y en presencia de mediadores pro-inflamatorios como la citoquina IL-1 β , se favorecería el reclutamiento de estos a los sitios inflamatorios por diferentes tipos celulares como son los macrófagos residentes en los tejidos, mastocitos residentes y células endoteliales y su activación. Los neutrófilos que migran desde los vasos sanguíneos al sitio de daño, tienen la capacidad de fagocitar restos celulares, desgranular moléculas antimicrobianas, y secretar citoquinas pro-inflamatorias (Halbwachs-Mecarelli al. 2000, Eyles at al. 2006, Kaplan et al. 2011). Luego de realizar sus funciones, como es la remoción de células muertas, los neutrófilos pueden sufrir apoptosis y ser fagocitados por macrófagos residentes del tejido (Iba et al. 2013, Amulic et al. 2012, Kolaczowska et al. 2013). En años recientes se ha visto que los neutrófilos pueden además seguir otro tipo de muerte celular programada denominada “NETosis” que fué inicialmente estudiada por Brinkmann et al. 2004. En este tipo de muerte, las células son capaces de formar redes extracelulares de ADN denominadas “NETs” (del ingles: neutrophil extracellular traps “NETs”) formadas por componentes del interior celular de los neutrófilos, con moléculas antimicrobianas. Las NETs consisten en cromatina modificada, asociada a gránulos y proteínas citoplasmáticas como son la lactoferrina y mieloperoxidasa (MPO). La NETosis y el reclutamiento de neutrófilos también puede ser inducida por citoquinas pro-inflamatorias como son la IL- 1 β e IL- 8. Se ha visto que los ICs conteniendo ADNds son fundamentales en LES y se ha propuesto que las NETs favorecen la formación de estos ICs, así como los ICs favorecen la formación alterada de NETs, además de una remoción disminuída de estos

(Kaplan et al. 2011). Consistentemente, se ha encontrado que los niveles de NETosis en la periferia así como en los tejidos se correlacionan con títulos elevados de anticuerpos anti ADNds (Padhan et al., 2004). Las NETs están compuestas por ADN y son propensas a ser degradadas por una enzima presente en la sangre, la DNasa-1. En el caso de pacientes con LES, se ha observado una deficiencia en la actividad de esta enzima y se ha asociado con una disminución en la degradación enzimática de restos de ADN celular, en aproximadamente un tercio de los pacientes con LES. Esta deficiencia en la enzima DNasa-I pareciera ser el resultado de anticuerpos inhibidores de DNasa-I, y variaciones genéticas (Hakkim et al. 2010, Chitrabamrung et al. 1981, Munoz et al. 2005, Lu et al. 2008). Se ha relacionado niveles aumentados de anticuerpos anti nucleares, anti-NETs y una elevada prevalencia de nefritis lúpica (Ref). La formación aberrante y a la vez remoción reducida de las NETs podría inducir la activación de las células pDCs, llevando a la exacerbación de la enfermedad y a la disfunción endotelial observada en esta patología (Kaplan et al. 2013; Nemeth et al. 2012). Las NETs al ser una fuente de autoantígenos potenciales podría además contribuir a la pérdida de tolerancia a los autoantígenos expuestos en las NETs. Se ha visto que muchos pacientes con LES presentan en suero anticuerpos que reconocen autoantígenos presentes en neutrófilos, componentes de las NETs como son la enzima mieloperoxidasa (MPO), lactoferrina (LL-37) (Darrah et al. 2012). Además estos autoanticuerpos promueven la producción de IFN- α por las pCDs y por lo tanto contribuirían a la “interferonopatía” característica del LES. La NETosis va acompañada de la liberación de componentes intracelulares dañinos como son las proteínas de shock tóxico, histonas modificadas, o HMGB1. Estas proteínas intracelulares son capaces de activar las CD y por lo tanto desafiar la inmuno-tolerancia (Urbonaviciute et al. 2011). Los neutrófilos podrían secretar citoquinas pro-inflamatorias y factores capaces de activar los linfocitos B tal como el factor activador de plaquetas (PAFF), si estos son activados por ICs, Figura 14.

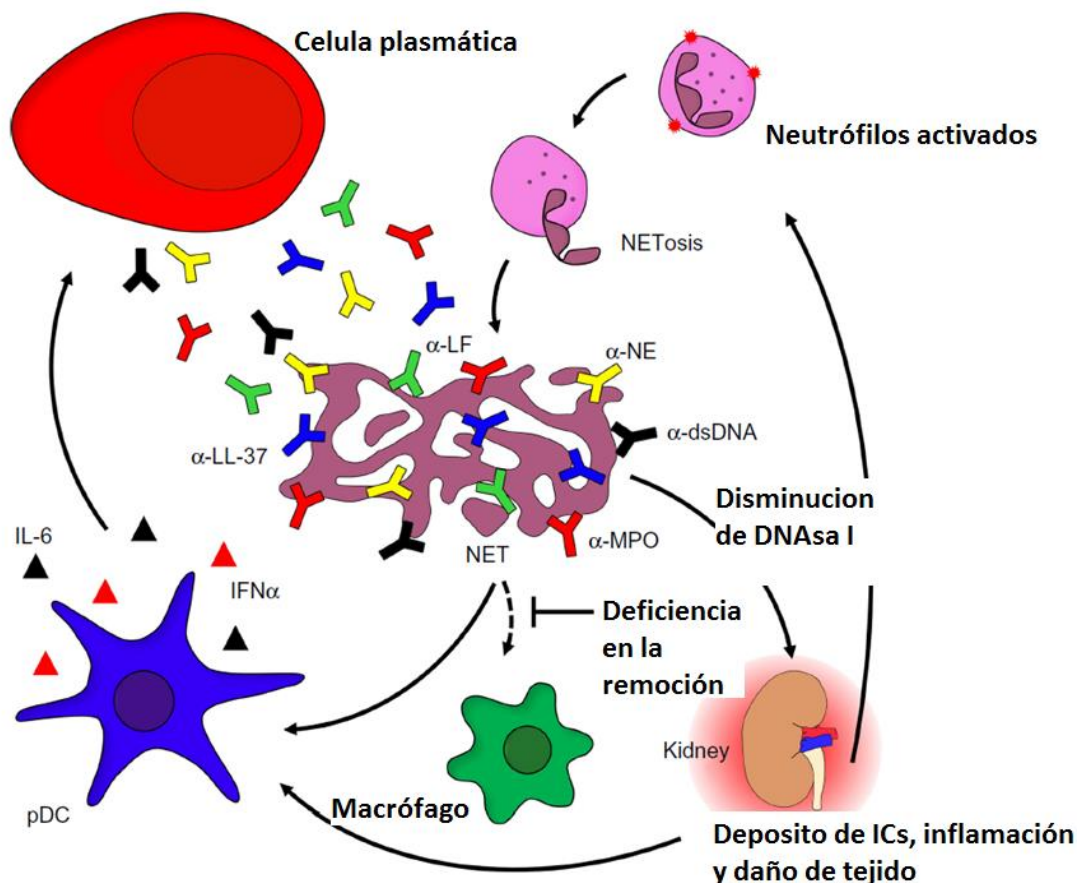


Figura 14. Rol de lo neutrófilos en la etiopatogenia de SLE. Los neutrófilos al ser activados liberan NETs, exponiendo autoantígenos del interior celular como MPO y LL-37, quienes favorecerían la formación de α - NE, α - LF, α - MPO, o α - LL-37. Una disminución de la actividad de la DNasa- I, combinada con una deficiencia de la limpieza de las NETs, llevaría a la acumulación de NETs cubiertos con anticuerpos dirigidos contra estas proteínas. La opsonización de NETs con autoanticuerpos lleva a la formación de ICs seguido por una disminución de la remoción de la actividad fagocítica de la sangre. Este proceso causa inflamación y daño del tejido, y estimula a las pCDs a secretar IFN- α e IL- 6, resultando así en la llamada "IFN- α signature" típico del LES. Las citoquinas pro-inflamatorias secretadas por pCDs inducen la producción masiva de auto-anticuerpos. Abreviaciones: α - NE, anticuerpos anti neutrófilo elastasa; α - MPO, anticuerpos anti- mieloperoxidasa; α - LF, anticuerpos anti- lactoferrina LL- 37; NETs neutrophil extracellular trap; IFN- α , interferón alfa; IL- 6, interleuquina 6; pCDs, células dendríticas plasmocitoides; NETosis, de neutrophil extracellular trap formation; M Φ : macrófagos (Tomado y modificado de Podolska et al. 2015)

Las NETs tienen un rol dual en la inflamación, promueven el proceso inflamatorio por exposición de autoantígenos al medio extracelular, pero son también importantes para

resolver la inflamación siendo capaces de atrapar citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, que luego son degradadas, limitando así la respuesta inflamatoria (Schauer et al. 2014).

APCs en la respuesta inmune adaptativa y tolerancia periférica

Las CD_s parecieran tener un rol fundamental en el desarrollo del LES siendo dos grandes poblaciones: células dendríticas mieloides (mCD_s) y células dendríticas plasmocitoides (pCD_s). Las mCD_s se encuentran en todo el cuerpo y cumplen la función de “inmunovigilancia”, siendo claves en el perfil de las respuestas inmunes adaptativas. Para la generación de la RIA es necesario la activación de las APCs como las mCD_s. Estas células pueden ser activadas por DAMPs o por PAMPs. Las APCs son capaces de capturar antígenos y activarse por reconocimiento de estos antígenos a través de los receptores TLR. Esto podría llevar a su activación y maduración, aumentando la expresión de moléculas co-estimuladoras en su MP, como son CD80, CD86, y CD40, siendo estas proteínas necesarias para la activación de células del SIA como los linfocitos T. Las APCs al ser activadas son capaces de activar las células T vírgenes autoreactivas en un contexto pro-inflamatorio, presentando los auto-antígenos en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (del inglés: “major histocompatibility complex”) y en presencia de señales de co-estimulación en un contexto pro-inflamatorio de citoquinas. De esta manera las APCs podrían activar células T vírgenes diferenciándose así a células T efectoras y células T de memoria. En caso de que las APCs se encontraran con la célula T virgen sin señales de co-estimulación, estas podrían inducir a que estas células T se diferenciaran a un fenotipo inmunoregulador como son los linfocitos T reguladores (Treg), promoviéndose la tolerancia periférica. Entonces las mCD_s procesan y

presentan los antígenos a células T vírgenes promoviendo la inmuno estimulación o inmunotolerancia dependiendo de muchos factores entre ellos, el microambiente que rodea esta interacción como la presencia de citoquinas pro-inflamatorias, como IL- 1 β o anti-inflamatorias como la interleuquina-10 (IL- 10). La activación de las APCs acompañada por la secreción de niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias como son la IL- 1 β , IL- 12, IL- 6 y TNF- α , permite a las APCs dirigir a las célula T hacia un fenotipo efector (Blanco et al. 2008, Valmori et al. 2010). En el LES las células CD8 maduras podrían presentar antígenos propios a las células T en un contexto inflamatorio donde está presente la IL- 1 β , llevando a su diferenciación en células de tipo T efector como las Thelper folicular (Th) y (Th17), e inhibir el desarrollo de linfocitos Treg que tiene un rol fundamental en la tolerancia periférica por su capacidad inmunosupresora, como la liberación de TFG- β , IL- 10 (Robinson et al. 2015, Campbell et al. 2011, Sakaguchi et al. 2018, 2010). Se han encontrado deficiencias en número y función de las células Treg en pacientes con LES (Bonelli et al. 2008, Lyssuk et al. 2007). Por otro lado, las APCs inmaduras son cruciales para el mantenimiento de la tolerancia específica de epítotope. Cuando estas presentan el antígeno en ausencia de co-estimulación a células T, pueden inducir a que estas células entren en un estado de anergia y desarrollo de células Tregs promoviéndose así una respuesta tolerogénica (Banchereau et al. 1998). En el contexto de LES, las mDCs presentan macromoléculas modificadas en una manera inmunogénica y desafían la tolerancia contra auto antígenos nucleares.

Por lo que se podría decir que las células las APCs, así como las citoquinas que estas generan son fundamentales para la ruptura de la tolerancia a lo propio durante la respuesta inmune adaptativa de patologías inflamatorias como el LES.

ICs - NETs - IFM- LES

Este IFM, se encuentra presente en APCs como son las CD_s y macrófagos, pero también se encuentra presente en otros tipos celulares como las neuronas y células epiteliales. Las APCs juegan un rol central en el proceso inflamatorio siendo capaces de orquestar respuestas inmunes efectoras, al tiempo que disponen también de potentes estrategias capaces de regular el desarrollo del proceso inflamatorio y de la RIA. Diferentes líneas de evidencia sostienen que el IFM tiene un rol fundamental en la promoción de daño orgánico mediando un posible “diálogo” entre desencadenantes ambientales y el desarrollo de la enfermedad de LES (Kahlenberg et al. 2014; Zhao et al. 2013; Zhang et al. 2013; Shin et al. 2013; Sims et al. 2010).

Por otro lado estudios recientes en modelos animales de LES han demostrado que la vía NLRP3/ASC/Caspasa-1 juega un papel crítico en el desarrollo del LES, así como en la disfunción vascular asociada a esta enfermedad (Kahlenberg et al. 2014; Zhao et al. 2013, Zhang et al. 2013). Trabajos como el de Zhao et al. (2013) muestra que la severidad de la enfermedad así como los anticuerpos anti-ADN característicos de la patología LES, disminuyen en el modelo murino de LES como es MLR/lpr al bloquear el inflamasoma NLRP3 (Nod-like receptor P-3). En monocitos humanos, los autoinmunocomplejos conteniendo ADNds inducen la producción de IL-1 β de manera dependiente al inflamasoma NLRP3 (Shin et al. 2013). De manera interesante, determinados SNPs en genes codificantes para proteínas del IFM han sido asociados a la predisposición a padecer LES (Pontillo et al. 2012). Además un estudio preliminar mostró que el bloqueo de la acción de IL- 1 con el antagonista del receptor R1 recombinante Anakinra, logró mejoría clínica y serológica en pacientes con LES (Ostendorf et al. 2005). Por lo que son variadas las evidencias que llevan a pensar en un rol del IFM en la patogenia del LES. Trabajos como el de Kahlenberg et al. (2013, 2014b) proponen que la formación del IFM es estimulado por las NETs como lo muestra la Figura 3. Por otro lado en el trabajo de Lande et al. (2011) se

propone que las NETs juegan un rol patogénico en LES, siendo estas liberadas espontáneamente por un grupo de neutrófilos lúpicos, contribuyendo así a la formación de ICs, y a la síntesis de IFN- I. Además de esto, se ha visto que las NETs activan a la Caspasa- 1, resultando de la liberación de IL- 1 β e IL- 18, siendo esta activación potenciada en macrófagos derivados de pacientes con LES. En este sentido, se ha visto que la IL-18 liberada de estos macrófagos inducen NETosis y un ciclo de activación del IFM y de liberación de NETs (Kahlenberg et al. 2013).

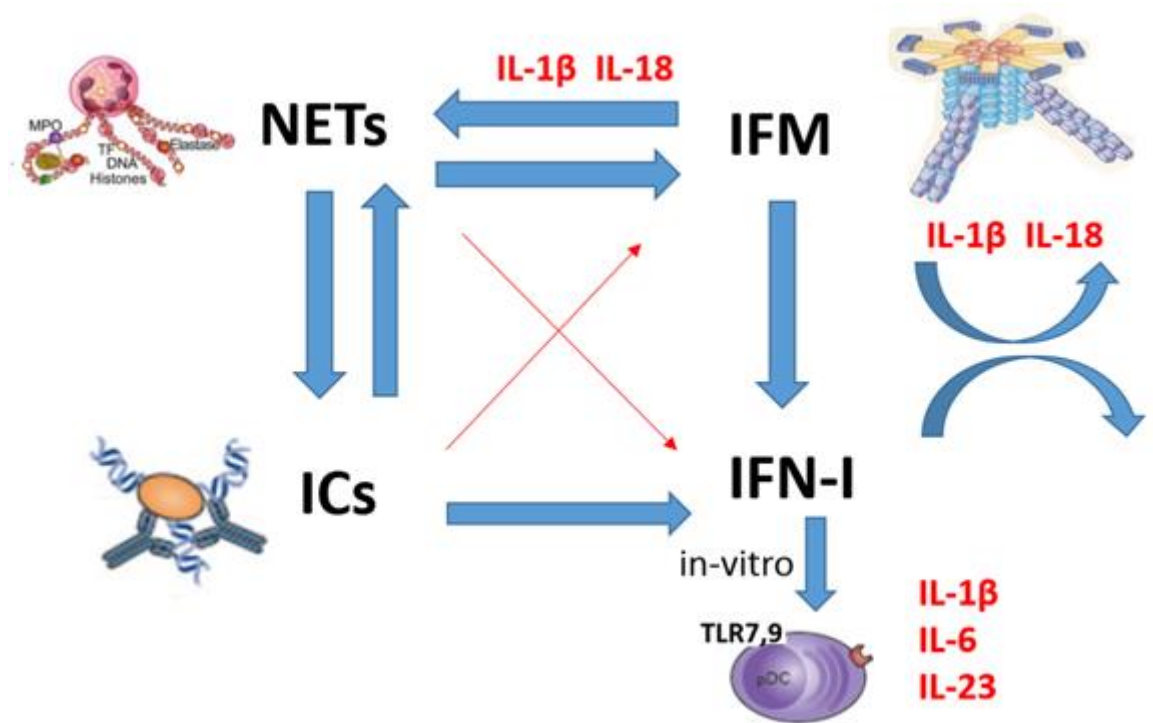


Figura 15: Ciclo vicioso ICs – NETs – IFM – IFN-I. Las NETs generadas en los neutrófilos promoverían la generación de ICs, y estos la generación de NETs. A su vez la citoquina IL- 1 β , e IL- 18 generadas por la activación del IFM promoverían la generación de NETs, y éstas la activación del IFM para generar más IL- 1 β e IL- 18. Además estas citoquinas junto con los ICs, promoverían la activación de las pDCs que a su vez generarían más IL- 1 β e IFN- 1. Referencias: ICs (Inmunocomplejos), NETs (del inglés: neutrophil extracellullar traps), IFM (Inflamasoma), IFN (interferon), IL (interleuquina).

Inflamasoma

Los inflamasomas (IFMs) forman parte de la respuesta inmunitaria innata (RII), y se conocen diferentes tipos en función de los componentes que los forman NLRP1, NLRP3, NLRC4, NLRP6, NLRP12, AIM2, pero uno de los más conocidos es el NLRP3, debido a su participación en la RI, ante una gran variedad de estímulos provenientes de microorganismos e inflamación estéril. El nombre del IFM enfatiza su rol en la inflamación y describe el hecho de ser el formador de un gran complejo proteico, soma nombre griego que significa cuerpo. Estos son complejos multiproteicos citoplasmáticos son capaces de sensor PAMPs como LPS y DAMPs como ATP. Los IFM están compuestos por una proteína sensora de tipo AIM2 o NLR (dominio de unión a nucleótidos repetidos ricos en leucina) y una proteína adaptadora ASC conteniendo un dominio CARD, que una vez ensamblado en respuesta a PAMPs/DAMPs, son capaces de reclutar y convertir el zimógeno inactivo de pro- Caspasa-1 en Caspasa- 1 (Vanaja et al. 2015, Lamkanfi et al. 2012). Se cree que estos estímulos inducen uno o más eventos celulares y estos son los que llevan a la activación del inflamasoma NLRP3. Una vez activado NLRP3, es capaz de convertir la forma inactiva pro- Caspasa-1 en Caspasa - 1. La Caspasa- 1 es una cisteín proteasa capaz de clivar y activar los precursores inactivos de citoquinas pro - inflamatorias como son la pro -IL-1 β y pro -IL-18 a IL -1 β e IL -18. La activación y secreción de IL -1 β se encuentra finamente regulada, ya que su síntesis descontrolada podría tener devastadoras consecuencias en el hospedero. Para la activación del IFM el **primer estímulo “priming”** es necesario para la activación del factor de transcripción NF- κ B (del inglés: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer) y puede darse por unión de diferentes señales de peligro PAMPs/DAMPs, a receptores como los receptores TLR y/o receptores de tipo CLR o RLR (ej. LPS a TLR4) presentes en las APCs (Figura 16). La unión de estos ligandos induce la activación de NF- κ β , y la expresión del precursor ARN mensajero (ARNm) de IL- 1 β , e IL- 18 y de componentes de NLRP3. Este priming es necesario, ya que la pro-IL- 1 β no se expresa

constitutivamente y el nivel de expresión de NLRP3 es crítico para la activación del IFM. Luego es necesario un **segundo estímulo “activador”** donde el NLRP3 se oligomeriza en respuesta a diferentes señales de peligro PAMPs/DAMPs, reclutando la molécula adaptador ASC que interactúa con la pro- Caspasa-1 y NLRP3 una vez activa, activa la Caspasa- 1 por clivaje proteolítico (Figura 16). La Caspasa- 1 posteriormente activa el precursor de la IL - 1 β (Figura 16). El inflamasoma NLRP3 es activado por una gran variedad de estímulos, como son el ATP (liberado del interior células dañadas), toxinas formadoras de poros en la membrana plasmática (MP) con actividad ionóforo (ej: nigericina), cristales de aluminio y colesterol, SiO₂, especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) entre otros (Wen et al. 2013; Mariathasan et al. 2006; Compan et al. 2012; Zhong et al. 2013; Hornung et al. 2008; Perragaux et al. 1994; Duewell et al. 2010; Fubini et al. 2003). Todavía no está claro cómo estímulos tan variados activan el inflamasoma NLRP3 y por esto se cree que en lugar de interactuar directamente con el NLRP3, los diferentes activadores generan una señal de estrés celular, siendo ésta la que induce su activación. Entre los mecanismos propuestos para la activación de NLRP3, algunos trabajos sugieren diferentes mecanismos. Entre estos se encuentran la salida de K⁺ hacia el medio extracelular, la generación de especies reactivas de oxígeno a nivel mitocondrial (mROS), la translocación de NLRP3 a la mitocondria, la desestabilización de la membrana fagolisosomal y liberación de catepsinas, entre ellas la Catepsina B, y ADN mitocondrial al citosol (Petrilli et al. 2007, Zhou et al. 2011; Sorbara et al. 2011). En un **tercer paso** la IL-1 β madura es secretada en el espacio extracelular. A diferencia de la mayoría de las citoquinas, la proteína IL-1 β no contiene un péptido señal de secreción y es retenida en el citoplasma luego de su producción en una forma activa, su mecanismo de secreción ha sido discutido en (Andrei et al. 2004). Trabajos recientes, sostienen que el IFM probablemente es importante en el inicio del tercer paso, la secreción, pero todavía no está claro cómo el IFM está implicado en este mecanismo en donde la IL- 1 β es liberada de las células, pero se habla de un tipo de muerte celular programado diferente a la apoptosis y

necrosis denominado “piroptosis” (Wan-ting-He et al. 2015, Shi et al. 2016, Kepp et al. 2010).

Trabajos como el de Magna et al. (2015), han asociado la piroptosis y la patogénesis de SLE.

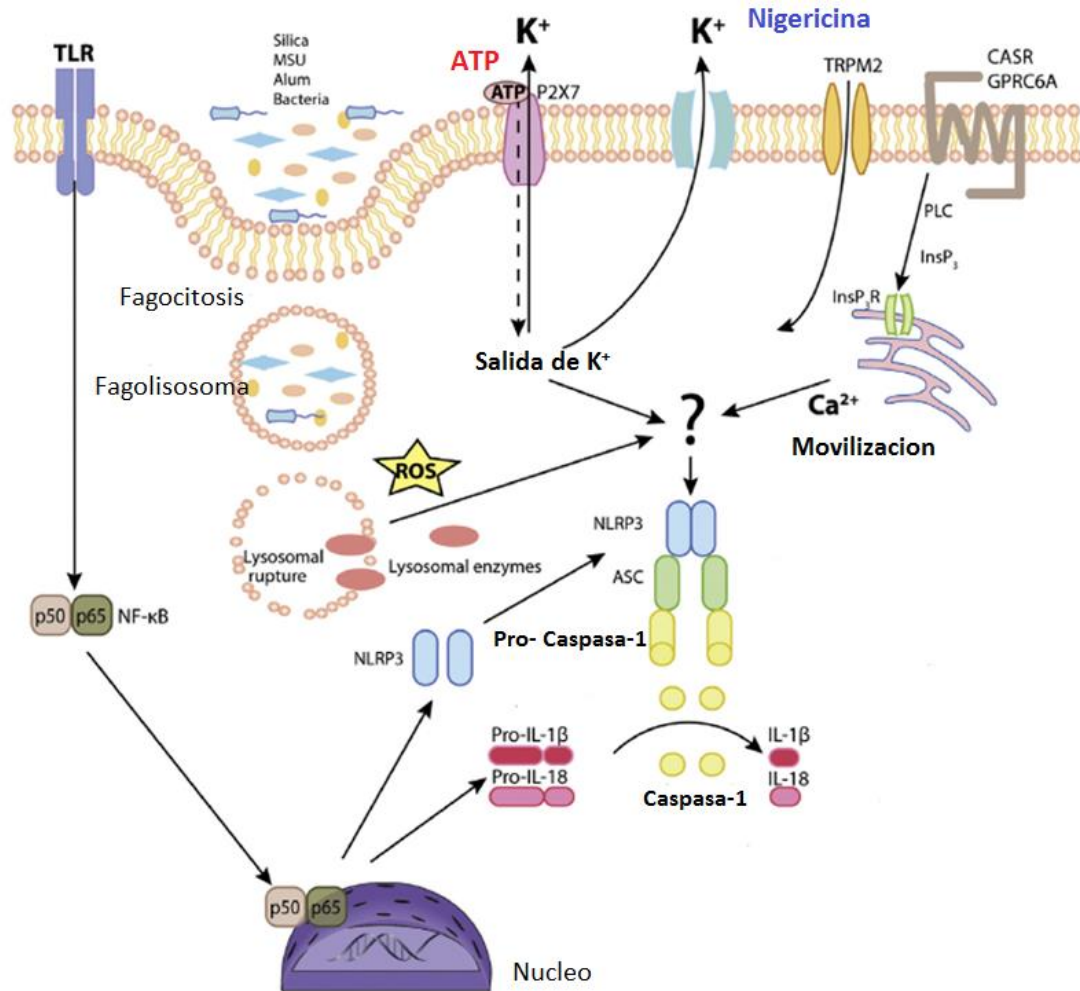


Figura 16. Mecanismo de activación del inflamasoma NLRP3. La activación de NLRP3 requiere de dos señales. La primer señal de (priming) debe ser un estímulo activador de NF-KB, tal como es inducida por el LPS al unirse a TLR 4. Esto llevaría a un aumento en la expresión de los componentes de NLRP3. Los niveles de estos componentes son importantes para la activación del IFM, así como de la pro- IL-1β y pro- IL-18. Luego es necesaria una segunda señal que active e induzca el ensamblaje del complejo multiproteico NLRP3. Los estímulos de activación del NLRP3 más ampliamente aceptados incluyen: la liberación de componentes mitocondriales al citosol como son las especies reactivas de oxígeno (ROS), ADN mitocondrial, cardiolipina. La salida de K⁺ a través de canales iónicos como P2X7, y por poros artificiales como es la Nigericina. El aumento del Ca⁺⁺ citosólico por liberación de este ion desde el retículo endoplasmático (RE) o por ingreso a través de canales TRP. Estudios recientes han determinado que NLRP3 una vez activado actúa como un andamio nucleando proteínas ASC a

través de interacciones PYD-PYD, siendo esto necesario para el reclutamiento de la pro-Caspasa- 1 a través de interacciones CARD-CARD, permitiendo así la activación autoproteolítica de la pro- Caspasa- 1. La Caspasa- 1 una vez activa puede activar la pro- IL-1 β y pro- IL-18 para generar las formas biológicamente activas (*Tomado y modificado de Lawlor et al. 2014*).

Se tiene poco conocimiento de la muerte por piroptosis al día de hoy, pero se ha propuesto que es un tipo de muerte celular programada dependiente de la activación de la Caspasa- 1. Esta enzima Caspasa-1 pareciera ser capaz de activar una proteína denominada Gasdermina-D que se ensambla a la MP celular formando poros y de esta manera se liberarían el contenido citosólico al medio extracelular, entre ellas las formas activas de la IL-1 β y Caspasa- 1 (Miao et al. 2011). Tampoco se comprende del todo el mecanismo de activación de NLRP3, por lo que está siendo objeto de una intensa investigación. La alteración de la homeóstasis iónica intracelular en respuesta a los activadores de NLRP3 ha ido tomando un peso considerable en la literatura. La activación del NLRP3 se encuentra fuertemente regulada por los niveles citoplasmáticos de K⁺ y Ca⁺⁺ (Murakami et al. 2012; Compan et al. 2012; Mariathasan et al. 2006). Se ha propuesto que la reducción de los niveles intracelulares de K⁺ (ej: por canales iónicos o toxinas formadoras de poros como la nigericina) es la condición necesaria y suficiente para activar al NLRP3, ante estímulos tan variados como tratamiento con ATP, nigericina, fagocitosis de material particulado (Figura 16). La disminución de K⁺ citosólico podría darse por exposición de las células a un medio extracelular con bajo contenido de K⁺ (Perregaux et al. 1996). A pesar de la reconocida importancia del eflujo de K⁺ en la activación del inflamasoma NLRP3, la identidad molecular del/los canales que median ese transporte permanecen aún desconocidos (Latz et al. 2013). Por otra parte resultados obtenidos por Murakami et al. 2012, apoyan un modelo en el cual el aumento de Ca⁺⁺ citosólico tendría un rol clave en la activación de NLRP3. La estimulación de la activación de macrófagos murinos con una elevada concentración de ATP extracelular activaría receptores ionotrópicos como P2X7, llevando a

una salida de K^+ y a la movilización de Ca^{++} desde el RE y el espacio extracelular. Esto desencadenaría daño mitocondrial y activación de NLRP3 (Mariathasan et al. 2006; Murakami et al. 2012, Cruz et al. 2009). Sin embargo la contribución relativa de la disminución de K^+ y el aumento de Ca^{++} citosólico permanece en discusión y no está completamente definido (Katsnelson et al. 2015). Un trabajo reciente de Yaron et al. 2015, apoya un rol del K^+ y Ca^{++} en la activación del IFM, donde se propone que la activación del IFM con LPS y ATP induciría una salida de K^+ desde el citosol y de almacenes intracelulares de K^+ , siendo este eflujo de K^+ quien promovería la entrada sostenida de Ca^{++} hacia el citosol. La captación de exceso de Ca^{++} a nivel mitocondrial llevaría a su disfunción, y generación de mROS. La alteración de la homeostasis iónica intracelular en respuesta a diferentes activadores de NLRP3 es un proceso clave en la activación del IFM y sabiendo que la HCQ es un derivado de la Quinina, conocido inhibidor de canales de K^+ . Además se sabía que la CQ inhibe la producción de IL-1 β en monocitos humanos por activación del inflamasoma NLRP3 (Perragaux et al. 1996) y que la HCQ también ha sido descrita como un inhibidora de canales iónicos (Capel et al. 2015). Sin embargo para nuestro conocimiento no se han asociado las propiedades anti-inflamatorias de la HCQ a su habilidad para bloquear canales iónicos y del IFM. Basándonos en estas evidencias es que decidimos plantear la hipótesis central de este trabajo.

Hipótesis central de trabajo

“La HCQ a través de su capacidad de modular el metabolismo iónico, podría controlar la activación del inflamasoma”.

Si nuestra hipótesis es correcta, la HCQ tendría efectos benéficos en el LES regulando la activación del IFM, a través del control de la homeóstasis iónica en CDs y macrófagos. Este sería un novedoso mecanismo anti-inflamatorio, con posibles implicancias en el metabolismo

lipídico y la ateromatosis. Si la HCQ es capaz de bloquear la activación del IFM, es probable que sus efectos protectores sobre la aterogénesis se deban al menos en parte a este nuevo mecanismo que intentó ser demostrado en este proyecto. En relación a los mecanismos propuestos en la bibliografía disponible, no hemos encontrado trabajos que hagan mención específica a la relación IFM, HCQ e IL-1 β . Por otro lado, es interesante destacar que en modelos animales de LES, el bloqueo del IFM por medios farmacológicos o genéticos, tiene un efecto parcial sugiriendo que podría haber formas de la enfermedad de LES más o menos dependientes de la activación del IFM, de manera análoga a lo que ocurre en otro modelo de enfermedad inflamatoria crónica como es EAE (Kahlenberg et al. 2014; Zhao et al. 2013; Inoue et al. 2012). En definitiva, la respuesta o resistencia a un tratamiento podría ser capaz de mostrar una vía patogénica y probablemente grados de agresividad de la enfermedad. Considerando que se ha visto que el IFM se encuentra presente en diferentes tipos celulares como macrófagos, CD_s, microglia, es que creemos que la caracterización de novedosos mecanismos anti-inflamatorios de la HCQ dará bases científicas para la utilización de este conocimiento además en otros escenarios donde se ha visto que el IFM juega un rol en la patogenia de la enfermedad como en la enfermedad de Alzheimer y de EM (Venegas et al. 2017, Heneka et al., 2015, Guerreiro et al. 2016, Sarasella et al. 2016, Halle et al. 2008). Como ya mencionó Irastorza et. 2008, la HCQ es la piedra angular del tratamiento de LES. Evidencias recientes sostienen un rol del inflamasoma NLRP3 en diferentes enfermedades inflamatorias crónicas como son la Arteriosclerosis, Diabetes de tipo 2, Alzheimer, Parkinson, EM y Obesidad (Guo et al.2015). Por lo tanto, consideramos que resultados obtenidos en este trabajo de maestría podría tener un impacto no solo en LES sino en otras enfermedades inflamatorias crónicas. Además podría abrir nuevos caminos en la búsqueda de biomarcadores tempranos para el diagnóstico de enfermedades inflamatorias, así como de respuesta a tratamientos actualmente utilizados para estas.

Objetivos generales:

El objetivo general de esta tesis de maestría consistió en determinar si la HCQ es capaz de regular la activación del IFM en APCs.

Objetivos específicos:

- 1)** Analizar si la HCQ es capaz de inhibir la producción de IL-1 β en APCs humanas y murinas.
- 2)** Caracterizar si la HCQ modula el procesamiento post- traduccional de la pro- IL- 1 β mediante la modulación de la activación del IFM
- 3)** Caracterización de mecanismos de control del IFM por la HCQ

Materiales y métodos

El IFM se encuentra presente en diferentes poblaciones celulares como son las CDs y macrófagos. Este se puede estudiar en cultivos primarios, como son las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón (BMDCs) o en monocitos y macrófagos diferenciados a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). También se estudian en líneas celulares como la línea celular monocítica humana THP-1.

Ratones utilizados para BMDCs

Se utilizaron ratones C57BL/6 entre 6-12 semanas de vida que fueron criados en la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del Institut Pasteur de Montevideo en condición libre de patógenos específicos (SPF). Esta sala fué mantenida en condiciones controladas. Las temeparturas se encontraron entre 19 - 22° C y ciclos de 14 h de luz y 10 horas de oscuridad. Los ratones recibieron agua y ración estéril administrados de manera *ad-libitum*.

Cultivos primarios

Las BMDC fueron obtenidas a partir de precursores de médula de ratones C57BL/6 machos y hembras entre 6 - 12 semanas, criados en sala SPF del Institut Pasteur de Montevideo. Para la obtención de estas células se siguió el protocolo utilizado para obtención de células dendríticas en el trabajo realizado por una de las integrantes de nuestro laboratorio (Segovia et al. 2011). En este protocolo se extrajo la médula osea del fémur y tibia donde se

lisaron los globulos rojos, y se pusieron en cultivo 5×10^6 células en 10 mL de medio RPMI completo con 1 μ L de GM-CSF (del inglés: granulocyte macrophage colony-stimulating factor) a una concentración de 0.4 ng/mL por placa de Petri. El medio completo para estas células fué RPMI complementado con 10 % de suero bovino fetal (descomplementado por calor durante 30 minutos a 56 °C) L-glutamina 2mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 10 unidades/mL, estreptomicina 10 μ g/mL, HEPES 10 mM, MEM-aminoacidos no esenciales, y β -mercaptoetanol 0,02 mM. Al tercer día de cultivo, se agregó 10 mL de medio RPMI completo, y GM-CSF a concentración final de 0.4 ng/mL por placa de Petri. Luego al sexto día de cultivo, se extrajeron 10 mL de medio por placa, se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C y el pellet celular se resuspendió en 10 mL de medio RPMI completo fresco y GM-CSF 0.4 ng/mL por placa de Petri. Al octavo día, se despegaron las células adherentes con PBS-2 % de suero fetal bovino (SFB) - 0,7 mM de EDTA frío (PSE). Se sembraron 2×10^4 células por pocillo de placa de 96 pocillos y se dejaron adherir durante 90 minutos previo a la estimulación del IFM *in vitro*. Las BMDCs fueron cultivadas en estufa a 37°C en presencia de 5 % de CO₂ durante 8 días de cultivo y en las mismas condiciones durante la estimulación. Estas BMDCs adherentes, despegadas a día 8, se dejaron adherir durante dos horas en placas para su posterior estimulación como se muestra en la Figura 19 y para la cuantificación de Ca⁺⁺ citosólico mediante microscopía TimeLaps con sonda Fura-2 a partir de la activación del inflammasoma *in vitro* como se muestra en la Figura 19, pero en este caso el primer estímulo fué de 2 horas.

Las células dendríticas humanas (hCDs) fueron amablemente cedidas por la Unidad de Biología Celular del Instituto Pasteur de Montevideo. Estas fueron obtenidas a partir de un equipamiento de aféresis sanguínea (Gambro BCT, Suecia) de donantes voluntarios de la Asociación Española de Socorros Mutuos y del Servicio Nacional de Sangre en Montevideo. Posteriormente las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se obtuvieron

mediante separación por centrifugación mediante gradiente de densidad (Hypaque Ficoll) como se muestra en la Figura 17.

Purificación de PBMCs:

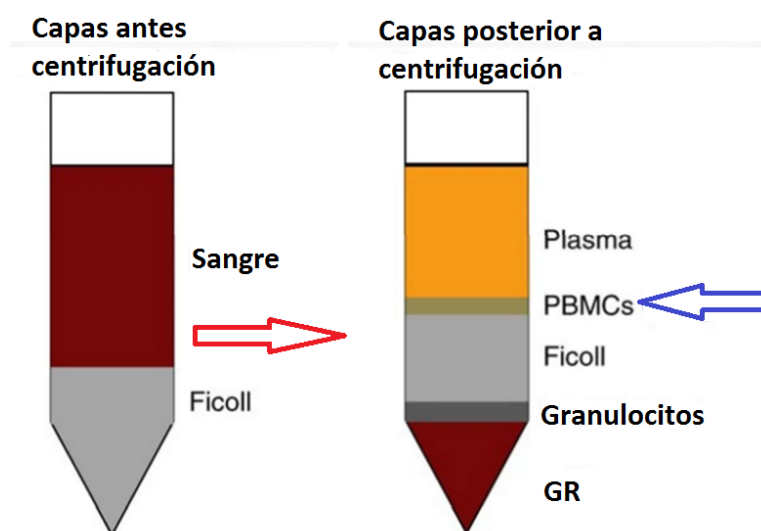


Figura 17. Obtención de PBMCs por gradiente de densidad con Ficoll. Las PBMCs fueron purificadas a partir de sangre periférica, mediante gradiente por Ficoll.

A partir de las PBMCs se purificaron los monocitos por adherencia al plástico. Para la diferenciación de estos monocitos se siguió el mismo protocolo que fue llevado a cabo en Tiscornia et al.2012. Donde los monocitos se diferenciaron a CDs, incubándolos durante 2 días en medio RPMI suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) descomplementado por calor durante 30 minutos a 56°C, complementado con 800 U/mL de GM-CSF (Clausen, Uruguay) e IL-4 al 1% del sobrenadante condicionado de la línea celular transfectada J588L. Las células fueron cultivadas en estufa a 37°C en presencia de 5 % CO₂. Posteriormente las CDs fueron extraídas e inmunofenotipadas mediante citometría de flujo y se aceptaron aquellas DCs que tenían un fenotipo de hDCs inmaduras (Figura 18). Se utilizó Trypan blue como

marcador de viabilidad y los siguientes marcadores antigénicos:

hDCs inmaduras : CD 11c+ CD14- MHC II low CD86 low

hDCs maduras : CD 11c+ CD14- MHC II high CD86 high

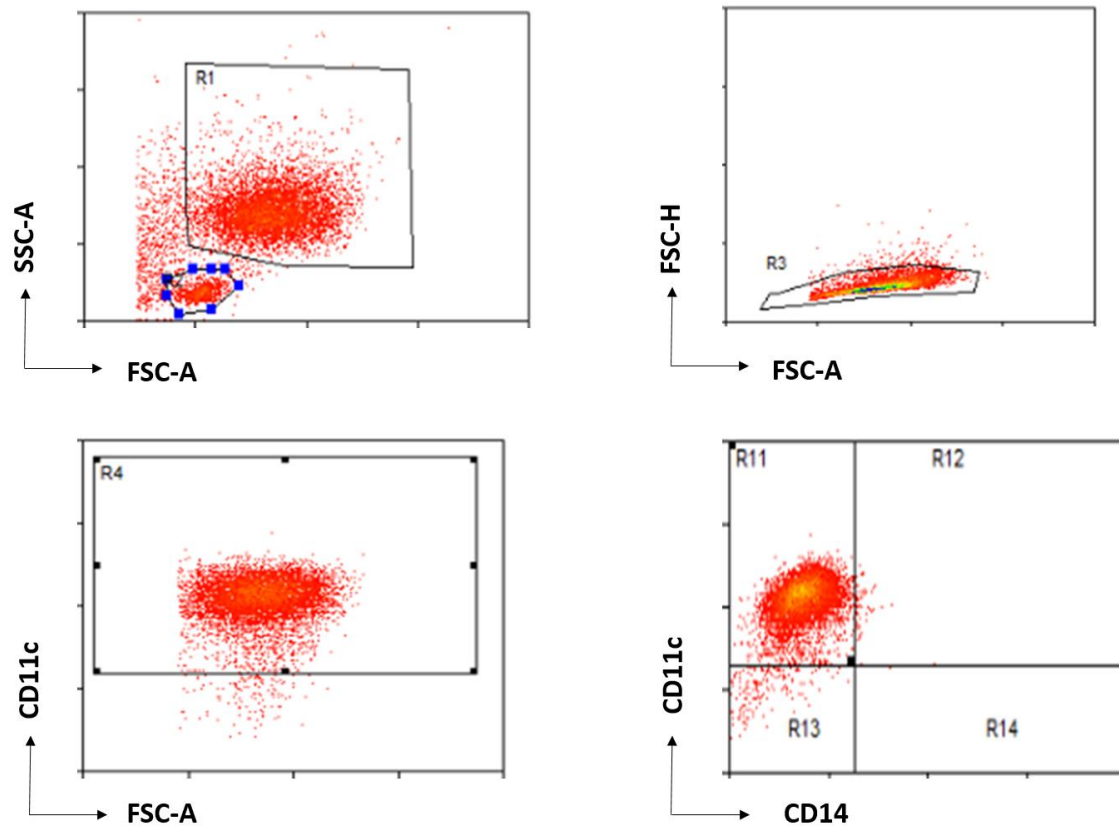


Figura 18. Inmunofenotipo de hDCs. Los monocitos purificados a partir de PBMCs, fueron marcadas y posteriormete analizadas mediante citometría de flujo. Se seleccionaron los monocitos por su morfología (SSC-A vs FSC-A), luego se seleccionaron los singletes (FSC-H vs FSC-A) y de estos últimos se analizaron marcadores de la superficie celular como son CD11c y CD14.

Se sembraron 250.000 células en 250 μ L en tubos eppendorfs. La estimulación del IFM de estas células se llevó a cabo con las células en suspensión, en medio RPMI 10 %, SFB 1 % y

buffer hepes 10 mM. Luego de cada estímulo las células fueron centrifugadas a 260 g durante 5 minutos a 4 °C y lavadas con PBS previo al siguiente estímulo.

Líneas celulares:

Los **macrófagos murinos** fueron amablemente cedidos por el departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina de Ribeirão Preto, Universidad de San Pablo, FMRP/USP, São Paulo, Brasil. Estos macrófagos fueron inmortalizados a partir de monocitos murinos de médula osea (BMM del inglés: bone marrow derived monocytic cells) y de una línea celular CREJ2. La línea CREJ2 son macrófagos inmortalizados a partir de macrófagos de médula osea murina (Cox et al. 1989). Estos macrófagos fueron cultivados en medio RPMI 10 % (GIBCO), SFB 10 % (descomplementado por calor durante 30 minutos a 56 °C), 1 % antibióticos, L-glutamina 2mM, penicilina 10 unidades/mL, estreptomicina 10 µg/mL a 37°C. Las células se mantuvieron mediante el reemplazo de medio cuando la concentración había alcanzado una densidad celular de 8×10^5 células/mL. El medio se renovó aproximadamente cada 2 - 3 días, mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos y posterior suspensión de pellet celular hasta densidad celular entre 2 a 4×10^5 células/mL. Las células fueron cultivadas en estufa a 37 °C en presencia de 5 % de CO₂. Estos macrófagos se adhieren al plástico, por lo que previo a cada estimulación, las células fueron despegadas con tripsina-EDTA y resuspendidas hasta alcanzar una densidad celular de aproximadamente 1×10^6 células/mL. Las células resuspendidas luego fueron sembradas en placas de 6 y 24 pocillos o placas de Petri que luego se dejaron adherir durante 90 minutos en estufa a 37°C previo a la estimulación.

Macrófagos humanos (THP-1, ATCC). La línea celular monocítica humana fué cultivada en medio RPMI completo: complementado con 10 % de SFB descomplementado por calor (30 minutos a 56°C), L-glutmina 2mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 10 unidades/mL, estreptomicina 10 µg/mL, hepes 10 mM, MEM-aminoácidos no esenciales 1 X, y β-mercaptoetanol 0,02 mM. Las células fueron cultivadas en estufa a 37°C en presencia de 5 % CO₂, a una densidad celular menor a 1,2 x 10⁶ células como recomienda el proveedor (ATCC). Pevio a las estimulaciones se sembraron 600.000 células en 250 µL de medio completo en placas de 96 pocillos por pocillo, donde los monocitos fueron diferenciados a macrófagos con 100 nM de PMA durante 48 horas, a 37 °C para la determinación de IL- 1β mediante ELISA. Para el análisis por Western Blot, se sembraron 5 x 10⁶ células por placa de Petri en 4 mL en el mismo medio en el que fueron cultivadas, medio RPMI 10 % SFB y 1 % antibióticos. En el caso de obtención de sobrenadante y lisado para Western Blot, el segundo estímulo se administró en medio RPMI en ausencia de SFB. Estas células también fueron utilizadas para la cuantificación de K⁺ intracelular, donde se sembraron 4 x 10⁶ células en 2 mL por pocillo de placa p6.

Activación del inflamasoma *in vitro*

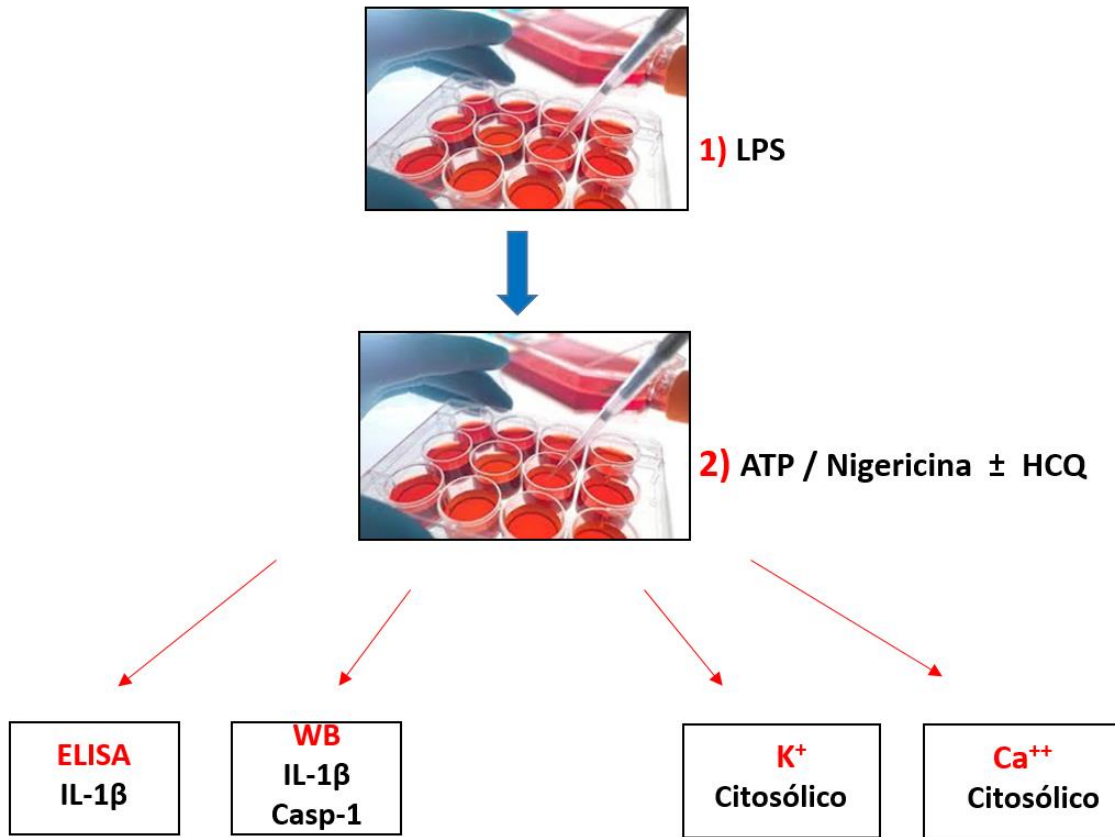


Figura 19. Estimulación del inflamasoma *in vitro*. Se les administró un **primer estímulo** (priming) a las células que fue LPS durante 4 horas a 37°C en CO₂ al 5 % ^{*1}. Luego del primer estímulo las células fueron lavadas con PBS y estimuladas con el fin de activar el IFM. El segundo estímulo administrado fue uno de los siguientes reactivos: ATP y Nigericina durante 45 minutos en medio RPMI completo a 37 °C y CO₂ al 5 % ^{*3,4}. Se recolectaron los sobrenadantes celulares que fueron posteriormente analizados con las técnicas de ELISA, y Microscopía TimeLaps para cuantificación de IL-1 β y Ca⁺⁺ citosólico respectivamente.

^{*1} Durante la estimulación de BMDCs el primer estímulo de LPS fue de 2 horas

^{*2} En algunos experimentos el segundo estímulo fue buffer sin K⁺, buffer con K⁺ (Tabla 2), y activadores farmacológicos de canales de K⁺ sensibles al Ca⁺⁺ como son NS1619, NS309 e inhibidores de estos como son Clotrimazol e Iberiotoxina en presencia o ausencia de la droga estudiada (HCQ).

^{*3}El segundo estímulo fue de 2 horas para la obtención de muestras para Western blot en sobrenadante y lisado celular y para medición de K⁺ citosólico en lisado celular.

^{*4}En caso de las BMDCs para TimeLaps el tiempo de exposición al primer estímulo el LPS fue de 2 horas.

El ATP y la nigericina son conocidos activadores del IFM mediante la movilización de iones de K^+ y Ca^{++} (Figura 20). La salida de K^+ por ATP se da por activación de receptores ionotrópicos de tipo P_2X_7 . También se indujo la salida de K^+ mediante la estimulación con una toxina formadora de un poro en la MP como es la nigericina (intercambiador de H^+/K^+). La nigericina es un ionóforo que permite la salida artificial de K^+ y no a través de un canal iónico como sucede con el ATP (Wen et al. 2013, Mariathasan et al. 2006, Sollberger et al. 2014). Luego NS1619, y NS309 son activadores de canales de K^+ sensibles al Ca^{++} presentes en la MP de macrófagos THP-1.

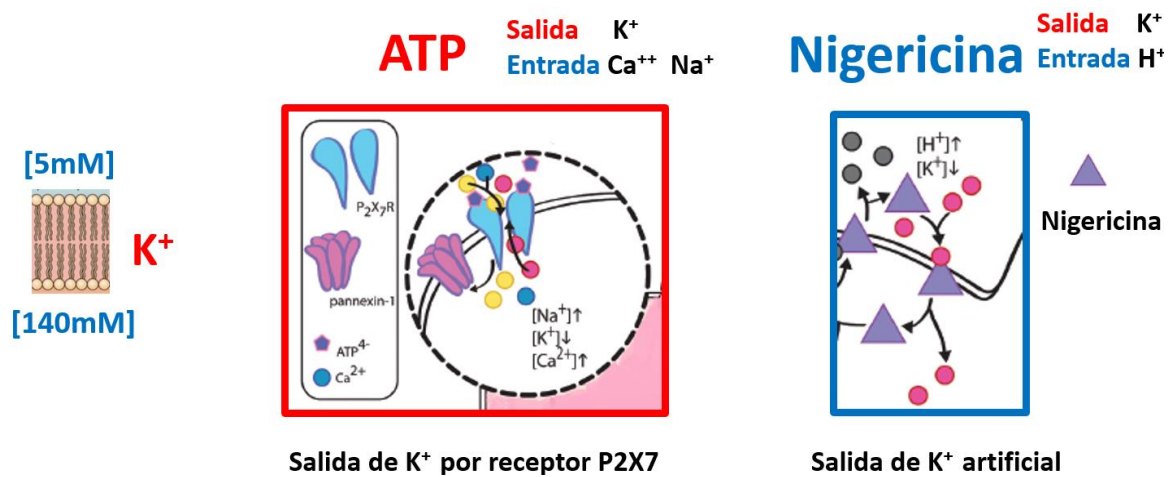


Figura 20. El ATP y la nigericina son conocidos activadores del IFM por inducción de salida de K^+ hacia el medio extracelular. El ATP induce la salida de K^+ mediante la activación de receptor ionotrópico P_2X_7 , mientras que la Nigericina promueve la salida de K^+ a favor de su gradiente electroquímico de manera artificial a través de la formación de un poro en la MP. La concentración de K^+ es de alrededor de 140 mM en el citosol y de 5 mM en el medio extracelular en estado fisiológico, entonces en presencia de un poro en la membrana celular, el K^+ saldría desde el citosol hacia el medio extracelular a favor de su gradiente electroquímico (Tomado de Prochnicki et al. 2016).

En todos nuestros ensayos el tratamiento con HCQ se hizo a la vez del ATP, con la idea de

interferir en los eventos iónicos que llevan a la activación del IFM. Al cabo de 45 minutos, el sobrenadante de cultivo fué recolectado y los niveles de IL-1 β secretada fueron cuantificados mediante un kit de ELISA para IL-1 β de BD Bioscience. Mientras que para las muestras de Western blot, el tiempo de incubación del segundo estímulo fué de 2 horas en medio RPMI completo en ausencia de suero. **Las dosis del primer estímulo (LPS)** en BMDCs, CDs y macrófagos humanos, diferenciado a partir de THP-1 con PMA 100 nM fué de 0,25 μ g/mL, y en macrófagos murinos de 0,5 μ g/mL. La dosis del **segundo estímulo** utilizado (ATP) en BMDCs y hDCs fué de 0,5 mM, 5 mM en macrófagos THP-1, y de 2,5 mM en la línea celular de macrófagos murinos. Para la obtención de muestras para western blot, el segundo estímulo fué ATP, buffer sin K⁺ o nigericina administrado durante 2 horas en medio sin SFB. La composición del buffer sin K⁺ o buffer con K⁺ se muestra en la Tabla 2. Estos buffers fueron preparados a partir de los reactivos individuales de sigma.

Origen de reactivos

Los reactivos HCQ, LPS, ATP, Nigericina, NS1619, NS309, Clotrimazol, IBTx, TEA, y BAPTA-AM utilizados fueron de Sigma (St Louis). NS1619, NS309 y Clotrimazol fueron disueltos en DMSO, mientras que los demás reactivos fueron disueltos en PBS. Los anticuerpos anti-IL-1beta y anti-Caspasa-1 fueron de Santa Cruz Biotechnologies. El kit de ELISA para IL-1beta humana y murina fueron de BD. Los buffer con bajo contenido de K⁺ se prepararon a partir de reactivos sigma indicados en la tabla 2.

Soluciones preparadas:
Activación *in-vitro* del inflamasoma NLRP3 por diferencia de gradiente electroquímico

Buffer sin K⁺ : Hepes (20mM), CaCl₂ (0,9mM), MgCl₂ (0,5mM), NaCl (2,7mM), NaH₂PO₄ (1,5mM), Glucosa (5mM), NaCl (137mM) - pH 7,2

Buffer bajo en K⁺ : Hepes (20mM), CaCl₂ (0,9mM), MgCl₂ (0,5mM), KCl (2,7mM), KH₂PO₄ (1,5mM), Glucosa (5mM), NaCl (137mM) - pH 7,2

Buffer con K⁺ : Hepes (20mM), CaCl₂ (0,9mM), MgCl₂ (0,5mM), KCl (5,4mM), NaH₂PO₄ (1,5mM), Glucosa (5mM), NaCl (137mM) - pH 7,2

Tabla 2. Composición de los medios sin K⁺ utilizados. La composición ionica de medio sin K⁺, fué tomada del trabajo de Perragaux et al., 1996.

Soluciones utilizadas para Western Blot
Lavados de membrana de nitrocelulosa con PBS Tween 0,1 % - 1mL Tween en 1L de PBS
Solución A: 1,5 M Tris. Trizma HCl 18,45g / base 76,5 en agua destilada pH 8,8
Solución B: (Poliacrilamida) Acrilamida comercial 292g/, N'N'-bis methylene-acrilamide 8g/L
Solución Ast (Stacking) (500mL) 1 M Tris – Trizma HCl 105,3g / base 4g, en agua destilada pH 6,8
Persulfato de amonio (APS) 10 % - 10 g/10 mL de agua, alícuotas de 1mL en 4°
Tampón de electrodos (5 X) a 4° C (1 L), 200 mL para una corrida (200mL): Tris base - 15g, Glicina – 72g, SDS – 5g en agua destilada
Buffer de muestra (100 mL) 0,1M Tris pH 8,8 – 6,67 mL solución A, 0,5 M Sacarosa – 17,11 g, 0,01% Azul de bromofenol – 10mg en agua destilada, 5mM EDTA – 1mL de solución 0,5M.
Para 2 geles: 1mL buffer muestra, 200UI SDS 20%, 50 UI DTT (β-mercaptoetanol) 1 M
Buffer de Transferencia (1 L) 900 mL 25mM Tris base – 3,03 g/L, 150mM Glicina – 11,26 g/L. Para una corrida: 90mL transfer buffer + 10mL metanol

Soluciones para Western Blot (Preparación muestras y transferencia)
Gel 12,5 % (2geles): Agua (3,2mL), Solución A (2,5mL), SDS10 % (100μL), Poliactilamida 4,2mL, APS 10% (50μL), Temed (10μL)
Solución de bloqueo de membrana de nitrocelulosa: TBS (1x) - Tween 0,1 %- 5% leche en polvo
Solución de lavado de membrana de nitrocelulosa: TBS (1X) - Tween 0,1% - 0,5 % leche en polvo
Solución de lisis RIPA (100 mL): 50 mM Tris pH 7,4 – 5mL solución 1M, 1% NP40 – 1mL, 0,25% Na- deoxicolato - pas, 150mM NaCl – 3 mL solución 5M, 1mM EDTA Para 10 mL: 1mM PMSF (PM 174,2)
Buffer de transferencia (2 membranas): 45mL Transfer buffer, 5mL metanol.
Buffer de carga: 1mL buffer muestra, 200μL SDS 20% (4% final), 50μL DTT 1M (50mM final)

Tabla 3. Composición de las soluciones de Western Blot utilizadas

Western Blot

Este protocolo se llevó a cabo solamente con macrófagos humanos diferenciados de la línea celular THP-1. Para la preparación de muestras para western blot, se tomó como referencia el protocolo llevado a cabo en la guía del manual de métodos y protocolos del inflammasoma (Eggleton et al. 2014). Para la **obtención del lisado celular** las células fueron lisadas luego del protocolo de estimulación, con buffer RIPA (50 mM Tris pH 7.4, 1%, NP40, 0.25 % deoxicolato de sodio, 150 mM NaCl 1 mM EDTA) en presencia de inhibidores de proteasas. Posteriormente las muestras fueron sonicadas durante treinta segundos a 4 °C (3 ciclos de 10 segundos cada uno). Luego las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y las proteínas fueron cuantificadas con la metodología de BCA (del inglés: “bicinchoninic acid assay”). Luego de la cuantificación por espectrofotometría a 570 nM, un volumen correspondiente a 30 µg de proteínas fué disuelta en buffer de carga (β -mercaptoetanol 25 %, SDS 2,5 %, Glicerol 50 %, Buffer Tris-HCl 0,125 M a pH 6.8, azul de bromofenol 0,1 mg/mL y fueron calentadas a 100 °C durante cinco minutos para la desnaturalización proteica. El **sobrenadante de cultivo** se obtuvo a partir de la estimulación *in vitro* de 5×10^6 macrófagos humanos diferenciados a partir de la línea celular THP-1 con 100 nM de PMA durante 48 horas, en placa de Petri de 10 mm de diámetro y un volumen de medio RPMI con LPS/ATP o Nigericina de 4 mL. El sobrenadante de cultivo se recolectó y las proteínas correspondientes a 1 mL de sobrenadante de cultivo de los 4 ml iniciales, fueron precipitadas con ácido tricloro acético (ATA) al 20 % (1:1 sobrenadante: ATA). Las muestras fueron incubadas en hielo durante treinta minutos y posteriormente centrifugadas a 12.000 r.c.f. durante 15 minutos a 4°C. Luego se hicieron tres lavados con 500 µL de acetona a 4°C y luego se centrifugaron nuevamente a 12.000 r.c.f. durante cinco minutos a 4°C. El pellet se dejó secar en hielo y las proteínas precipitadas fueron resuspendidas en 20 µL de buffer de carga (Tabla 3). Las muestras fueron posteriormente vortexeadas vigorosamente durante un

minuto, y calentadas a 100 °C durante cinco minutos y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente previo a ser sembradas en gel de poliacrilamida al 12,5 % en condiciones reductoras (SDS-PAGE). Las muestras se sembraron en gel de poliacrilamida 12,5 %, con un volumen correspondiente a 30 µg de lisado celular, y los 20 µL de las muestras de sobrenadante junto con 5 µL de marcador de peso molecular. Las muestras se dejaron migrar a 100 V hasta que se encontraran concentradas en el borde inferior del gel stacking. A partir del stacking, se dejó migrar el gel a 150 V. Una vez finalizada la corrida, las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (GE Healthcare) mediante electrotransferencia semi-seca durante diez minutos a 20 V. En los casos en los que se transfirieron dos geles a la vez, el tiempo fué de veinte minutos. La membrana de nitrocelulosa luego fué bloqueada con TBS-Tween 20 - 0,1 % - 5 % leche durante dos horas y posteriormente se hicieron tres lavados con TBS- Tween 20 - 0,1 % de diez minutos cada lavado en agitación a temperatura ambiente. Las muestras fueron incubadas toda la noche con 1 mL de dilución 1/100 de anticuerpo 1º anti Caspasa- 1 p10 (sc-515. Santa Cruz Biotechnology) a concentración final de 1 µg/mL cada membrana, toda la noche a 4°C sin agitación. Luego de la incubación con el primer anticuerpo, las membranas fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo-peroxidasa dilución 2/3000 en TBS-Tween 20-0,1%, durante noventa minutos a temperatura ambiente. Luego se hicieron tres lavados a temperatura ambiente y en agitación con TBS-Tween 20 - 0,1 %, y posterior revelado en sala oscura con 1 mL de sustrato de peroxidasa ECL (Termofischer). La membrana se expuso al film (GE Healthcare) aproximadamente veinte minutos. En caso de que se quisiera analizar en la misma membrana la Caspasa- 1 y luego la IL- 1β, se llevó a cabo primero el análisis de la Caspasa - 1 y luego de la IL-1β. Para el análisis de la IL-1β en la misma membrana, se hizo un “streaping”^{*5}, y se realizó un inmunoblot de la membrana con anticuerpo anti-IL- 1β. Se volvió a utilizar la membrana de nitrocelulosa para la IL- 1β o se llevó a cabo nuevamente la corrida electroforética en una membrana nueva. Para la utilización de la misma membrana para Caspasa-1 e IL-1β, se despegaron las proteínas

mediante una metodología denominada “streaping”, con el fin de romper la unión de los Acs 1º de la Caspasa-1 con las proteínas de la membrana. *⁵Streaping: Se vertieron aproximadamente 2 mL de Tween 20 sobre la membrana de nitrocelulosa y se dejaron reposar 5 segundos. Posteriormente se llevaron a cabo tres lavados con TBS-Tween 5 %. Se llevó a cabo el mismo protocolo que con la Caspasa- 1 pero en este caso el anticuerpo primario fué anti IL-1 β a una concentración de 1 μ g/mL (sc-7884 de Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1/200 en TBS-Tween 20 - 0,1 % durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó tres veces con agitación moderada durante diez minutos con TBS-Tween 0,1 % y el 2º anticuerpo anti-conejo-Peroxidasa 1/3000 α – IL - 1 β (H-153) durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó tres veces con agitación moderada durante diez minutos con TBS - Tween - 0,1 % durante diez minutos. La semi-cuantificación de las formas activas de IL- 1 β y Caspasa- 1 se realizó mediante revelado en sala oscura con 1 mL de sustrato de peroxidasa ECL (Thermofischer) por cada membrana de nitrocelulosa. El film fué expuesto a la membrana de nitrocelulosa durante cinco segundos aproximadamente para el análisis de las formas activa e inactiva de IL-1 β .

Cuantificación de Ca⁺⁺ intracelular

Con el fin de cuantificar el Ca⁺⁺ celular durante la activación del IFM, se utilizó la sonda Fura-2 de Molecular probes. Esta es una sonda fluorescente que permite la medición de concentraciones de Ca⁺⁺ intracelular, ya que se une al Ca⁺⁺ citosólico, siendo excitada a dos longitudes de onda 340 y 380nm, y emite una longitud de onda de 510nm que fué registrada. El análisis del ratio reduce los efectos de cargado desigual de sonda Fura-2, y pérdida de sonda “photobleaching”, y problemas asociados con la medición de Ca⁺⁺ en células de diferente tamaño. Este experimento se llevó a cabo en un microscopio Leica DMI 6000 con un objetivo

20x/0.7 y las imágenes fueron grabadas con una cámara Cool Snap HQ2 CCD Photometrics. Para este experimento, las células BMDCs fueron despegadas a día 8 de cultivo y se sembradas 100.000 células en 250 μ L de medio Milen C (Gibco) donde se dejaron adhiriendo en una placa multiwell de Borosilicato a 37°C durante 2 horas. Luego de que las BMDCs se encontraban adheridas, se estimularon con LPS (0,1 μ g/mL) durante dos horas, se lavaron con PBS y luego se les agregó 250 μ L de medio HBSS con CaCl_2 , 1 % de SFB a todos los pocillos menos a el pocillo que de medición previo a su medida, al cual se le puso medio HBSS con Ca^{++} sin SFB y sonda Fura-2 a concentración final de 1 μ g/mL. Se dejó incubar durante treinta minutos a 37°C. Medio HBSS + CaCl_2 : (50mL): HBSS Gibco (CaCl_2 1,26 mM, Mg^{2+} , glucosa, sin rojo fenol ni HCO_3Na), 45 mL de agua estéril, 100 μ L de NaOH 1N y buffer hepes pH= 7. Luego de la incubación con sonda Fura-2 se lavaron y se le volvió a poner 250 μ l de medio HBSS + Ca^{++} sin SFB, y se registró el Ca^{++} intracelular. Luego de unos minutos de registrar las corrientes, las BMDCs fueron estimuladas con ATP a concentración final de 0,5 mM en un volumen de 250 μ L y se volvió a registrar el Ca^{++} citosólico. Inicialmente se siguieron los tres protocolos de marcado con sonda Fura-2 con el fin de poder seleccionar la condición óptima de marcado. A partir de los resultados obtenidos se decidió continuar con el tercer procedimiento de marcado, donde se observó una mayor diferencia en el nivel de Ca^{++} citosólico en presencia de HCQ en comparación con su control. Para el análisis de cada experimento, se realizó un promedio de alrededor de 20 células por campo óptico elegidas al azar. Los datos se analizaron con Software Metafluor y luego con Graphpad 6. Durante los experimentos de puesta a punto de la técnica, se utilizaron tres protocolos de marcación diferentes. En el primer protocolo las células fueron marcadas con una sonda fluorescente sensible al Ca^{++} Fura-2 en presencia de HCQ 10 μ M. Posteriormente se lavaron las células y se registró el Ca^{++} intracelular. Luego las células fueron estimuladas con ATP (0.5 mM) y se registró el Ca^{++} intracelular antes y luego de la administración de ATP. El segundo protocolo de marcación utilizado consistió en marcar las células con Fura-2 durante diez minutos. Luego las células fueron lavadas y se les administró

una dosis de HCQ 10 μM . El Ca^{++} se registró a partir de los 5 minutos de administración de HCQ. Luego se les administró un segundo estímulo (ATP 0.5 mM) y se registraron las corrientes de Ca^{++} . El tercer protocolo utilizado consistió en marcar las células con Fura-2 en presencia de HCQ 10 μM . Posteriormente se llevó a cabo un lavado y se les administró HCQ 10 μM . Se registró el Ca^{++} a los cinco minutos de la administración de la HCQ. Luego se les administró un estímulo de ATP (0.5 mM) y se registraron las corrientes de Ca^{++} a partir de la administración de este segundo estímulo. El protocolo de marcación finalmente seleccionado fue el tercer procedimiento y a partir de este procedimiento se realizó la gráfica mostrada en la Figura 27.

Cuantificación de K^+ intracelular

Al día de hoy son pocas las metodologías disponibles para la cuantificación del K^+ intracelular mediante espectroscopía. Se puso a punto una técnica para la medición de K^+ a partir de un lisado celular de macrófagos THP-1, donde el K^+ del lisado se encontrara dentro del rango de linealidad del equipo de medida. El equipo de medición fue el equipo de Bioquímica donde se hacen los ionogramas en suero de pacientes, Roche/Hitachi cobas c 501 del Laboratorio Central del Hospital de Clínicas. Previo a la cuantificación de K^+ se pusieron a diferenciar 2×10^6 monocitos humanos THP-1, por pocillo de placa p 6, con 100 nM de PMA durante 48 horas a 37°C. Inicialmente se analizaron sobrenadantes de cultivo de diferentes densidades celulares, hasta tener una concentración de K^+ dentro del rango de linealidad del equipo. Luego de las 48 horas de adherencia, se procedió a llevar a cabo la estimulación de las células con LPS (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Luego se lavaron las células con PBS y posteriormente se estimularon con ATP 5 mM o nigericina (2,5 μM) en presencia o ausencia de HCQ. Las células se lavaron con PBS y posteriormente se llevó a cabo un procedimiento para obtención de

lisado celular con agua destilada durante treinta minutos a 37 °C. Luego se continuó el procedimiento de lisado mecánicamente con punta de tip y se recogió el sobrenadante de este lisado que fué posteriormente sonicado y centrifugado con el fin de quitar los restos celulares quedando estos en el pellet y se cuantificó el K⁺ en el sobrenadante de dicha centrifugación.

Estudio de canales iónicos mediante electrofisiología. Patch Clamp en célula entera

Esta técnica es utilizada para registrar corrientes iónicas de una célula entera. En la metodología de Patch Clamp (del inglés: whole cell patch clamp) se puede controlar el V_m, mediante la administración de pulsos de corriente eléctrica. Al controlar el V_m se puede inducir la activación de diferentes canales iónicos en la MP y de esta manera medir las corrientes iónicas de toda la célula a diferentes V_m. De esta manera se ha estudiado el comportamiento de muchos canales iónicos a diferentes V_m y estos análisis permiten obtener los datos para hacer una curva I (intensidad de corriente) vs V_m. Cada canal iónico tiene una gráfica característica, con un potencial de reversión (V_{rev}) para cada ion. El V_{rev} es el V_m en el que la conductancia del ion es nula, osea donde no hay flujo neto de ese ion a través de la MP. A partir de la pendiente de la curva I vs V_m es posible obtener la conductancia de un ion en la MP, de acuerdo a la ley de Ohm: $C = I / (V_m - V_r)$. Siendo "C" la conductancia expresada en siemens, "I" la intensidad de corriente del ion en estudio y V_m el potencial de membrana. El registro de las corrientes iónicas se lleva a cabo con un electrodo que se encuentra en el interior de una pipeta de vidrio denominada "pipeta de patch" conteniendo un buffer salino. El extremo de esta pipeta de vidrio tiene un orificio que se encuentra en contacto directo con la

MP de la célula en estudio. En la pipeta que está en contacto con la MP de la célula hay un electrodo y luego hay otro electrodo de referencia, en el baño donde se encuentra la célula en estudio. De esta manera se mide la corriente iónica de toda la célula ya que en el lugar de contacto de la pipeta con la MP hay un flujo de corriente iónica desde el interior al exterior celular. Las pipetas son preparadas en el momento, con un vidrio especial Corning 7052, pulidas hasta tener un determinado diámetro de unos pocos μm en un equipo denominado "pooler", en nuestro caso un P-2 micropipette puller. Para poder medir la corriente iónica de toda la célula, primero se debe lograr el sello de la pipeta de patch con la MP. Cuando se pone en contacto la punta de la pipeta con la célula, se le aplica cuidadosamente una presión negativa mediante succión, y esto lleva a la formación de un sello hermético entre la membrana celular y la pipeta, alcanzándose una resistencia entre el interior de la pipeta y la solución externa del orden de gigaohms. Este sello de elevada resistencia asegura que la corriente eléctrica que fluye por la pipeta sea la misma que fluye a través de los canales presentes en el parche de la membrana celular en contacto con la pipeta. En whole cell luego de la formación del sello, se vuelve a aplicar una succión a la pipeta, rompiéndose la MP en la zona del orificio de la pipeta, de tal forma que luego de un cierto tiempo, el buffer de la solución de la pipeta de patch se mezcle con el contenido del citosol celular y la corriente iónica que pasa por el orificio de la pipeta de patch, sea la medida por el electrodo que se encuentra en la pipeta. De esta manera se pueden analizar corrientes iónicas de toda la célula y a una composición de Ca^{++} determinada por la mezcla del buffer de la pipeta de patch y el contenido del interior celular. Finalmente se forma un circuito entre la célula y la pipeta de patch como se muestra en la Figura 21.

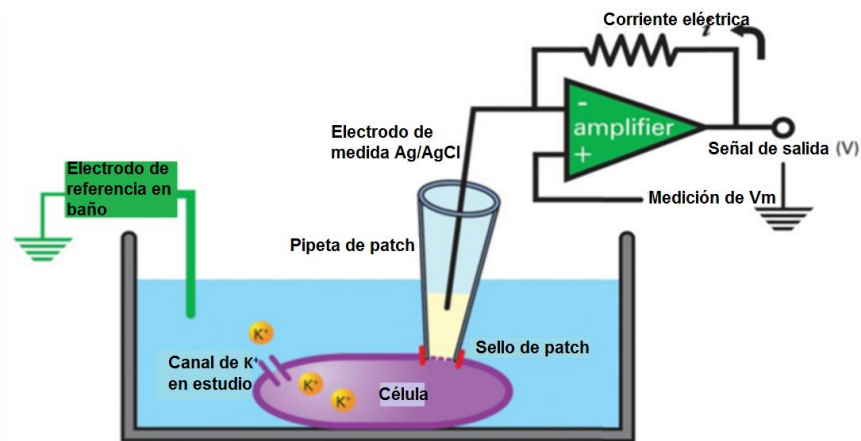


Figura 21. Patch Clamp en célula entera. Se mide la corriente de una célula a diferentes V_m inducidas por corrientes de pulso eléctrico. La pipeta de patch se encuentra en contacto directo con la MP de la célula en estudio y en el interior de la pipeta se encuentra un electrodo que registra la corriente iónica de la célula entera que pasa a través del punto de contacto entre la célula en estudio y la pipeta de patch. Luego en el medio extracelular se encuentra un electrodo de referencia (Tomado y modificado de Clare et al. 2010)

Para el estudio de canales iónicos, se puede agregar a la solución del baño en el que se encuentra la célula o en la solución de la pipeta compuestos químicos activadores o inhibidores de los canales iónicos que se quieran estudiar. Con estos activadores se aumenta la probabilidad de apertura de un canal iónico, como es NS1619 activador del canal BKCa y NS309 activador del canal KCa3.1. También se pueden estudiar canales activados por Ca^{++} mediante un buffer con elevado contenido de Ca^{++} en la pipeta de patch y también se puede estudiar un posible efecto del Ca^{++} en determinados canales iónicos presentes en la MP, mediante al adición de agentes quelantes de este ion, como es BAPTA-AM. Este quelante es agregado en el baño que rodea a la célula, siendo este permeable a la MP. Al ingresar a la célula, se une al Ca^{++} citosólico y queda retenido en el interior celular. Inicialmente se trabajó con los controles sin HCQ, en una rampa de pulsos de corriente eléctrica administrada de forma tal de empezar a trabajar en un V_m de -80 mV con las muestras control (sin HCQ). Se observó que en el rango de -80 mV a -30 mV había una corriente iónica entrante que se cree correspondía a los canales de K^+ rectificadores entrantes Kir. Estas corrientes ya fueron

estudiadas en estas células por (DeCoursey et al. 1996) como se muestra en la Figura 8 siendo activadas a V_m hiperpolarizante. Posteriormente esa corriente entrante pasó a ser una corriente saliente a un V_m de alrededor de -50 mV. Las corrientes de K^+ correspondientes al Kir, fueron observadas en ausencia de HCQ. Se conoce que la CQ inhibe estas corrientes de K^+ correspondientes a canales como Kir2.1 que se encuentran presentes en macrófagos THP-1 (Rodríguez-Menchaca et al. 2008). Luego a -20 mV se observó que dicha corriente era despreciable y es por esto que se durante este trabajo experimental se trabajo a partir de un voltaje de -20mV para que estas corrientes no se encontraran presentes durante las mediciones. Las corrientes iónicas fueron estudiadas en donde 1×10^6 macrófagos THP-1 previamente puestos a diferenciar en cubreobjetos insertados en placas de seis pocillos en un volumen de 1500 μ L por pocillo, durante 48 horas con 0,1 μ M de PMA en medio completo a 37°C. Luego de las 48 horas de diferenciación las células fueron lavadas e incubadas a diferentes concentraciones de HCQ de 1, 3, 10, y 30 μ M junto con dos controles en ausencia de HCQ a 37°C en medio RPMI completo. Posteriormente las muestras fueron llevadas al laboratorio de Canales iónicos, Departamento de Biofísica de Facultad de Medicina, para mediciones de electrofisiología en colaboración con el Dr. Gonzalo Ferreira. Previo a la medición las células fueron lavadas con PBS y colocadas en la cámara de registro con solución de baño (Tabla 4), para el análisis de la corriente iónica en la célula entera. Los registros se llevaron a cabo a temperatura ambiente entre 21-25°C con las soluciones de la Tabla 4. Previo a la medición, las pipetas se cargaron con una solución de Ca^{++} 1 μ M concentración en donde se espera se encuentren activos los canales iónicos que se buscaban estudiar. La concentración de Ca^{++} en condiciones fisiológicas es de alrededor de 100 nM. La pipeta de patch clamp se cargó con una solución intracelular de: KCl 150 mM, NaCl 10 mM, $MgCl_2$ 13 mM, Hepes 10 mM, EGTA 1,1 mM, CaCl 1 μ M. El cubreobjetos con las células se colocaron en cámara de registro bañadas con solución extracelular de NaCl 135 mM, KCl 5,4 mM, MgCl 1 mM, Hepes 10 mM, NaH_2PO_4 0,3 mM a pH 7,2. Luego de la formación del sello entre la MP y

la pipeta, el contenido de la pipeta de patch entró en contacto con el contenido del citosol celular y los macrófagos fueron perfundidos con un buffer de Ca^{++} 1 μM y K^+ 150 mM, y un buffer externo conteniendo 5,4 mM de K^+ donde se observó que las corrientes salientes y entrantes aumentaron mucho. Durante los registros, se les administró a las células corriente eléctrica con el fin de tener “rampas de V_m ” y poder estudiar el comportamiento de los canales iónicos a diferentes V_m . Se utilizó un amplificador Am System 2400 configurado para rampas de voltaje en formato célula total (del inglés: whole cell) para estudiar las corrientes de toda una célula. Las corrientes fueron registradas antes, durante y posterior a la formación del sello entre la MP y la pipeta de patch. Debido a las características de la corriente observada, se pensó inicialmente que podrían encontrarse presentes corrientes de Cl^- . Para estudiar esto, se evaluó la posibilidad de que fueran corrientes salientes de Cl^- con experimentos con TEA y solución externa sin Cl^- considerando que las corrientes de Cl^- son insensibles al TEA. Además se hicieron experimentos con soluciones sin Cl^- y bloqueante de Cl^- donde no se observó diferencias significativa en la corriente saliente observada, de esta manera descartamos que las corrientes observadas correspondieran a canales de Cl^- (no se muestra estos datos). Luego de que se concluyera que las corrientes observadas correspondían a canales de K^+ , se utilizaron inhibidores de canales de K^+ sensibles al Ca^{++} en la solución del baño, como son TEA (inhibidor de BKCa y sKCa), IBTx inhibidor de BKCa, y también se utilizó el quelante de Ca^{++} , BAPTA-AM para evaluar la sensibilidad al Ca^{++} de los canales estudiados. Estos experimentos se llevaron a cabo en los controles sin HCQ. Luego cuando se quiso evaluar el rol de la HCQ en las corrientes de K^+ activadas por Ca^{++} , se agregaron dosis de HCQ entre 1 - 30 μM . Las corrientes se registraron utilizando un amplificador de patch modelo 2400 AM a una frecuencia de 10 KHz, previamente filtrado a 2 KHz (AM Systems Inc) y los datos fueron analizados usando el programa Clampfit (Molecular Devices) y Sigmaplot 11 (Jandel Scientific). En la figura 22 se puede observar al macrófago THP-1 en contacto con la pipeta de patch, imagen obtenida durante uno de los experimentos.

Soluciones utilizadas para experimentos de Patch Clamp

Solución pipeta de medición:

KCl (150mM), NaCl (10mM), MgCl (1,13mM), Hepes (10mM) EGTA (1,1mM), CaCl (1 μ M)

Solución en baño:

NaCl (135mM), KCl (5,4mM), MgCl (1mM), Hepes (10mM), NaH₂PO₄ (0,3mM)

Tabla 4. Soluciones utilizadas en experimentos de patch clamp en célula entera



Figura 22. Macrófagos THP-1, diferenciados durante 48 horas con 100 nM de PMA
(Imagen obtenida durante experimentos)

BKCa (Ca ⁺⁺ , Vm)	KCa3.1 (Ca ⁺⁺)	sKCa (Ca ⁺⁺)
Activador	Activador	Activador
NS1619	NS309	NS309
Inhibidores	Inhibidores	Inhibidores
Quinina	Quinina	Quinina
Ba ²⁺	Ba ²⁺	Bario
TEA+	Clotrimazol	TEA+
Paxilina		
IBTX		

Tabla 5. Los canales BKCa, KCa3.1 y sKCa son inhibidos por la Quinina.

Resultados:

La activación del IFM se ha estudiado en diferentes poblaciones celulares, en células del SI como son las CDs y macrófagos así como también en células que no forman el SI, como las neuronas y células epiteliales. El estudio del IFM se hace habitualmente en CDs y macrófagos de cultivos celulares primarios o en líneas celulares de monocitos humanos, como es la línea celular THP-1 diferenciadas con PMA. En bibliografía se puede observar que la forma activa de la IL- 1 β se analiza frecuentemente en el sobrenadante de cultivo celular, ya que una vez activada la Caspasa- 1, se induce un tipo de muerte celular programada denominada piroptosis en donde se forman poros en la MP, favoreciéndose así la liberación de las formas activas de Caspasa- 1 e IL- 1beta. En nuestros resultados, las formas activas de Caspasa- 1 e IL- 1 β fueron analizadas en el sobrenadante, mientras que las formas inactivas se analizaron en el lisado celular. El gold standard para estudiar la activación del IFM es el inmunoblot que analiza la activación de la Caspasa-1 (Laliberte et al. 1999).

1. Analizar si la HCQ es capaz de inhibir la producción de IL-1 β en APCs humanas y murinas.

Para comenzar a estudiar nuestra hipótesis CDs y macrófagos humanos y murinos fueron estimulados con LPS y ATP en presencia y ausencia de HCQ (Figura 19). Esta estimulación se llevó a cabo considerando que la movilización de K⁺ y Ca⁺⁺ a través de la activación de receptores ionotrópicos P₂X₇, juega un rol en la activación del IFM inducida por ATP. Es importante mencionar que a diferencia de otros activadores como partículas de aluminio, que

inducen acidificación de endo -lisosomas (Hornung et al. 2008), el ATP no induce este efecto. Entonces los efectos observados en nuestros resultados, no se explicarían debido al mecanismo anti-inflamatorio ya conocido de la HCQ por ser una base débil con afinidad por los lisosomas. Previamente se pusieron a punto las condiciones de cultivo y las dosis de estimulación, eligiéndose aquellas dosis de LPS y ATP en las que se observó mejor inhibición con dosis terapéuticas de HCQ en el rango de 3 a 30 μ M. Se cuantificó la producción de IL-1 β en sobrenadante de cultivo mediante ELISA. Los resultados obtenidos muestran que la HCQ inhibe la secreción de IL-1 β en los cuatro tipos celulares estudiados de manera dosis dependiente Figura 23.

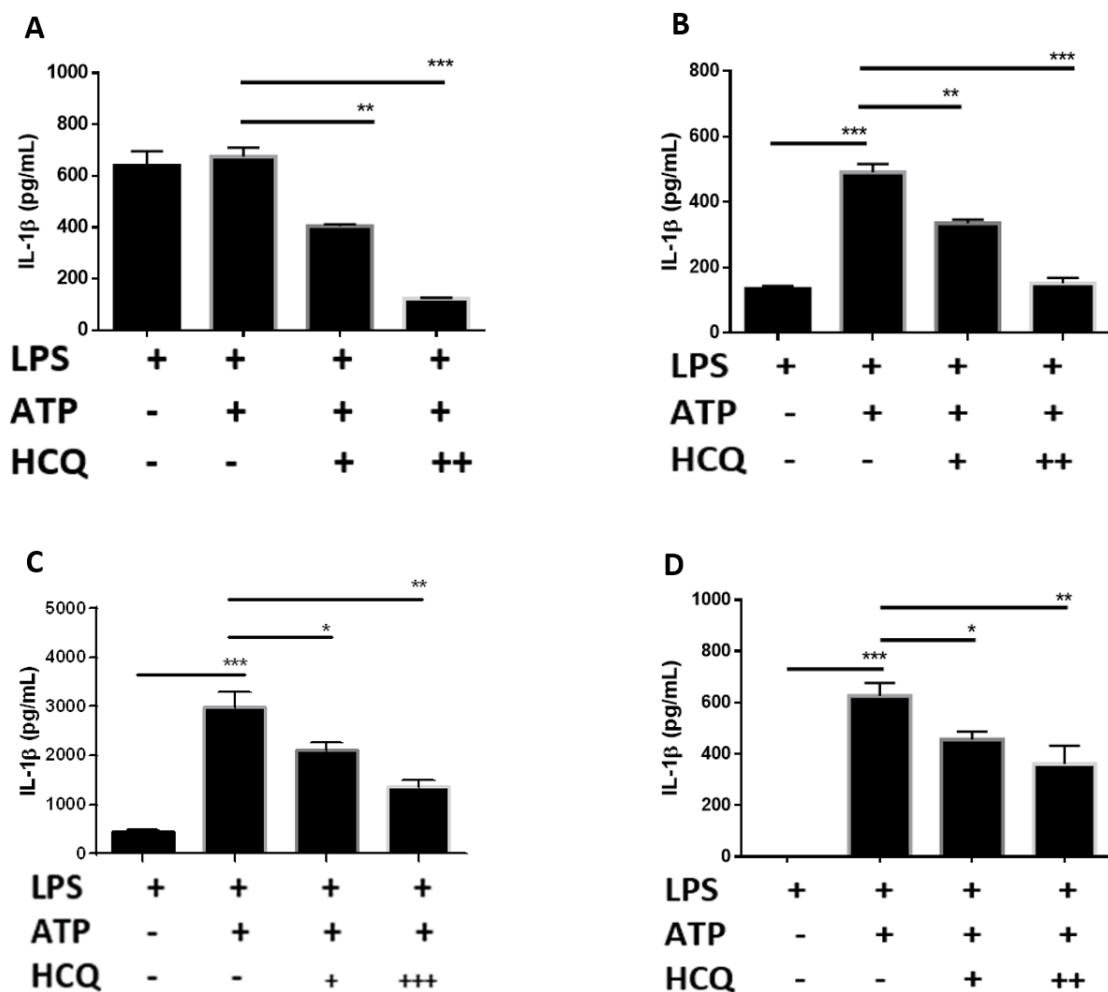


Figura 23. La HCQ inhibe la secreción de IL-1 β en CD s , macrófagos humanos y murinos de manera dosis dependiente. (A) Las DCs humanas fueron estimuladas con LPS 0,25 μ g/mL, lavadas y ATP 0,5 mM \pm HCQ 3 y 10 μ M (B) Las BMDCs se estimularon con LPS 0,5 μ g/mL (4 hs), lavadas y luego ATP 0,5 mM \pm HCQ 3 y 10 μ M (45 min) (C) Los macrófagos THP-1 se estimularon con LPS 0,25 μ g/mL (4 hs), lavadas y ATP 5 mM \pm HCQ 3 y 30 μ M (45 min) (D) Los macrófagos murinos inmortalizados fueron estimulados con LPS 0,5 μ g/mL (4hs), lavadas y ATP 2,5 mM \pm HCQ 3 y 10 μ M (45 min). En todos los experimentos la HCQ se administró durante el

segundo estímulo. Se cuantificó la IL-1 β en sobrenadante de cultivo celular mediante ELISA. Los datos se analizaron con Software Graphpad Prism 6 *p <0,05 Tukey's multiple comparisons test de resultados obtenidos en tres experimentos independientes *= p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001

En monocitos humanos es suficiente el estímulo con LPS para la secreción de IL- 1 β en ausencia de ATP exógeno. Se ha visto que en estas células la estimulación de TLR, induce la liberación de ATP intracelular desde el interior de la célula teniendo un efecto autocrino induciendo así la secreción de IL-1 β (Piccini et al. 2008). Probablemente por esto se observan niveles similares de IL-1 β en la condición LPS y LPS/ATP (Figura 23-A).

A partir de los resultados obtenidos (Figura 23), nos preguntamos si la inhibición en la secreción de IL-1 β observada podría deberse a una inhibición en la activación del IFM. Para esto se decidió evaluar la activación del IFM mediante Western Blot. Esto nos llevó al segundo objetivo : **Caracterizar si la HCQ modula el procesamiento post-traduccional de la pro- IL-1 β a través del IFM en macrófagos THP-1**

2. Caracterizar si la HCQ modula el procesamiento post- traduccional de la pro- IL- 1 β mediante la modulación de la activación del IFM

Pensamos que la si la HCQ estuviera inhibiendo la activación del IFM, la Caspasa-1 se encontrara disminuída en presencia de HCQ. Para el cumplimiento de este objetivo, se llevó a cabo el mismo protocolo de activación del IFM *in vitro* que se utilizó en el objetivo anterior (Figura 19), con la diferencia de que se aumentó el tiempo de incubación del segundo estímulo ATP, a 2 horas en lugar de 45 minutos, siendo esto necesario para poder observar la Caspasa-1 en el sobrenadante de cultivo. Se recogieron los sobrenadantes y lisados celulares para su posterior análisis mediante Western Blot. Este experimento se llevó a cabo en macrófagos THP-1. Gran parte de los experimentos mostrados se llevaron a cabo en esta línea celular por un tema de costos, además de que esta línea celular es ampliamente utilizada en bibliografía para el estudio del IFM *in vitro*. Previamente se pusieron a punto las condiciones de cultivo como densidad celular, tiempos de estimulación, procesamiento de muestras, para el análisis de IL-1 β y Caspasa-1 mediante Western Blot. Se estudió el nivel de activación del IFM con el anticuerpo monoclonal anti Caspasa-1 a la vez de la citoquina IL-1 β , con los anticuerpos monoclonales correspondientes. Las formas activas de estas proteínas fueron analizadas en el sobrenadante, mientras que las formas inactivas fueron analizadas en el lisado. Se esperaba poder determinar si la disminución observada en los niveles de IL- 1 β en presencia de HCQ en el objetivo anterior era debido a una disminución de la activación de Caspasa- 1. El análisis de la activación del IFM se realizó mediante el análisis de Caspasa-1 en Western Blot. La forma activa de Caspasa- 1 e IL- 1 β es de 10 KDa y 17 KDa respectivamente, mientras que las formas inactivas de estas, las pro-Caspasa-1 y pro-IL-1 β de 45KDa y 32KDa respectivamente. Se observó que la HCQ inhibe la activación del IFM y la secreción de IL-1 β inducida por ATP (Figura 24).

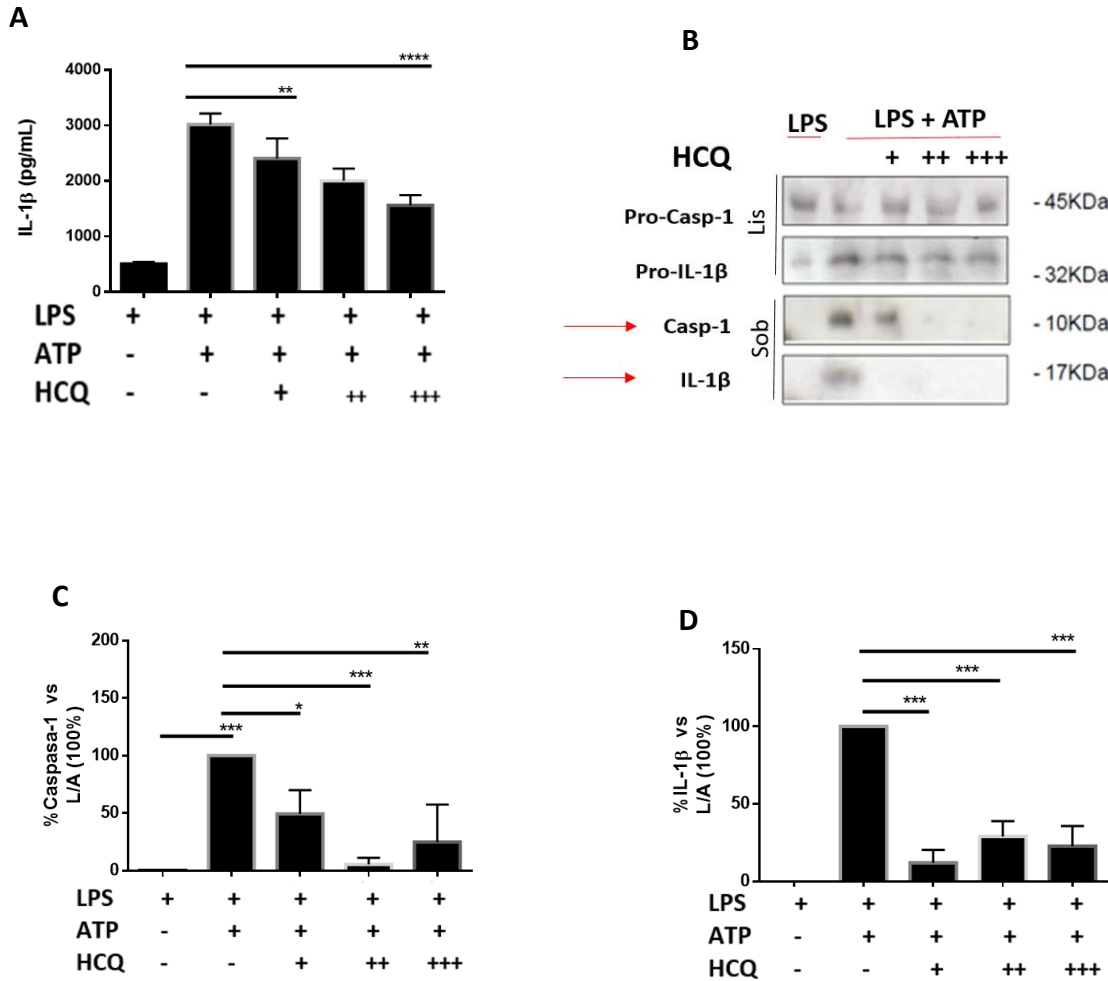


Figura 24. La HCQ inhibe la activación del IFM (Caspasa-1) y secreción de IL-1β en macrófagos THP-1 estimulados con LPS y ATP. Los macrófagos THP-1 fueron diferenciados a partir de la línea celular THP-1 con PMA 0,1 μM (48 hs) a 37 °C en medio RPMI completo (10% SFB descomplementado con calor, Pen/Strepto, β-Mercaptoetanol, Hesperidina, AA) previo a su estimulación. A) Las células fueron estimuladas con LPS 0,25 μg/mL (4 hs), lavadas y estimuladas con ATP 5 mM ± HCQ 3, 10 y 30 μM (45 min) en medio RPMI completo. Se recogió el sobrenadante para cuantificación de IL-1β mediante ELISA n = 3. Se observó una inhibición dosis dependiente de IL-1β B) Para obtención de muestras de Western Blot, las células fueron estimuladas con LPS 0,25 μg/mL (4hs), ATP 5 mM ±HCQ 3,10, 30 μM (2hs) en medio RPMI completo. El segundo estímulo fué administrado en ausencia de SFB C y D) Se analizaron las bandas de Western Blot c, donde se obtuvieron los valores para el posterior análisis estadístico en Graphpad Prisma 6. Previo el análisis estadístico de Caspasa- 1 e IL- 1β, se obtuvieron los valores de cada condición, considerando las bandas de mayor intensidad, la condición LPS y ATP, como el 100 % y el porcentaje de las demás condiciones se determinaron en base a esta referencia cuantificando las bandas con Software Image J. Posteriormente los datos de las figuras A, B, C y D fueron analizados con Software Graphpad Prism 6 *p<0,05 Tukey's multiple comparisons test en tres experimentos independientes. * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001

Los resultados obtenidos muestran una inhibición de la secreción de IL-1 β , que podría explicarse debido a una disminución de la activación de Caspasa- 1 cuando los macrófagos fueron estimulados con ATP (Figura 24), sin modificar los niveles de pro-IL-1 β en el lisado celular.

Entonces la siguiente pregunta que nos hicimos fué cual será el mecanismo por el cual la HCQ inhibe la activación del IFM? Para intentar contestar esta pregunta buscamos caracterizar los mecanismos moleculares que podrían estar asociados a la activación del IFM.

3. Caracterización de mecanismos de control del IFM por la HCQ

Considerando los resultados obtenidos hasta el momento, junto con datos de bibliografía que asocian el metabolismo iónico del K^+ y la activación del IFM, donde la Quinina y CQ inhiben canales K^+ , se pensó que la HCQ podría estar teniendo una acción en los canales de K^+ (Bokvist et al. 1990, Mancilla et al. 1990, Cook et al. 1985, Burgess et al. 1981, Reichstein et al. 1981, Ganellin et al. 2000, Alonso-Torre et al. 1993). La Quinina inhibe la secreción de IL- 1β en monocitos humanos activados con LPS y ATP (Perragaux et al. 1996). Teniendo en consideración que la HCQ es un derivado de la quinina y que se ha propuesto que el metabolismo iónico de K^+ y Ca^{++} tiene un rol fundamental en la activación del inflamasoma NLRP3 es que se decidió estudiar el IFM con LPS y la toxina Nigericina. Esta toxina es un ionóforo de K^+ , que promueve la salida artificial de K^+ a través de un poro en la membrana celular (Figura 20). Se hipotetizó que si el mecanismo de acción de la HCQ fuera la inhibición de canales de K^+ , entonces la activación del IFM inducida por Nigericina no sería afectada por la HCQ. Para esto los macrófagos THP-1 fueron estimulados de la misma manera que en el objetivo 2, pero el segundo estímulo fué nigericina en lugar de ATP. Se observó que hubo activación del IFM con LPS y nigericina, pero en concordancia con nuestra hipótesis, no se observó diferencia significativa en la activación de Caspasa- 1 ni de IL- 1β en presencia de HCQ en comparación con su control LPS/Nigericina (Figura 25).

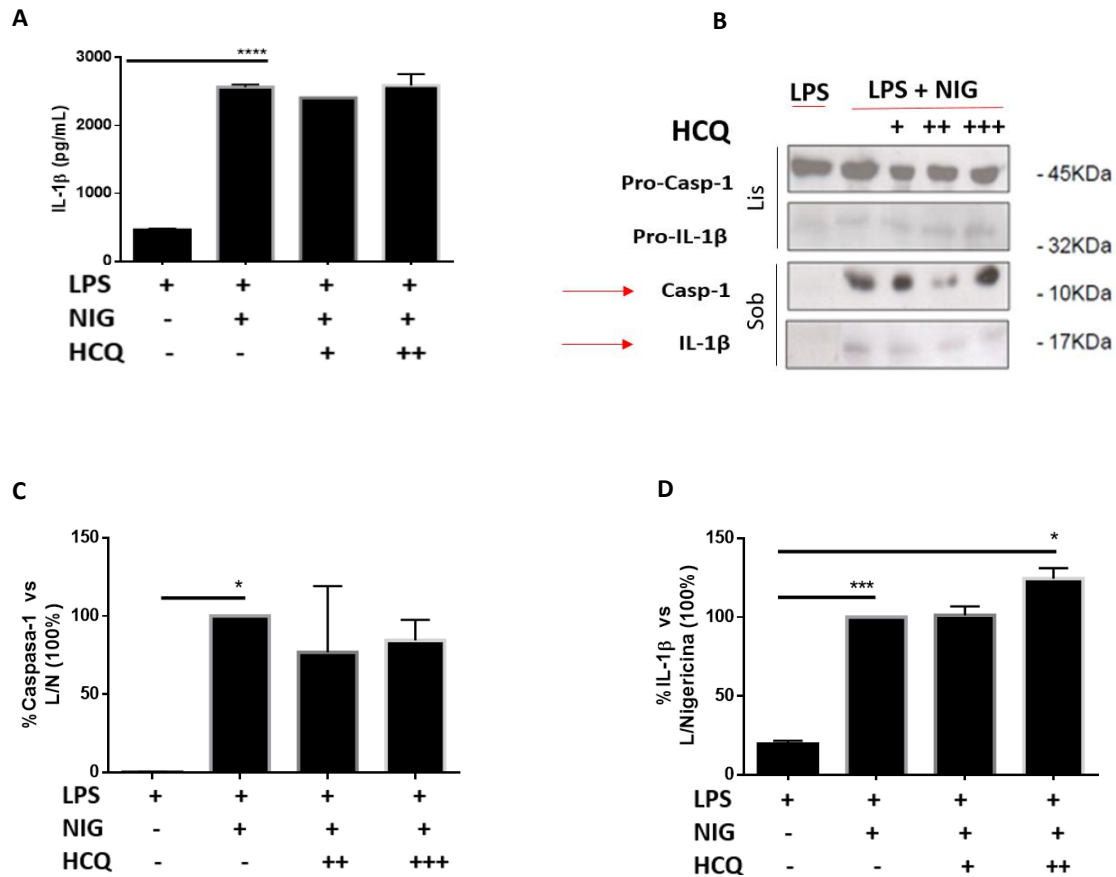


Figura 25. La HCQ no inhibe la activación del IFM (Caspasa-1) ni la secreción de IL-1 β cuando los macrófagos son estimulados con Nigericina. Los macrófagos humanos fueron diferenciados a partir de la línea celular THP-1 con PMA 0,1 μ M (48 hs) a 37 $^{\circ}$ C en medio RPMI completo (10% SFB descomplementado, Pen/Strepto, β -Mercaptoetanol, Hepes, AA) antes de ser estimulados. A) Las células fueron estimuladas con LPS 0,25 μ g/mL (4 hs), Nigericina 2,5 μ M \pm HCQ 3, 10 y 30 μ M (45 min) en medio RPMI completo. Se recogió el sobrenadante y se cuantificó IL-1 β mediante ELISA. No se observó diferencia significativa en la secreción de IL-1 β en presencia de HCQ (A) B) Para obtención de muestras de Western Blot, las células fueron estimuladas con LPS 0,25 μ g/mL (4hs), Nigericina 2,5 μ M \pm HCQ 3,10, 30 μ M (2hs) en medio RPMI completo. El segundo estímulo fué administrado en ausencia de SFB. A, C y D) Se analizaron las bandas de Western Blot con Software Image J donde se obtuvieron los valores para su posterior análisis estadístico. Los datos de las figuras A, C y D se analizaron con Software Graphpad Prism 6. Tukey's multiple comparisons test a partir de datos obtenidos en tres experimentos independientes *= p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001.

Se decidió cuantificar el K⁺ citosólico estimulando a las células con ATP y nigericina, donde se observó que la HCQ inhibe la salida de K⁺ inducida por ATP pero no por Nigericina (Figura 26).

Estos resultados sugieren que la HCQ no pareciera estar inhibiendo un proceso posterior a la salida de K^+ . Entonces pensamos que la HCQ podría estar inhibiendo canales de K^+ endógenos.

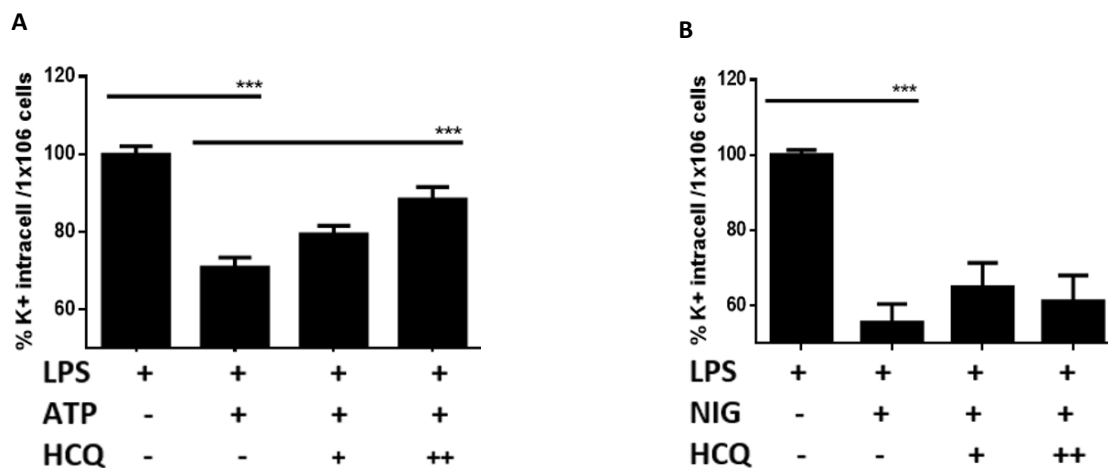


Figura 26. La HCQ inhibe la salida de K^+ inducida por ATP pero no por Nigericina. Los macrófagos fueron diferenciados a partir de la línea celular THP-1 con PMA 0,1 μ M durante (48 hs) a 37 °C en medio RPMI completo (10% SFB descomplementado, Pen/Streptomina, β -Mercaptoetanol, Hepes, AA). Las células fueron estimuladas con LPS 0,25 μ g/mL (4hs) y ATP 5 mM \pm HCQ 3, 10 μ M (2hs) y Nigericina 2,5 μ M (2 hs). Luego las células fueron lisadas en medio hipotónico con agua destilada, ultrasonido y choque térmico. Posteriormente se centrifugaron y se cuantificó el K^+ del lisado celular en equipo Cobas c311 Hitachi n= 5. Los datos se analizaron con Software Graphpad Prism 6 * $p < 0,05$ Tukey's multiple comparisons test * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Los resultados de la Figura 26, irían en el sentido de nuestras hipótesis ya que sugieren que la HCQ podría estar inhibiendo la salida de K^+ a través de la inhibición de canales iónicos.

Por otro lado se decidió cuantificar el Ca^{++} citosólico luego de activar el IFM con LPS y ATP en presencia y ausencia de HCQ mediante microscopia TimeLaps con la sonda Fura-2 que se une al Ca^{++} citosólico. Considerando el modelo propuesto por Murakami et al. 2012, donde se propone un modelo en el que un aumento de Ca^{++} citosólico provocaría daño mitocondrial y esto induciría la activación del NLRP3 y considerando los resultados obtenidos hasta el momento, se esperaba encontrar una disminución en la concentración del Ca^{++} citosólico en

presencia de HCQ. Sin embargo se obtuvo el resultado opuesto al esperado, un aumento del Ca^{++} citosólico en presencia de HCQ (Figura 27).

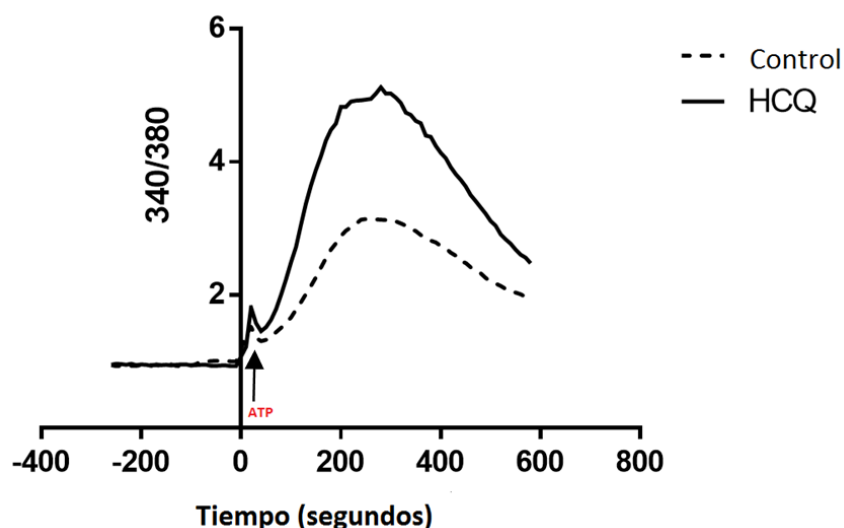


Figura 27. El Ca^{++} citosólico es mayor en las BMDCs tratadas con HCQ. Las BMDCs fueron estimuladas con LPS (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 2 horas en medio Milen C (Gibco), y luego se incubaron con sonda Fura-2 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (20 min) a 37°C, en medio HBSS con Ca^{++} , sin SBF \pm HCQ 10 μM . Se lavaron las células y en presencia y ausencia de HCQ 10 μM y se registraron las corrientes de Ca^{++} antes y después del agregado de ATP 0,5 mM \pm HCQ 10 μM . Este experimento fué realizado en un microscopio Leica DMI 6000 con un objetivo 20x/0.7 de objetivo y la sonda Fura-2 fue excitada a 340 y 380 nm. La fluorescencia emitida de 510 nm fue también registrada. Las imágenes fueron registradas con una cámara CoolSnap HQ2 CCD (photometrics). Este gráfico representa un promedio de la fluorescencia emitida por alrededor de 20 células elegidas al azar en un mismo campo observado por experimento. Los valores obtenidos, se analizaron con Software METAFUOR y los datos presentados son un promedio de dos experimentos independientes.

A partir de estos resultados (Figura 27), se generó una siguiente hipótesis: “la HCQ podría estar inhibiendo canales de K^+ , “down-stream” a la liberación del Ca^{++} inducida por ATP y de esta manera inhibiendo la activación del IFM. Considerando los datos de bibliografía en referencia a canales de Ca^{++} presentes en la MP de macrófagos THP-1, como son los canales TRPM7

estudiados en RVD. El RVD ya ha sido asociado con la activación de NLRP3 en macrófagos THP-1 (Compan et al. 2012). Se decidió entonces inducir la activación del IFM promoviendo el eflujo de K^+ utilizando como segundo estímulo un buffer sin K^+ . Se esperaba activar RVD y NLRP3 como ya fué demostrado por Compan et al. 2012 y estudiar el efecto de la HCQ en los canales iónicos implicados en este mecanismo. El objetivo de este experimento consistió en estudiar si la HCQ era capaz de inhibir la activación de IL-1 β inducida por la activación de los canales iónicos que participan en RVD. Como se esperaba, se indujo la secreción de IL-1 β , sin embargo no se observó inhibición de IL-1 β en presencia de HCQ.

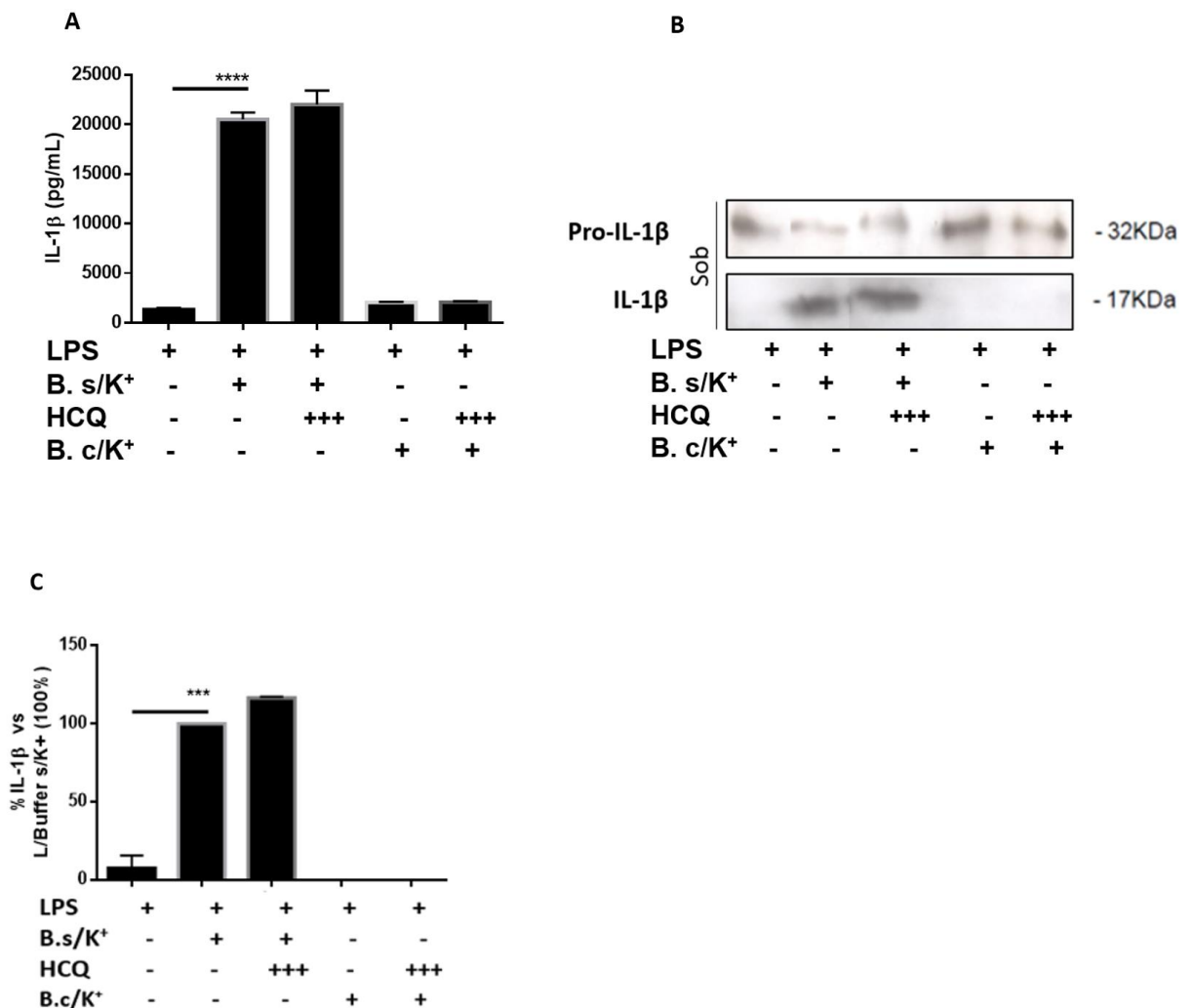


Figura 28. La HCQ no inhibe la secreción de IL-1 β en macrófagos estimulados con LPS y medio *sin K⁺*. Los macrófagos humanos fueron diferenciados a partir de la línea celular THP-1 con 0,1 μ M PMA (48 hs) a 37 °C en medio RPMI completo (10 % SFB descomplementado, Pen/Strepto,

β -Mercaptoetanol, Hepes, AA) A, B) Los macrófagos fueron estimulados con LPS 0,25 μ g/mL (4 hs), lavados y estimulados con Buffer con ó sin K^+ \pm HCQ 3, 30 μ M (2 hs). Se lavaron las células y se recogió el sobrenadante celular para el análisis de IL-1 β por ELISA y Western Blot n= 3. C) Las bandas de B se analizaron con Software Image J y luego A, B C fueron analizadas con software Graphpad Prism 6 Tukey's multiple comparisons test considerando tres experimentos independientes *= p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001. A, B, C) Se observa activación de IL- 1 β cuando los macrófagos son estimulados con buffer sin K^+ pero no en buffer con K^+ a concentración fisiológica. No se observó diferencia significativa en la secreción de IL-1 β en presencia de HCQ.

En buffer con contenido de K^+ fisiológico no hubo secreción de IL-1 β significativa, como era de esperar, mientras que en presencia de medio extracelular sin K^+ si hubo secrecion de IL- 1 β madura. Sin embargo ésta no fue inhibida por la HCQ (Figura 28), por lo que se descartaron los canales iónicos implicados en RVD como posibles blancos de la HCQ.

Pensamos entonces que la HCQ podría estar inhibiendo otros canales de K^+ presentes en estas células, como los canales de K^+ sensibles al Ca^{++} (Figura 8). Siguiendo esta línea de pensamiento, teníamos resultados de Ca^{++} citosólico, en donde la HCQ no disminuyó el aumento del Ca^{++} inducido por ATP (Figura 27) que iría en el mismo sentido que nuestra hipótesis. Considerando que el Ca^{++} ha sido asociado a la activación del IFM, aunque su importancia es todavía un tema de debate, es que decidimos entonces estudiar la activación del IFM, mediante la activación de estos canales in vitro. Para esto se utilizo como primer señal LPS y como segunda señal ATP y activadores farmacológicos de estos canales en presencia y ausencia de inhibidores e HCQ. Dentro de los activadores específicos, se utilizó NS1619 siendo un activador del canal BKCa e Iberiotoxina (IBTx) un inhibidor específico de BKCa y TEA. También se utilizó un activador del canal KCa3.1, NS309 y un inhibidor de este canal, Clotrimazole (CTMZ). Con este experimento se esperaba evaluar si los inhibidores de estos canales eran capaces de inhibir la secreción de IL- 1 β inducida por ATP. Por otro lado se buscaba estudiar si los activadores de estos canales eran capaces de activar los canales estudiados e inducir secreción de IL-1 β y luego si los inhibidores, y la HCQ era capaz de inhibir

la IL-1 β . Los resultados muestran que la secreción de IL-1 β inducida por LPS y ATP fué inhibida por un inhibidor específico de BKCa la IBTx (Figura 29 A). Sin embargo la secreción de IL-1 β inducida por ATP, no fué inhibida por un inhibidor del canal KCa3.1 (Figura 29 C). El canal BKCa es activado por despolarización y además por Ca⁺⁺, mientras que KCa3.1 es insensible al V_m y depende de Ca⁺⁺ (Feske et al. 2015). Entonces creemos que una posible explicación de la ausencia de inhibición por el inhibidor de KCa3.1 (CTMZ), podría ser que el aumento de Ca⁺⁺ inducido por ATP, no fuera suficiente para activar el canal KCa3.1 y por esta razón no hubiera una inhibición por CTMZ (Figura 29 C). Mientras que la despolarización inducida por entrada de Ca⁺⁺ con ATP si fuera suficiente para activar el canal BKCa y por esto se observara una inhibición por IBTx.

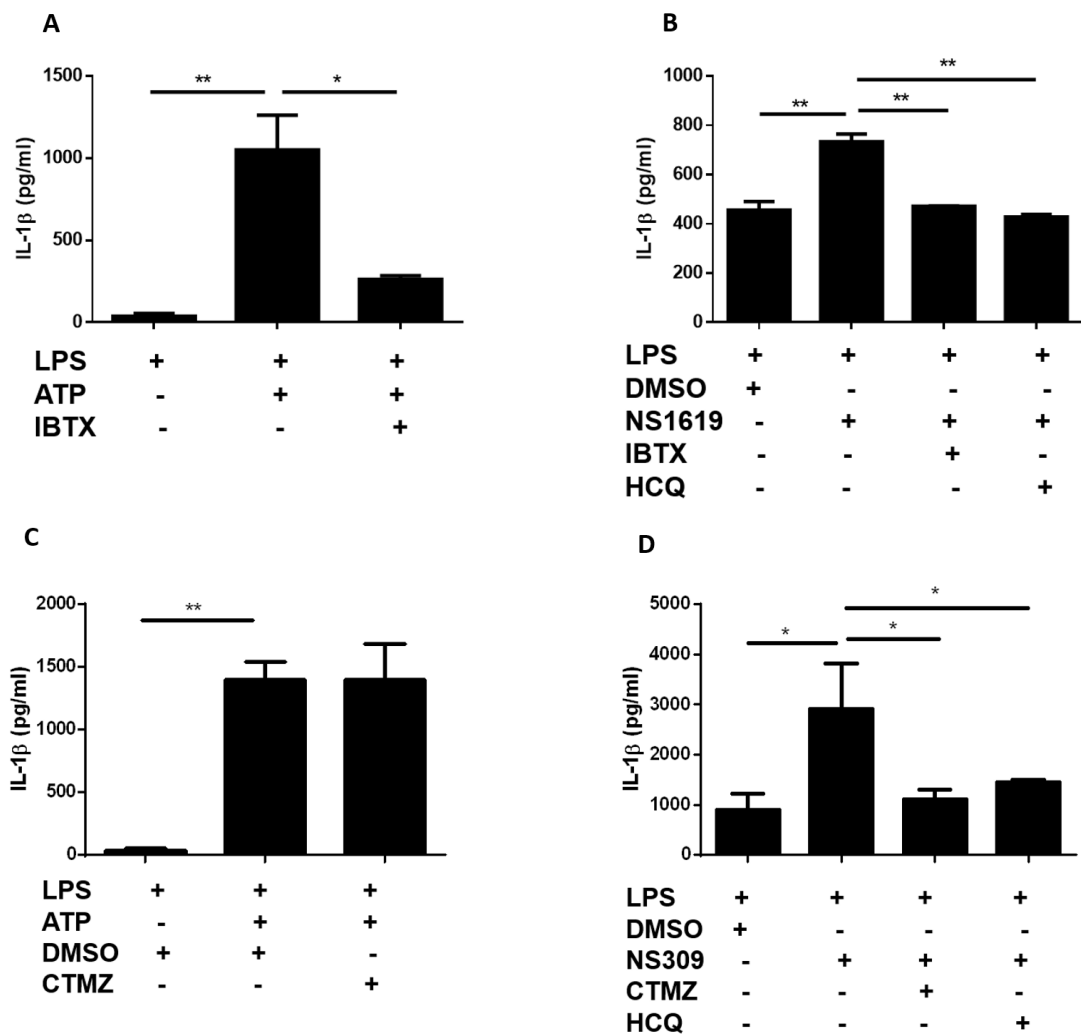


Figura 29. BKCa y KCa3.1 podrían estar implicados en la activación del IFM. Los

macrófagos humanos fueron diferenciados a partir de la línea celular THP-1 con PMA 0,1 μM 48 hs a 37 °C en medio RPMI completo. A) Las células fueron estimuladas con LPS 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (4 hs), ATP 5 mM (45 min) \pm Iberiotoxina (IBTx) 100 nM (45 min) B) LPS 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (4hs), NS1619 25 μM , Iberiotoxina (IBTx) 50 nM e HCQ 30 μM (45 min) C) LPS 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (4 hs), ATP 5 mM y Clotrimazole 10 μM (45 min) D) LPS 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (4 hs), NS309 10 μM , TEA 1 mM y Clotrimazole 10 μM (45 min). NS1619 y NS309 fueron disueltos en DMSO. Se recolectaron los sobrenadantes de cultivo para cuantificación de IL-1 β mediante ELISA. Los datos se analizaron con Software Graphpad Prism 6 * $p < 0,05$ Tukey's multiple comparisons test en tres experimentos independientes *= $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

De manera interesante los activadores de los canales BKCa y KCa3.1 sin ATP, indujeron la secreción de IL-1 β , siendo ésta inhibida por inhibidores de estos canales como son IBTx y CTMZ. Estos resultados sugieren que la IL-1 β generada inducida por estos activadores no pareciera ser un efecto “off-target” de NS1619 y NS309 (Figura 29 B y D). Apoyando nuestros resultados previos y en la línea de nuestras hipótesis, la HCQ fue capaz de inhibir la secreción de IL-1 β inducida por NS1619 y NS309 (Figura 29 B y D), por lo que se piensa que BKCa podría ser uno de los blancos de la HCQ y posiblemente KCa3.1.

Se buscó confirmar estos resultados mediante la medición de la conductancia en la MP de estos macrófagos mediante estudios de electrofisiología en colaboración con el Dr. Gonzalo Ferreira del Departamento de Biofísica de la Facultad de Medicina, Laboratorio de Canales Iónicos. El análisis de las corrientes de los canales de K⁺ sensibles al Ca⁺⁺, se llevó a cabo mediante la técnica de Patch Clamp en célula entera, en macrófagos THP-1 (Figura 22). Durante los experimentos se utilizó un protocolo de pulso de corriente eléctrica que generara una rampa de V_m de -20 a 70mV, de tal forma de deshacerse de las corrientes de K⁺ correspondientes a canales iónicos diferentes a los que se buscaba estudiar (sección “materiales y métodos”). Al inicio de cada experimento, se determinó la capacitancia de las células para poder comparar experimentos llevados a cabo en días diferentes. Para esto se midió la densidad de corriente, o sea la corriente por unidad de área como se indica en todas las figuras de resultados obtenidos Figuras 30-34.

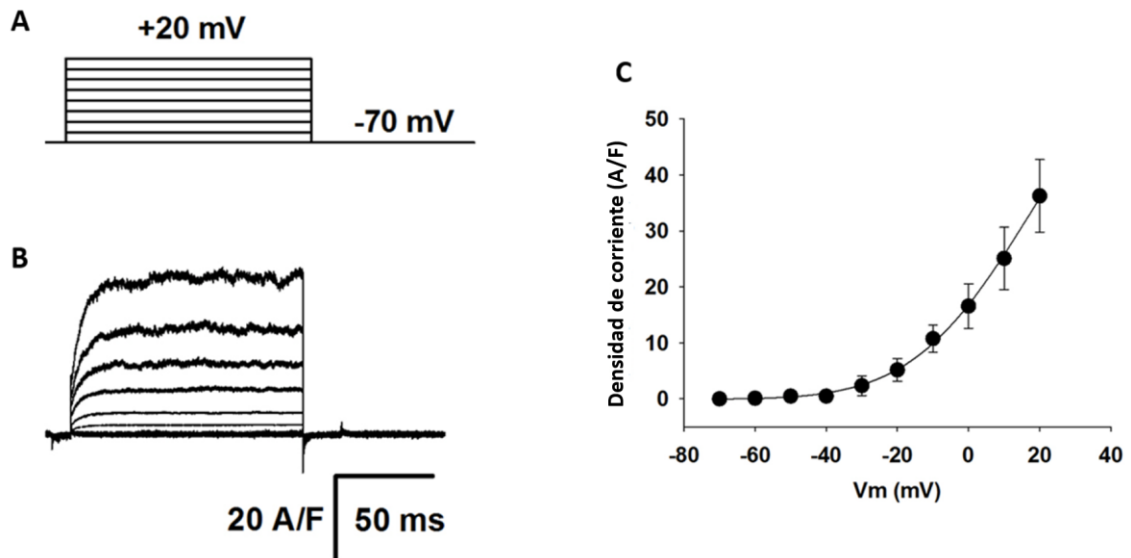


Figura 30. Entre -20 a 30 mV se observan corrientes salientes de K^+ en macrófagos THP-1. Pevio al experimento se pusieron a diferenciar monocitos THP-1 con PMA durante 48 hs en medio RPMI completo a 37°C y CO2 5% en cubre objetos en el cual luego se registraron las corrientes correspondientes a la celula entera con pipeta de patch. La solución de pipeta contenia 1 μ M de buffer Ca^{++} buffer y K^+ 150 mM mientras que la solución des baño tenía una concentración de K^+ de 5,4 mM. Las células fueron estimuladas con pulsos de voltaje entre -20 a 30 mV A) Rampa de voltaje de trabajo B) Representativo de corriente total en presencia de Ca^{++} 1 μ M C) Representativo de Curva densidad de corriente vs Vm luego de unos minutos en la solución de pipeta con 1 μ M Ca^{++} . Corriente saliente (positiva). Las imágenes mostradas corresponden a tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados utilizando Clampfit (Molecular devices) y Sigmaplot 11 (Jandel Scientific).

Considerando que son corrientes salientes, por las características cinéticas, el Vm de activación y comportamiento ante las soluciones de trabajo, se cree que podrían ser corrientes de K^+ sensibles al Ca^{++} como las correspondientes a los canales BKCa y KCa3.1. No se hizo una curva intensidad de corriente (I) y Vm como habitualmente se hace con el fin de determinar el potencial de reversión y asi poder confirmar que son canales de K^+ , pero por las características observadas de las corrientes, se pensó que eran corrientes de K^+ .

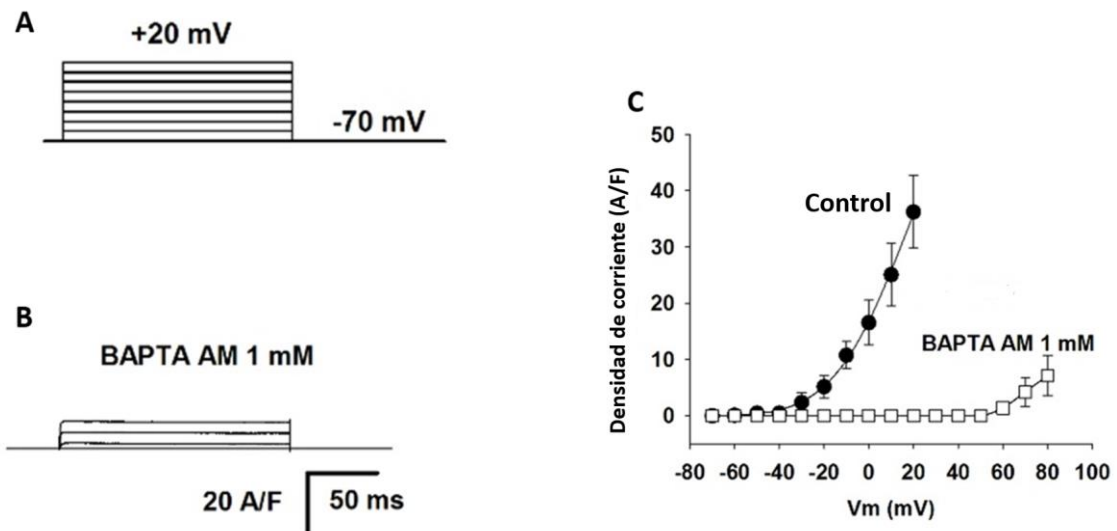


Figura 31. Los canales de K^+ activos entre (-20) a 30 mV son dependientes de Ca^{++} . Experimento se pusieron a diferenciar monocitos THP-1 con $0,1\mu M$ de PMA (48 hs) en medio RPMI completo a $37^\circ C$ y CO_2 5% en cubre objetos donde se registraron las corrientes correspondientes a la célula entera con pipeta de patch. La solución en la pipeta contenía Ca^{++} intracelular buffereado a $1\mu M$ y K^+ 150 mM. Solución de baño con una concentración de K^+ de 5,4 mM y BAPTA-AM 1 mM. Las células fueron estimuladas a V_m -20 – (30 mV) A) Rampa de V_m de trabajo -70- (60 mV) B) Representativo de corriente total observada C) Representativo de Curva de densidad de corriente vs V_m luego de unos minutos en la solución de pipeta con Ca^{++} $1\mu M$ en presencia y ausencia de BAPTA-AM. Las imágenes mostradas corresponden a tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados utilizando Clampfit (Molecular devices) y Sigmaplot 11 (Jandel Scientific). Se observa una disminución en la corriente iónica saliente en presencia de BAPTA-AM.

El quelante de Ca^{++} BAPTA-AM, llevó a que la activación de los canales que eran activados a -20 mV en el control, fueron activadas a voltajes mayores de 60 mV. Estos resultados muestran que dichas corrientes corresponderían a canales iónicos activados por Ca^{++} . Se estudio el efecto de un inhibidor del canal BKCa como es TEA y se observo una inhibición parcial la corriente total observada en la condición de referencia. Los resultados obtenidos hasta el momento junto con datos bibliograficos, sugieren que las corrientes observadas en la condición de referencia podrían corresponder a canales de K^+ activadas por Ca^{++} como son BKCa, KCa 3.1 y sKCa. Se conoce que BKCa y sKCa son sensibles a TEA, por lo que se cree que la corriente que disminuyo podría corresponder a la corriente correspondiente a los canales

BKCa y sKCa. Mientras que queda un remanente de corriente que pensamos que podría corresponder a los canales KCa3.1 considerando que la mayoría de las isoformas de estos canales son insensibles al TEA (Figura 32).

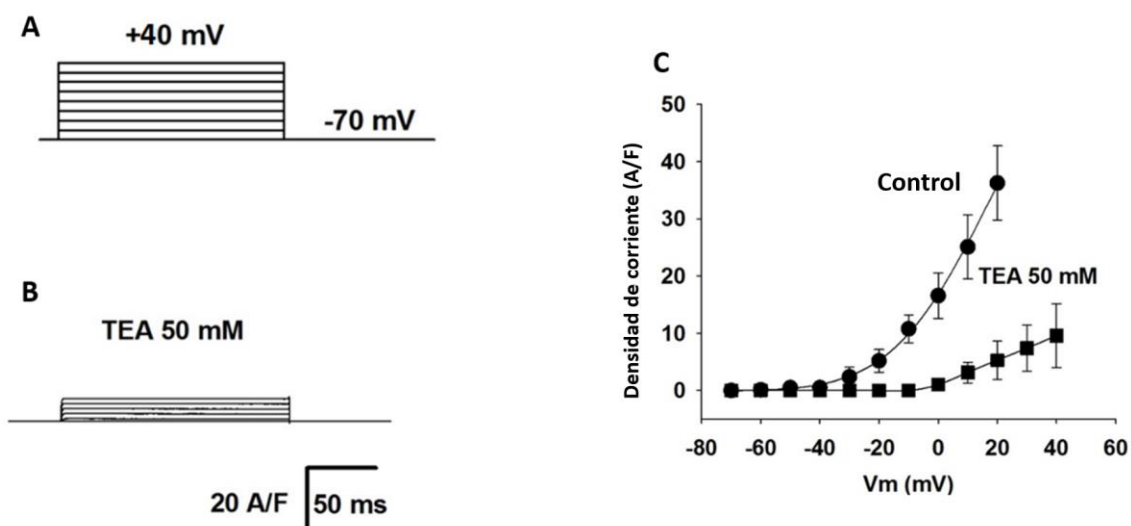


Figura 32. La corriente de K^+ dependiente de Ca^{++} no bloqueada por TEA podría ser de los canales KCa3.1 y sKCa. Previo al experimento se pusieron a diferenciar monocitos THP-1 con PMA durante 48 hs en medio RPMI completo a 37°C y CO₂ 5%, en cubre objetos en el cual luego se registraron las corrientes correspondientes a la célula entera. Solución de pipeta conteniendo Ca^{++} buffereado a 1 μ M y K^+ 150mM. Solución de baño K^+ 5,4mM y TEA 50mM. Las células fueron estimuladas con pulsos de voltaje entre -20mV hasta aproximadamente 40mV A) Rampa de voltaje de trabajo -20mV a 40mV B) Representativo de corriente total C) Representativo de Curva Densidad de corriente vs Vm luego de unos minutos en la solución de pipeta con Ca^{++} 1 μ M. Queda un remanente de corriente que pareciera ser insensible a TEA+. Las imágenes mostradas corresponden a tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados utilizando Clampfit (Molecular devices) y Sigmaplot 11 (Jandel Scientific).

A partir de estos resultados se decidió estudiar que sucedía cuando los macrófagos THP-1 eran expuestos a un inhibidor específico de los canales BKCa como es la IBTx. En la línea de nuestras hipótesis, se registró una disminución de la corriente saliente observada en presencia de IBTx, sugiriendo que las conductancias observadas corresponden a BKCa y probablemente también por KCa3.1 y sKCa (Figura 33). Un canal que ha sido ampliamente reportado en bibliografía en

macrófagos humanos y se cree que gran parte del remanente de la corriente que se observa en la Figura 33, correspondería al canal KCa3.1. Por bibliografía se sabe que KCa3.1 es insensible a IBTX (Gao et al., 2010).

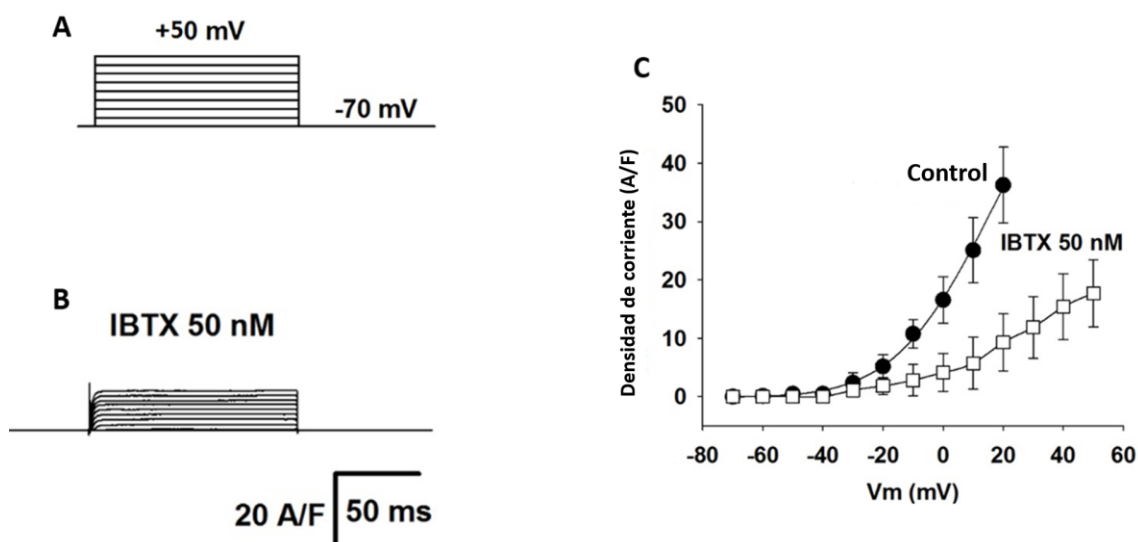


Figura 33. BKCa podría ser uno de los canales inhibidos por la HCQ. Previo al experimento se pusieron a diferenciar monocitos THP-1 con PMA durante 48 hs en medio RPMI completo a 37°C y CO₂ 5%, en cubre objetos en el cual luego se registraron las corrientes correspondientes a la célula entera. Solución de pipeta conteniendo Ca⁺⁺ bufferado a 1 μM y K⁺ 150mM. Solución de baño K⁺ 5,4mM e IBTx 50nM. Las células fueron estimuladas con pulsos de voltaje entre -70mV hasta aproximadamente 40mV A) Rampa de voltaje de trabajo -70mV a 40mV B) Representativo de corriente total C) Representativo de Curva Densidad de corriente – Voltaje luego de unos minutos en la solución de pipeta con Ca⁺⁺ 1 μM. Queda un remanente de corriente que podría ser insensible a IBTx. Las imágenes mostradas corresponden a tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados utilizando Clampfit (Molecular devices) y Sigmaplot 11 (Jandel Scientific).

En las gráficas de densidad de corriente (A/F) vs Vm en presencia de TEA (Figura 32) pareciera haber mayor densidad de corriente en este último experimento con IBTX a un mismo Vm (Figura 33). Eso podría llevar a pensar que la diferencia observada entre ambos experimentos podría deberse a una corriente correspondiente a sKCa, considerando que sKCa es inhibido por TEA, mientras que no es inhibido por IBTx. La conductancia de estos canales es muy pequeña y

es difícil de ser estudiada de manera aislada en las condiciones experimentales de este trabajo. Se cree por lo tanto que gran parte de la corriente que no es inhibida en la Figura 33, podría corresponder a el canal $KCa_{3,1}$ y una minoritaria a $sKCa$, considerando que la conductancia de este último es menor que la de $KCa_{3,1}$.

Por otro lado, se quería observar si las corrientes salientes observadas eran inhibidas por la HCQ. De acuerdo a nuestras hipótesis y en la misma línea de resultados previos, se observó una inhibición dosis dependiente de la corriente total observada en comparación con la referencia sin HCQ (Figura 34-C), y a dosis $30 \mu M$ la inhibición fue total, o por debajo del límite de sensibilidad del equipo de medición utilizado. Entonces nuestros resultados muestran que la HCQ inhibe canales de K^+ activados por Ca^{++} en macrófagos THP-1 de manera dosis dependiente.

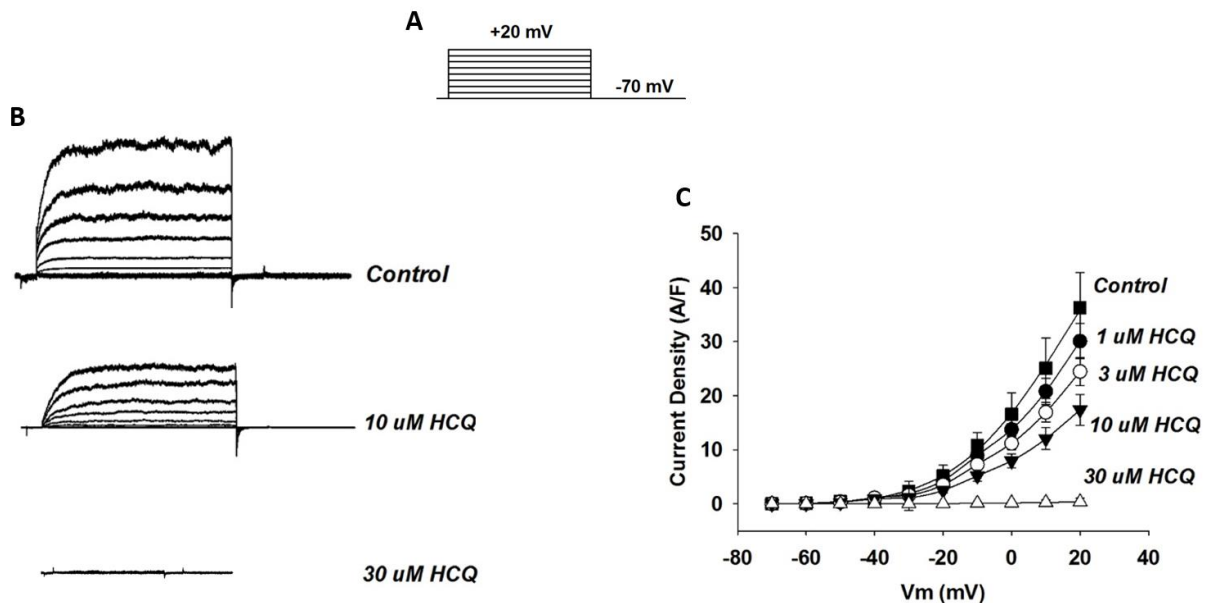


Figura 34. La HCQ inhibe canales de K^+ sensibles al Ca^{++} de manera dosis dependiente. Macrófagos THP-1. Solución de pipeta conteniendo Ca^{++} buffereado a $1 \mu M$ y K^+ $150 mM$. Solución de baño K^+ $5,4 mM$ y diferentes dosis de HCQ $1, 3, 10$ y $30 \mu M$. Las células fueron estimuladas con pulsos de corrientes voltaje entre $-70 mV$ hasta aproximadamente $40 mV$ A) Rampa de voltaje de trabajo $-70 mV$ a $20 mV$ B) Representativo de corriente total en presencia de HCQ $1, 3, 10, 30 \mu M$ C) Representativo de Curva de A/F vs V_m en la solución de pipeta con $Ca^{++} 1 \mu M$. Las imágenes mostradas corresponden a tres experimentos independientes. Los

datos fueron analizados utilizando Clampfit (Molecular devices) y Sigmaplot 11 (Jandel Scientific).

La inhibición dosis dependiente observada, concuerda con los resultados previos en objetivos 1, 2. Por otro lado también se estudió la corriente iónica total celular a una dosis de HCQ 10 μM y a diferentes tiempos, donde se observó que la corriente iónica de la célula entera, disminuye al 40% luego de 20 minutos (Figura 35).

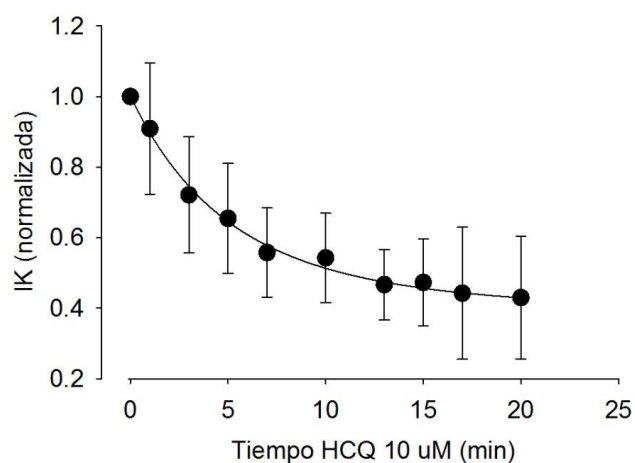


Figura 35. La corriente de K^+ sensible al Ca^{++} es inhibida por la HCQ de manera tiempo dependiente. Macrófagos humanos (THP-1). Solución de pipeta conteniendo Ca^{++} buffereado a 1 μM y K^+ 150mM. Solución de baño K^+ 5,4mM e HCQ 10 μM . Representativo de corriente total en presencia de HCQ 10 μM a diferentes tiempos. La imagen mostrada corresponde a n = 3 experimentos independientes.

Discusión

La modulación de las respuestas inmunes como tratamiento de enfermedades inflamatorias como es el LES, se ha venido haciendo desde hace muchos años. La estrategia de modulación de la respuesta inmune centrada en el IFM es un enfoque mas novedoso que está siendo actualmente estudiado en el contexto de otras patologías inflamatorias como en la enfermedad de Alzheimer (Meng et al. 2013) ya que se ha encontrado una asociación entre el inflamasoma NLRP3 y dicha enfermedad (Sarasella et al.2016). Por lo que creemos que todo conocimiento que aporte en una mejora en la comprensión de la regulación del IFM podría ser de gran utilidad en las patologías donde este juega un rol en la patogénia de la enfermedad.

El presente trabajo de maestría se centro en la búsqueda de novedosos mecanismos anti-inflamatorios de la HCQ, siendo ésta considerada la piedra angular del tratamiento de LES, como ya fué mencionado por Ruiz Irastorza et al. 2008. Trabajos como el de Katelnson et al., 2015 han asociado al IFM NLRP3 con LES. Considerando que el mecanismo de acción de la HCQ en la modulación de la respuesta inmune es pobremente comprendida y al día de hoy no parecieran conocerse blancos moleculares que expliquen parte de sus mecanismos anti-inflamatorios, es que se decidimos centrar este trabajo en la caracterización de nuevos mecanismos anti-inflamatorios.

Los resultados presentados en este trabajo muestran que uno de los mecanismos anti-inflamatorios de la HCQ es a través de la inhibición de canales iónicos, siendo esto un novedoso mecanismo anti-inflamatorio. Los resultados obtenidos en los experimentos de electrofisiología muestran una inhibición de canales de K^+ activados por Ca^{++} siendo la corriente ionica inhibida con HCQ de manera dosis dependiente. En el mismo sentido se observó una inhibición en la secreción de IL-1 β en APCs humanas y murinas de manera dosis dependiente (Figura 23) y esta disminución se asoció a una inhibición en la activación de Caspasa-1 mediante Western Blot. En este experimento de Western Blot faltó una proteína house keeping para poder normalizar los resultados, pero si se analizaron las formas inactivas de pro- Caspasa- 1 y pro-IL- 1 β en el lisado celular donde no se observó una disminución de éstas en presencia de HCQ. Se observó una disminución dosis dependiente de la Caspasa- 1 a dosis de HCQ 3 y 10 μ M, mientras que a dosis 30 μ M se observó un aumento en comparación con la dosis 10 μ M, quizás en esta condición se sembró mayor cantidad de proteína, faltaría una proteína housekeeping. Una posible error en el análisis de los datos podría ser que para las gráficas mostradas se consideró que las formas activas se encontraban en el sobrenadante

de cultivo, mientras que las formas inactivas en el lisado, pero puede ser que parte de las formas activas no hayan sido secretadas al medio extracelular. Para esto se deberían estudiar las formas activas e inactivas tanto en el lisado y sobrenadante y observar si hay diferencias a los resultados mostrados. Los resultados obtenidos hasta este momento nos sugerían que la HCQ estaría inhibiendo la secreción de IL-1 β , a través de la inhibición de la activación del IFM (Caspasa-1). Por otro lado experimentos con activadores e inhibidores de los canales de K⁺ activados al Ca⁺⁺ e HCQ mostraron una inhibición de la secreción de la IL-1 β en presencia de la HCQ cuando se estimulaba el IFM con activadores de estos canales BKCa y KCa3.1 como segunda señal. Creemos que los efectos observados no se deben a efectos off-target, ya que la IL-1 β cuantificada en la condición con el activador del canal estudiado es inhibida por el inhibidor de dicho canal al nivel del control. Por otro lado por bibliografía teníamos conocimiento que la Quinina, CQ, e inclusive la HCQ son inhibidores de canales de K⁺, y los canales propuestos han sido ya estudiados en los macrófagos THP-1 utilizados en nuestros experimentos. Diferentes trabajos en bibliografía apoyan la importancia del metabolismo iónico del K⁺ en la activación del IFM y es por esto que se decidió estudiar al IFM con otro activador conocido como es la nigericina. Se observó que la Nigericina activo el IFM, pero en su presencia, la HCQ no alteró la secreción de IL-1 β , ni la activación del IFM a diferencia de la inhibición observada cuando se activaba el IFM con ATP. Esto nos llevó a pensar que la HCQ podría estar teniendo alguna acción a nivel de canales de K⁺. Luego la cuantificación de K⁺ citosólico en macrófagos THP-1 cuyo IFM fué activado con LPS/ATP \pm HCQ y LPS/Nigericina \pm HCQ cofirmó nuestra hipótesis. En este experimento se observó que el K⁺ citosólico en las células estimuladas con LPS/ATP, difería significativamente del K⁺ celular medido cuando las células fueron estimuladas con LPS, siendo en este último mayor que el primero. Esto pareciera lógico ya que cuando se administra ATP, se promovería la salida de K⁺ mediante la activación de canales ionotrópicos P2X7 y de esta manera disminuiría el K⁺ citosólico. Por otro lado en estos macrófagos activados con LPS/ATP en presencia de HCQ hubo un aumento dosis dependiente del K⁺ intracelular, y una posibilidad podría ser que la HCQ estuviera inhibiendo la salida del K⁺ hacia el medio extracelular por inhibición de canales de K⁺. Por otro lado, durante la estimulación de los macrófagos THP-1 con LPS/Nigericina se observó una disminución significativa del K⁺ celular en la condición LPS/Nigericina si se la compara con la condición LPS, y esto también era lo esperado considerando que la nigericina es un ionóforo de K⁺ y se espera que promueva la salida artificial de K⁺. Luego en la condición LPS/Nigericina a diferentes dosis de HCQ, no se observó diferencia significativa entre la presencia y ausencia de HCQ. Entonces pareciera que la HCQ estuviera inhibiendo la salida de K⁺ cuando el estímulo era ATP. En base a estos resultados y a datos bibliográficos es que aumentó nuestra confianza

en la hipótesis de que la HCQ podría estar inhibiendo la salida de K^+ , mediante la inhibición de canales de K^+ . Teníamos por otro lado resultados en la cuantificación de Ca^{++} citosólico luego de la activación del IFM con LPS/ATP que muestran que el Ca^{++} citosólico es mayor en la condición LPS/ATP en presencia de HCQ que en ausencia de esta. Se esperaba que en presencia de HCQ el Ca^{++} citosólico estuviera disminuído teniendo en consideración un modelo de activación del IFM en el que se ha propuesto que un aumento de Ca^{++} citosólico llevaría a un aumento de Ca^{++} en la mitocondria, con el consecuente daño mitocondrial y la liberación de mROS que llevaría a la activación del IFM (Murakami et al. 2012). Sin embargo para nuestra sorpresa, se obtuvo el resultado opuesto, un aumento de Ca^{++} citosólico en presencia de HCQ. Esto llevó a una nueva hipótesis, en la que proponíamos que la HCQ podría estar inhibiendo alguna vía “down-stream” a la liberación del Ca^{++} inducida por ATP. Aquí se decidió buscar en bibliografía canales de K^+ , Ca^{++} y canales que asociaran ambos iones y además el IFM. Inicialmente se pensó en canales de K^+ activados por diferencia de gradiente electroquímico como estudió Perragaux et al. 1996, pero la HCQ no inhibió la IL-1 β secretada cuando se utilizó un medio sin K^+ para activar el IFM. Otro trabajo en donde se muestra la activación del IFM en un medio con bajo contenido de K^+ extracelular, mostró que se activaba un mecanismo de regulación de volumen celular (RVD) donde se activaban canales de K^+ y canales de Ca^{++} como canales TRP, necesarios para la activación del NLRP3 (Compan et al. 2012). Entonces en una búsqueda de posibles canales iónicos blancos de la HCQ, se estimulo el IFM en macrófagos THP-1 donde se utilizo un medio sin K^+ con la misma composición química que en el trabajo de Perragaux et al (1996). Se activó el IFM en macrófagos THP-1 primeados con LPS y posteriormente con buffer sin K^+ donde se observo activación de IL-1 β , sin embargo no se observó inhibición de la secreción de IL- 1 β en presencia de HCQ. En base a estos resultados, se descartó que la HCQ estuviera actuando en alguno de los canales implicados en RVD.

Posteriormente se estudiaron canales de K^+ sensibles al Ca^{++} en macrófagos THP-1 como son BKCa y sKCa (De Coursey et al. 1996) y otros trabajos donde se encontró que KCa3.1 se encuentra presente en macrófagos humanos de PBMC (Gao et al. 2010). A partir de esto datos se decidió estudiar si se inducía la activación del IFM al estimular las células con LPS y activadores farmacológicos de estos canales, siendo NS309 activador de KCa3.1 y sKCa, y NS1619 activador de BKCa. Se observó que cuando se estimulaban las células con LPS/NS1619 había una activación de la IL-1 β ya que hubo un aumento significativo en la cantidad de IL-1 β en el sobrenadante de la condición LPS/NS1619 en comparación con su control LPS/DMSO.

Mientras que la IL-1 β que se había observado en la condición del activador, se encontró disminuida en presencia del inhibidor de este (IBTx) al nivel del control, lo que llevaría a pensar que la IL-1 β inducida por este activador no se debería a un efecto off-target. En presencia de HCQ hubo inhibición significativa de la IL-1 β , lo que sugeriría que este canal BKCa podría estar siendo inhibido por la HCQ también. Por otro lado cuando los macrófagos THP-1 fueron estimulados con LPS/NS309 también hubo activación de IL-1 β y esta fué inhibida por el inhibidor de este canal CTMZ, por lo que se podría decir que la IL-1 β observada por NS309 tampoco sería un efecto off-target de este activador y también hubo inhibición de la IL-1 β en presencia de HCQ, sugiriendo que este canal iónico podría ser otro blanco de la HCQ.

Estos resultados estimularon a continuar con la caracterización de los posibles canales iónicos en los que podría estar actuando la HCQ mediante electrofisiología. Para esto se utilizó la metodología de patch clamp en célula entera. Con esta metodología se estudió el efecto de la HCQ a nivel de las corrientes iónicas de los macrófagos THP-1 en presencia de Ca⁺⁺ 1 μ M. Durante estos experimentos se decidió trabajar en un rango de V_m de tal manera de no tener corrientes de K⁺ u de otros iones que pudieran ser confundentes, como son las corrientes correspondientes a los canales Kir2.1. Estas corrientes Kir 2.1 pueden ser entrantes o salientes dependiendo del V_m, pero ya han sido estudiadas y se conoce que son inhibidas por CQ. Son corrientes activadas a V_m hiperpolarizante, osea a un V_m mas negativo que las condiciones en las en nuestras condiciones experimentales. En las condiciones de este trabajo, se observaron corrientes salientes y se dedujo que eran de K⁺ debido al comportamiento conocido de estas corrientes ante las condiciones de trabajo utilizadas. No se estudió el potencial de reversión V_{rev} de la corriente ionica observada para verificar si era una corriente de K⁺, donde se esperaría que el V_{rev} fuera igual al del equilibrio del K⁺ para verificar que son corrientes de K⁺. Luego se estudiaron las corrientes en presencia de un quelante de Ca⁺⁺, BAPTA-AM, en la solución del baño y se registró un corrimiento en la curva densidad de corriente vs voltaje concluyendo así que los canales estudiados eran dependientes de Ca⁺⁺. En experimentos

posteriores, se estudió el comportamiento de estos canales en presencia de un inhibidor específico del canal BKCa como es IBTx y se observó una inhibición parcial de la corriente, sugiriendo que parte de la corriente iónica observada correspondería a este canal BKCa. Se piensa que BKCa podría ser uno de estos canales en base a datos de bibliografía y además porque con el inhibidor específico de BKCa (IBTx) se observó una inhibición de parte de las corrientes. Se piensa que en dicho experimento las corrientes remanentes podrían ser de KCa3.1 y en menor medida de sKCa, siendo ambos canales son insensibles a la IBTx. Luego con TEA inhibidor menos específico que IBTx, también se observó inhibición de una fracción de la corriente con respecto a la condición de referencia aumentando nuestra confianza en que las corrientes inhibidas fueran de BKCa y posiblemente sKCa, y las corrientes que no fueron inhibidas por TEA de KCa3.1. Además se observó que la corriente remanente con IBTx pareciera ser mayor que la inhibida por TEA, llevando a pensar que sKCa también podría estar presente y la diferencia observada entre TEA e IBTx podría corresponder a sKCa, pero esto son ideas que deberían ser confirmadas mediante la utilización de un inhibidor específico de sKCa, como es la apamina.

Por otro lado se observó una inhibición de manera dosis dependiente de la corriente en presencia de HCQ y a dosis de HCQ 30 μ M hubo una inhibición total de la corriente de K⁺ observada. No se descarta la posibilidad de que además pueda haber otros canales en los que esté actuando la HCQ. Con el fin de poder evaluar si hay otros canales implicados en la activación del IFM, además de los propuestos en este trabajo, sería bueno utilizar inhibidores específicos de los tres canales a la vez y observar si se inhiben o no todas las corrientes en el rango de V_m estudiado en nuestros experimentos. En el caso de que hubiera una inhibición total de la corriente iónica, podríamos acercarnos a la afirmación de que las corrientes observadas inhibidas por HCQ corresponderían exclusivamente a estos canales. Pero para confirmar esta hipótesis se podrían silenciar los genes correspondientes a estos canales BKCa, KCa3.1 y sKCa en los macrófagos estudiados. En caso de que desaparecieran las corrientes

observadas, se podría afirmar que en el rango de V_m de trabajo, la HCQ inhibe las corrientes de estos canales exclusivamente.

Por otro lado algo interesante que no se mencionó en la sección de resultados es que en el V_m de estudio, no se encontraban activos los canales de K activados por ATP de la MP, entonces la corriente observada tampoco correspondería a estos canales. También se determinó el coeficiente de Hill, para observar el número de posibles blancos y dió -2, y una curva bi-exponencial se ajusta mejor que una exponencial a los datos experimentales. Esto apoya la idea de que podrían haber dos canales iónicos responsables de la corriente observada, y pensamos que podrían ser BKCa y KCa3.1. Aunque también se cree sKCa podría estar participando en menor manera de la activación del IFM, considerando su conductancia menor, y que DeCoursey observó que estos canales se encuentran en macrófagos THP-1 (Figura 8).

Todos los resultados obtenidos hasta el momento, llevarían a especular que un mecanismo anti-inflamatorio novedoso de la HCQ podría ser la inhibición del IFM, mediante la inhibición de canales de K^+ sensibles al Ca^{++} , y se cree que entre estos canales podrían estar BKCa y KCa3.1, y en menor medida sKCa. A pesar de que la conductancia de sKCa pareciera tener menor relevancia por ser de menor magnitud, diversos trabajos en patologías neuroinflamatorias han mostrado que estos canales tienen un rol importante en la patogénesis (Dolga et al. 2012). Además en literatura también se encuentran trabajos que han asociado NETosis, con canales sKCa con la generación de mROS en la mitocondria de neutrófilos. Los canales sK3 son los canales de K^+ activados por Ca^{++} más abundantes en neutrófilos y se lo ha asociado con la generación de NETosis independiente de la NETosis inducida independientemente de la enzima NADPH oxidasa presente en estas células (Douda et al. 2015). Recordando el rol de la NETosis mencionado en la introducción, se podría pensar que la inhibición de este canal podría ser otro novedoso mecanismo anti-inflamatorio de la HCQ.

Por otro lado trabajos en macrófagos humanos de PBMC han reportado la presencia de KCa3.1 donde han asociado estos canales con un importante mecanismo de entrada de Ca^{++} a la célula como es SOCE y la entrada de Ca^{++} por canales como CRAC (Gao et al. 2010). Se propone que la entrada de Ca^{++} extracelular a través de CRAC, induciría la activación de KCa3.1 y este canal amplificaría esta entrada, mediante una hiperpolarización del V_m por eflujo de K^+ facilitando así una entrada sostenida de Ca^{++} extracelular. Considerando la importancia que se ha adjudicado a este gran ingreso de Ca^{++} desde el medio extracelular para la activación del inflammasoma NLRP3 esto apoya a que KCa3.1 pudiera tener un rol fundamental en la activación de NLRP3. Pero por otro lado trabajos van en un sentido opuesto donde mencionan que la activación de NLRP3 por entrada de Ca^{++} al citosol se daría por mecanismos diferentes al controlado por SOCE en BMDC y BMDM (Vaeth et al. 2015). Este trabajo argumenta que ante un silenciamiento de los genes asociados a CRAC (STIM) en BMDM se observa activación normal de Caspasa-1 e IL- 1β . Pero este trabajo habla de SOCE como si CRAC fuera el único canal regulado por SOCE siendo que todavía es un tema controversial si SOCE controla CRAC o también otros canales. De todas maneras pareciera ir en el sentido opuesto al propuesto por Gao et al., 2010.

Diferentes tipos celulares se han encontrado canales BKCa en la mitocondria, y se ha relacionado mitoBKCa con la producción de ROS y a la regulación del contenido de Ca^{++} mitocondrial como se menciona en Balderas et al., 2015 y ROS y Ca^{++} mitocondrial se ha asociado con la activación del inflammasoma NLRP3 (Lawlor et al. 2014, Murakami et al. 2012).

Teniendo en consideración todos los resultados obtenidos hasta el momento, toda la bibliografía que se ha mencionado durante este trabajo en relación a la quinina, CQ e HCQ y su capacidad inhibidora de canales de K^+ es que pensamos que un posible mecanismo podría ser que:

La HCQ estuviera inhibiendo canales de K^+ activados por Ca^{++} y de esa manera reduciendo la salida de K^+ , inhibiendo así la activación del inflammasoma NLRP3. Pero a pesar

de los avances alcanzados en este trabajo en referencia a la HCQ, quedan todavía muchas preguntas por responder en relación al Ca^{++} aumentado en presencia de HCQ. Se esperaría que si la HCQ inhibiera la salida de K^+ mediante la inhibición de canales de K^+ sensibles al Ca^{++} , también se estuviera inhibiendo la fuerza impulsora de entrada de Ca^{++} desde el medio extracelular, que ha sido ampliamente asociado a la activación del IFM. Según el modelo del Ca^{++} (Murakami et al. 2012) se esperaría que el Ca^{++} citosólico fuera menor en presencia de HCQ y sin embargo fué mayor. Por otro lado trabajos reportados muestran que CQ y Quinina inhiben la liberación de Ca^{++} del RE por inhibición de la unión de IP_3 a su receptor en este organelo, y se esperaría entonces que hubiera una menor salida de Ca^{++} desde el RE luego de estimularlo con ATP y por lo tanto, nuevamente podríamos esperar que el Ca^{++} citosólico fuera menor en presencia de HCQ por inhibición de liberación de Ca^{++} desde el RE (Misra UK et al. 1997). Además en el caso hipotético que la HCQ inhibiera la salida de Ca^{++} por RE, se esperaría también que se inhibiera la entrada de Ca^{++} por CRAC, ya que estos se encuentran asociados, esperando nuevamente que el Ca^{++} citosólico fuera menor en presencia de HCQ. En este trabajo se esperaba que el aumento de K^+ citosólico en presencia de HCQ (Figura 24), disminuyera la hiperpolarización de V_m y por tanto la fuerza impulsora para la entrada de Ca^{++} , todo lo cual llevaría a una disminución del Ca^{++} citosólico, en presencia de HCQ. Por lo que no encontramos una hipótesis que explique el Ca^{++} aumentado en el citosol. Una forma posible de explicar el Ca^{++} citosólico aumentado en presencia de HCQ podría ser que la HCQ pudiera estar inhibiendo la recaptación de Ca^{++} en organelos intracelulares como RE a través de inhibición del mecanismo de regulación de entrada de Ca^{++} al RE (SERCA). En la bibliografía consultada no se encontraron datos que apoyen que la HCQ, CQ, quinina inhiban la Ca^{++} ATPasa (SERCA), PfATPasa 6 por el contrario si hay un trabajo, muestra que quinina y CQ no inhiben PfATPasa 6 (Eckstein-Ludwig et al. 2003).

Una posible hipótesis podría ser quizás la HCQ podría actuar como un “agente quelante” inhibiendo su recaptación por la mitocondria y así disminuyendo la activación del

inflammasoma. Entre dos moléculas de HCQ, quizás se podría formar un compuesto de coordinación con el metal Ca^{++} , considerando que la HCQ tiene 3 grupos de N y un O dadores de ligando en su molécula para la posible formación de un compuesto de coordinación, aunque el O quizás se encuentra protonado en la condición de estimulación de IFM y que en presencia de Fura-2 el Ca^{++} fuera liberado por competencia en donde Fura-2 tuviera mayor afinidad por este ion. Mientras que en la condición L/A en ausencia de HCQ el Ca^{++} fuera captado por la mitocondria provocando daño mitocondrial y activación de NLRP3 considerando el modelo propuesto de activación del IFM por Murakami et al., 2012. Se consultó a químicos inorgánicos en referencia a este tema, pero se encontraron opiniones diferentes. Por otro lado, si la HCQ fuera un “quelante débil” de Ca^{++} , esto inhibiría su acción a nivel de canales de K^+ sensibles al Ca^{++} , inhibiendo la activación de estos, salida de K^+ de esta manera disminuiría la entrada de Ca^{++} , a menos que estos canales se mantuvieran activos porque el Ca^{++} presente fuera suficiente para mantenerlos activos, y en este caso no se descartaría la posibilidad de que la HCQ pudiera ser un agente “quelante de Ca^{++} ”. Considerando las opiniones recibidas y los resultados obtenidos, pareciera poco probable que la HCQ fuera un agente quelante, pero no se descarta esta opción a pesar de que no se encuentra en bibliografía datos que apoyen que la HCQ tenga propiedades quelantes.

Algo que se podría pensar es que el aumento de Ca^{++} en presencia de HCQ podría aumentar la muerte celular y por esto inhibir la secreción de $\text{IL-1}\beta$, pero en este caso se podría pensar en que se estuviera dando un tipo de muerte, de tipo piroptosis, donde se esperaría que la producción de $\text{IL-1}\beta$ aumentara cuando este tipo de muerte celular es activado en lugar de disminuir. También se podría pensar que la HCQ fuera tóxico para las células pero durante experimentos en citometría de flujo se pudo evaluar una posible toxicidad por muerte celular, con marcadores de viabilidad celular, y no se observó diferencia significativa entre células tratados con HCQ y no tratados (no se muestran estos resultados en este trabajo de maestría).

Por lo que pareciera que los resultados generados en este trabajo, podrían estar

aportando a la controversia sobre el rol del K^+ y el Ca^{++} en la activación del IFM. Mientras que algunos autores plantean que la salida de K^+ es único ion importante para la activación de NLRP3 ante estímulos muy variados (Katsnelson et al. 2015; Munoz y Planillo et al. 2013), otros autores plantean que el Ca^{++} tiene un rol fundamental en esta activación (Murakami et al. 2012, Yaron et al. 2015, Gudipaty et al. 2003).

En resumen:

Los resultados obtenidos *in vitro* muestran que la HCQ inhibe la activación del IFM cuando se indujo la salida de K^+ mediante ATP, pero no con Nigericina, o bajo contenido de K^+ . Además la HCQ inhibe la salida de K^+ inducida por ATP pero no por Nigericina y la HCQ no inhibe el aumento de Ca^{++} citosólico. Entonces creemos que la HCQ podría estar inhibiendo la activación del inflamasoma a través del bloqueo de canales de K^+ activados por Ca^{++} . Los canales propuestos son BKCa, KCa3.1 y sKCa. Quedan todavía muchas preguntas sin responder en referencia al rol del Ca^{++} en el mecanismo propuesto, se piensa que la HCQ podría inhibir la activación de estos canales por inhibición de la acción del Ca^{++} , pero es necesario una mayor caracterización de este mecanismo para poder afirmarlo. El trabajo de Yaron et al. 2015, muestra que es necesaria una salida de K^+ para la entrada sostenida de Ca^{++} desde el medio extracelular, necesario para la activación del IFM. Pero también observo que no es necesaria la salida de K^+ para el aumento de Ca^{++} transitorio que es liberado desde el RE (Yaron et al. 2015). Por lo que la co-existencia de niveles elevados de K^+ y Ca^{++} podría deberse a una liberación transitoria del ion Ca^{++} desde el RE, como sucedió en nuestro caso.

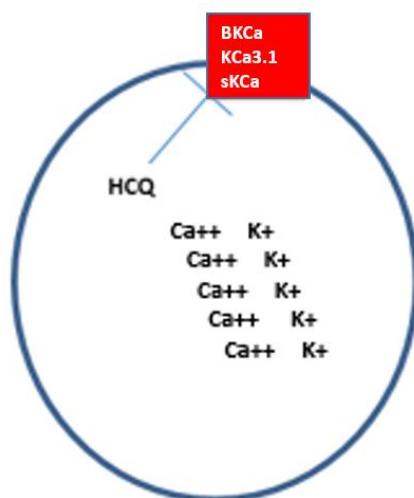


Figura 36. La HCQ inhibe la activación del IFM en APCs, mediante la inhibición de canales de K^+ activados por Ca^{++} y se cree que estos canales podrían ser BKCa, KCa3.1 y sKCa.

Conclusiones y perspectivas

Con los resultados obtenidos hasta el momento se puede afirmar que la HCQ se encuentra inhibiendo la activación del inflammasoma, siendo esto un novedoso mecanismo para la HCQ. Se cree que esta inhibición del IFM podría darse por una inhibición de la salida de K^+ a través de la inhibición de canales de K^+ sensibles al Ca^{++} , pero para poder confirmar nuestra hipótesis, el siguiente paso podría ser el silenciamiento de los genes correspondientes a los canales propuestos en los macrófagos THP-1 y observar si se observa un efecto similar al de la HCQ. Se esperaría que las células knock-down para estos canales tuvieran un efecto inhibitorio similar al observado con la HCQ. En este caso, se podría hipotetizar que SNPs en genes codificantes de componentes del IFM y de canales de K^+ activados por Ca^{++} pudieran determinar parte de las respuestas clínicas a la HCQ.

Creemos además, que la HCQ podría ser una droga de utilidad en otros escenarios donde el IFM y estos canales iónicos juegan un rol patogénico. Considerando que la IL-1 β pareciera tener un rol fundamental debido a su capacidad de modular no solo la respuesta inmune innata en enfermedades como el Alzheimer y la activación del NLRP3 en presencia de β -amilode, y la citoquina IL-1 β que pareciera tener un rol fundamental en la patogenia de la enfermedad, encontrándose IL-1 β en cerebros de pacientes y alrededor de microglia en placas amiloides Halle et al., 2008. También podría tener gran relevancia por la posible acción de la IL-1 β en la respuesta inmune adaptativa en el eje Treg/Th17. Se ha visto que el microambiente de citoquinas contribuye a la polarización hacia respuestas pro-inflamatorias o tolerogénicas y las células Treg que normalmente promueven un micro-ambiente tolerógeno, en presencia de IL-1 β pueden reprogramarse a células efectoras (Mellor et al. 2011).

Los canales propuestos en este trabajo como posibles blancos de la HCQ ya han sido asociados a patologías inflamatorias crónicas como es Artritis reumatoidea en BKCa (Tanner et

al.2015) y KCa3.1 (Raychaudhuri et al. 2016, Friebel et al. 2015).

Diferentes trabajos han estudiado el rol de sKCa en enfermedades neuroinflamatorias, donde se ha visto que la modulación de la homeostasis del Ca^{++} en sKCa podría inhibir respuestas inflamatorias en microglia (Dolga et al. 2012). Además en literatura también se encuentran trabajos que han asociado la NETosis, con los canales sKCa en mitocondria de neutrófilos y generación de mROS. Este trabajo propone que la activación de sKCa sería suficiente para la inducción de NETosis en neutrófilos. La NETosis ya que esta siendo muy estudiado su rol en LES, donde pareciera que los NETs favorecen la activación de Caspasa-1 como se menciona en (Kahlenerg et al. 2013) por lo que se podría pensar que inhibiendo estos canales, se podría estar inhibiendo mROS, asociado a NLRP3, y además las NETs. En la bibliografía consultada no se han encontrado trabajos que asocien sKCa, NETs y LES, por lo que este podría ser un posible mecanismo novedoso de la HCQ con canales de K^+ sensibles al Ca^{++} . Otros trabajos proponen a KCa3.1 en linfocitos y microglia como un posible blanco para la inmunosupresión como el de Lam et al. 2011, Maezawa et al. 2012.

Entonces nuestros resultados podrían contribuir en la generación de potenciales blancos terapéuticos para la modulación de la respuesta inflamatoria. Esto podría darse mediante la regulación de la activación del IFM, controlando la homeóstasis iónica en células del SII y SIA. En esta línea de razonamiento, los resultados obtenidos en el presente proyecto de maestría nos alentaron a la búsqueda de un proyecto en pacientes. Actualmente nos encontramos llevando a cabo un proyecto con el objetivo de la generación y validación de una estrategia predictiva de la respuesta al tratamiento con HCQ, en referencia al IFM. Esperamos cumplir este objetivo mediante el estudio de parámetros genéticos SNPs asociados al inflammasoma e IL-1 β , relacionados al IFM como son la IL-1 β , junto con la historia clínica de los pacientes. Para esto se buscó cuantificar la citoquina IL- 1 β en suero de pacientes con LES, estables y tratados por diferentes tiempos y dosis de HCQ.

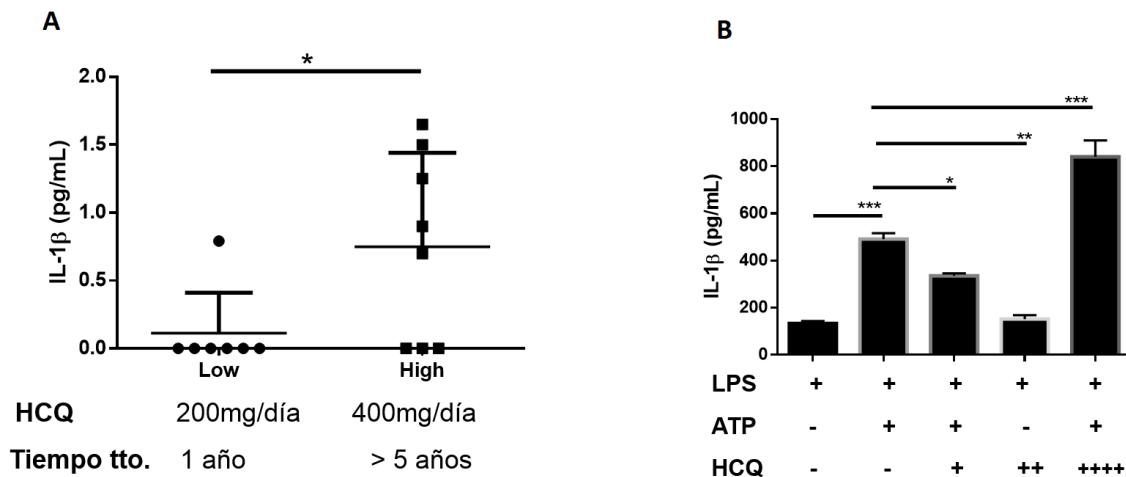


Figura 37. Elevadas dosis de HCQ podría estar inhibiendo la autofagia. (A) Suero de pacientes con LES, estables y tratados con HCQ 200 mg/día a un año de iniciado el tratamiento y 400 mg/día a los 5 años de comenzado el tratamiento con HCQ (B) BMDCs estimuladas con LPS 0,5 μ g/mL (4 hs), lavadas y luego ATP 0,5 mM \pm HCQ 3, 10, 100 μ M (45 min), y se recolectó el sobrenadante de cultivo. Se cuantificó IL-1 β por ELISA en suero de pacientes y en sobrenadante de cultivo *= p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001

Los resultados obtenidos en la Figura 37, muestran que la HCQ a dosis acumulativas (debido a un tratamiento prolongado) o a elevadas dosis de HCQ (100 μ M) *in vitro*, como se observa en la figura (B), podría estar inhibiendo un mecanismo fisiológico anti-inflamatorio regulador del IFM como es la autofagia (Harris et al. 2011). Se conoce que la CQ disminuye el mecanismo fisiológico de autofagia por aumento de pH lisosomal (Nakahira et al. 2011, Redmann et al. 2016, Gewirtz et al. 2016). Por lo que estos resultados aportarían a la generación de datos en búsqueda de biomarcadores para el seguimiento y tratamiento de LES. Actualmente las dosis utilizadas de HCQ para el tratamiento de LES son 200 o 400 mg por día. Al día de hoy, no se dispone de biomarcadores para identificar qué pacientes requieren una ú otra dosis, el clínico decide de acuerdo a la evolución de la enfermedad y respuesta al tratamiento. En el momento del diagnóstico se comienza con una dosis de 200 mg por día y luego se puede aumentar la dosis. Por lo tanto, creemos que la generación de nuevos conocimientos asociados al IFM e HCQ, podría contribuir entre otras cosas, a la generación de biomarcadores predictivos y de respuesta al tratamiento, facilitando así a la toma de decisiones de los clínicos en la enfermedad de LES.

Referencias

- Alonso-Torre, S. R., Trautmann, A. (1993). Calcium Responses Elicited by Nucleotides in Macrophages. *J Biol Chem* 268(25):18640-7.
- Alunno, A., Bartoloni, E., Bistoni, O., Nocentini, G., Ronchetti, S., Caterbi, S., Valentini, V., Riccardi, C., Gerli, R. (2012). Balance between Regulatory T and Th17 Cells in Systemic Lupus Erythematosus: The Old and the New. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 5.
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D., Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual Review of Immunology*, 30, 459–89.
- Andrei, C., Margiocco, P., Poggi, A., Lotti, L. V., Torrasi, M. R., & Rubartelli, A. (2004). Phospholipases C and A 2 control lysosome-mediated IL-1 β secretion: Implications for inflammatory processes. *Proc. Natl Acad Sci USA*. 2004 Jun; 101(26):9745-50.
- Apostolidis, S., Crispín, J., & Tsokos, G. (2011). IL-17-producing T cells in lupus nephritis. *Lupus*. 20, 120-124.
- Baeten, D. (2009) Memorandum of understanding for the implementation of a European Concerted Research Action designates as COST Action BM0907: European Network for Translational Immunology Research and Education (ENTIRE): From Immunomonitoring to personalized immunotherapy
- Banchereau, J., Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 392, 245-252.1
- Billeter, AT., Hellmann, JL., Bhatnagar, A., Polk HC (2014). Transient receptor potential ion channels: powerful regulators of cell function. *Ann. Surg.* 259:229-235.
- Bilyy, RO., Shkandina T, Tomin A, Muñoz LE, Franz S, Antonyuk V, Kit YY, Zirngibl M, Fürnrohr BG, Janko C, Lauber K, Schiller M, Schett G, Stoika RS, Herrmann M (2012). Macrophages discriminate glycosylation patterns of apoptotic cell-derived microparticles. *J Biol Chem*. 287(1):496–503.
- Blanco, P., Palucka, A.K., Pascual. V., Banchereau, J. (2009). Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *NIH Public Access*, 19(1), 41–52.
- Block, J.A. Hydroxychloroquine and retinal safety. *Lancet*. 351, 771 (1998)
- Bokvist, B. Y. K., Rorsman, P., Smitht, P. A. (1990). BLOCK OF ATP AND Ca²⁺ -ACTIVATED K⁺ CHANNELS IN MOUSE PANCREATIC β - CELLS BY EXTERNAL TETRAETHYLAMMONIUM AND QUININE. *Journal of Physiology*. 423, 327–342.
- Bonelli, M., Savitskaya, A., von Dalwigk, K., Steiner, C.W., Aletaha, D., Smolen, J.S., and Scheinecker, C. (2008). Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *International Immunology*. 20, 861-868.
- Bouts, Y.M., Wolthuis, D.F.G.J., Dirks, M.F.M., Pieterse, E., Simons, E.M.F., Van Boekel, A.M., Dieker, J.W., Van Der Vlag, J. (2012). Apoptosis and NET formation in the pathogenesis of SLE. *Autoimmunity*. 45, 597-601.

- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*. 303, 1532-1535.
- Brugnara, C., Gee, B., Armsby, C. C., Kurth, S., Sakamoto, M., Rifai, N., Platt, O. S. Therapy with Oral Clotrimazole Induces Inhibition of the Gardos Channel and Reduction of Erythrocyte Dehydration in Patients with Sickle Cell Disease. (1996). *Journal of Clin. Invest.* (22)Vol. 97, 5.
- Buckner, J.H. (2010). Mechanisms of impaired regulation by CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol.* 10, 849-859.
- Burgess, B. Y. G. M., Claret, M., & Jenkinson, D. H. (1981). EFFECTS OF QUININE AND APAMIN ON THE CALCIUM-DEPENDENT POTASSIUM PERMEABILITY OF MAMMALIAN HEPATOCYTES AND RED CELLS. *J. Physiol.* 67–90.
- Cairolì, E., Rebella, M., Danese, N., Garra, V., Borba, E. F. (2012). Hydroxychloroquine reduces low-density lipoprotein cholesterol levels in systemic lupus erythematosus: a longitudinal evaluation of the lipid-lowering effect. *Lupus*, 21(11), 1178–82.
- Campbell, D.J., Koch, M.A. (2011). Phenotypic and functional specialization of FOXP3 (+) regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology*. 11, 119-130.
- Capel, R. a, Herring, N., Kalla, M., Yavari, A., Mirams, G. R., Douglas, G., Burton, R.A. B. (2015). Hydroxychloroquine reduces heart rate by modulating the hyperpolarization-activated current If: Novel electrophysiological insights and therapeutic potential. *Heart Rhythm*, 12(10), 2186–94.
- Carafoli, E. (2002). Calcium signaling : A tale for all seasons. *PNAS*. Feb 5, 99(3), 1115-1122.
- Chaudry IH, Wichterman KA, Baue AE. (1979). Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. *Surgery*. 85:205-211.
- Chitrabamrung, S., Rubin, R.L., Tan, E.M. (1981). Serum deoxyribonuclease I and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology International*. 1, 55-60.
- Compan, V., Baroja-Mazo, A., Lopez-Castejon, G., Gomez, A. I., Martinez, C. M., Angosto, D., Pelegrin, P. (2012). Cell Volume Regulation Modulates NLRP3 Inflammasome Activation. *Immunity*, 37(3), 487–500.
- Cook, N.S., Haylett, D.G., (1985). Effects of apamin, quinine and neuromuscular blockers on calcium-activated potassium channels in guinea-pig hepatocytes. *J. Physiol.* 358, 373–394.
- Cooper, G.S., Miller, F.W., Pandey, J.P. (1999). The role of genetic factors in autoimmune disease: implications for environmental research. *Environmental Health Perspectives*. 107, 693-700.
- Costedoat-Chalumeau., N., Leroux, G., Piette, J.-C., & Amoura, Z. (2010). Why all systemic lupus erythematosus patients should be given hydroxychloroquine treatment? *Joint, Bone, Spine : Revue Du Rhumatisme*. 77(1), 4–5.
- Coutinho-Silva, R., Ojcius, D. M., Górecki, D. C., Persechini, P. M., Bisaggio, R. C., Mendes, A. N., Dunn, P. M. (2005). Multiple P2X and P2Y receptor subtypes in mouse J774, spleen and peritoneal macrophages. *Biochemical Pharmacology*, 69(4), 641–55.

- Cruz, C. M., Rinna, A., Forman, H. J., Ventura, A. L. M., Pedro, M., Ojcius, D. M. (2009). ATP activates a Reactive Oxygen Species-dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory cytokines in Macrophages. *J Biol Chem.* 2007 2; 282(5): 2871-2879.
- Darrah, E., & Andrade, F. (2012). NETs: the missing link between cell death and systemic autoimmune diseases? *Frontiers in Immunology*, Vol. 3(January), 428.
- D'Cruz, D.P., Khamashta, M.A., and Hughes, G.R.V. (2007) Systemic lupus erythematosus. *The Lancet.* 369, 587-596.
- De Bouteiller, O., Merck, E., Hasan, U. a, Hubac, S., Benguigui, B., Trinchieri, G., Caux, C. (2005). Recognition of double-stranded RNA by human toll-like receptor 3 and downstream receptor signaling requires multimerization and an acidic pH. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(46), 38133–45.
- Decoursey, T. E., Kim, S. Y., Silver, M. R., & Quandt, F. N. (1996). Ion Channel Expression in PMA-differentiated Human THP-1 Macrophages. *JMembrane Biology.* 157, 141–157.
- Dema et al. (2014). Advances in Mechanisms of Systemic Lupus Erythematosus.
- Desai, B. N., Leitinger, N. (2014). Purinergic and calcium signaling in macrophage function and plasticity. *Frontiers in Immunology.* 5(November), 580.
- Di A, Gao XP, Qian F, Kawamura T, Han J. (2011). The redox-sensitive cation channel TRPM2 modulates phagocyte ROS production and inflammation. *Nat Immunol.* 13:29-34.
- Dolga, A. M., & Culmsee, C. (2012). Protective Roles for Potassium SK/K (Ca) 2 Channels in Microglia and Neurons. *Frontiers in Pharmacology.* 3(November), 196.
- Douda, D. N., Khan, M. a, Grasemann, H., & Palaniyar, N. (2015). SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(9), 2817–22.
- Duewell, P., Kono, H., Rayner, K. J., Sirois, C. M., Bauernfeind, F. G., Abela, G. S., Rock, K. L. (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals that form early in disease. *Nature.* Apr, 464(7293), 1357–1361.
- Ebong et al. (1999). Immunopathologic responses to non-lethal sepsis. *Shock* Vol.12 No.2, pp 118-126
- Eder C, Klee R, Heinemann U. (1997) Pharmacological properties of Ca²⁺-activated K⁺ currents of ramified murine brain macrophages. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* ; 356:233–239.
- Edwards, C.J. (2005). Environmental factors and lupus: are we looking too late? *Lupus.* 14, 423-425.
- Eggleton, P., Editors, F. J. W., Walker, J. M. (n.d.). *Systemic Lupus Erythematosus Series Editor.*
- Eyles, J. L., Roberts, A. W., Metcalf, D., & Wicks, I. P. (2006). Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils--forgotten mediators of inflammatory disease. *Nature Clinical Practice. Rheumatology*, 2(9), 500–10.

Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. (2001) Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem.*; 276 (2):1071–1077.

Fanger CM, Rauer H, Neben AL, Miller MJ, Rauer H, Wulff H, Rosa JC, Ganellin CR, Chandy KG and Cahalan MD (2001). Calcium- activated potassium channels sustain calcium signaling in T lymphocytes. Selective blockers and manipulated channel expression levels. *J.Biol. Chem.* 276:12249-56

Feske, S., Wulff, H., & Skolnik, E. Y. (2015). Ion channels in innate and adaptive immunity. *Annual review of immunology* (Vol. 33, pp. 291–353).

Fox, R. I., Kang, H.-I. (1993). Mechanism of Action of Antimalarial Drugs: Inhibition of Antigen Processing and Presentation. *Lupus*. 2(1 suppl), S9–S12.

Fox, R. et al. (1996) Anti-malarial drugs: possible mechanisms of action in autoimmune disease and prospects for drug development. *Lupus* 5, Suppl.1, S4-S10.

Fox, R.I. (1993 b) Mechanism of action of hydroxychloroquine as an antirheumatic drug. *Semin. Arthritis Rheum.* 23, 82-91

Franceschini, A., Capece, M., Chiozzi, P., Falzoni, S., Sanz, J. M., Sarti, A. C., Di Virgilio, F. (2015). The P2X7 receptor directly interacts with the NLRP3 inflammasome scaffold protein. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(6), 2450–61.

Franchini, L., Levi, G., & Visentin, S. (2004). Inwardly rectifying K⁺ channels influence Ca²⁺ entry due to nucleotide receptor activation in microglia. *Cell Calcium*, 35(5), 449 –59.

Friebel, K., Schönherr, R., Kinne, R. W., & Kunisch, E. (2015). Functional role of the KCa3.1 potassium channel in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients. *Journal of Cellular Physiology*, 230(7), 1677–88.

Fubini, B., & Hubbard, A. (2003). Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 34(12), 1507–1516.

Gabrilovich D, Nagaraj S. (2009) Myeloid-derived-suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. March; 9 (3): 162-174

Gaipl, U. S., Beyer, T. D., Heyder, P., Kuenkele, S., Böttcher, A., Voll, R. E., Herrmann, M. (2004). Cooperation between C1q and DNase I in the clearance of necrotic cell-derived chromatin. *Arthritis and Rheumatism*. 50(2), 640–9.

Gaipl, U.S., Beyer, T.D., Baumann, I., Voll, R.E., Stach, C.M., Heyder, P., Kalden, J.R., Manfredi, A., and Herrmann, M. (2003). Exposure of anionic phospholipids serves as anti-inflammatory and immunosuppressive signal – implications for antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *Immunobiology*. 207, 73-81.

Gallin, E. K. (1984). Calcium and Voltage- activated potassium channels in human macrophages. *Biophys. J.*, 46: 821–825.

- Gallin, E. K., Mckinney, L. C. (1988). Patch Clamp Studies in Human macrophages: Single Channel and Whole Cell Characterization of Two K⁺ Conductances. *The Journal of Membrane Biology*.103, 55–66.
- Gallin, E.K., Ion Channels in Leukocytes (1991).*Physiol. Rev.* 71: 775-811.
- Gao, Y., Hanley, P. J., Rinné, S., Zuzarte, M., & Daut, J. (2010). Calcium-activated K⁺ channel (KCa3.1) activity during Ca²⁺ store depletion and store-operated Ca²⁺ entry in human macrophages. *Cell Calcium*. 48(1), 19–27.
- Garcia-romo, G. S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., Pascual, V. (2011). Netting Neutrophils Are Major Inducers of Type I IFN Production in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus, *Sci. Transl. Med.* Mar 9;3 (73):73ra20. 3(73).
- Gewirtz, D. a. (2016). The Challenge of Developing Autophagy Inhibition as a Therapeutic Strategy. *Cancer Research*, 76(19), 5610–5614.
- Gorman, C.L., Russell, A.I., Zhang, Z., Cunninghame Graham, D., Cope, A.P., and Vyse, T.J. (2008). Polymorphisms in the CD3Z Gene Influence TCR ζ Expression in Systemic Lupus Erythematosus Patients and Healthy Controls. *The Journal of Immunology*. 180, 1060-1070.
- Grygorczyk, R; Schwarz, W; PROPERTIES OF THE CA²⁺-ACTIVATED K⁺ CONDUCTANCE OF HUMAN RED CELLS AS REVEALED BY THE PATCH-CLAMP TECHNIQUE. (1983). *Cell Calcium*, (3), 499–510.
- Gudipaty L, Munetz J, Verhoef PA, Dubyak GR. (2003) Essential role for Ca²⁺ in regulation of IL-1 β secretion by P2X7 nucleotide receptor in monocytes, macrophages, and HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 285:C286-299
- Guerriero, F., Sgarlata, C., Francis, M., Maurizi, N., Faragli, a, Perna, S., Ricevuti, G. (2016). Neuroinflammation, immune system and Alzheimer disease: searching for the missing link. *Aging Clinical and Experimental Research*. Oct 7.
- Guo, H., Callaway, J. B., & Ting, J. P.-Y. (2015). Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature Medicine*. 21(7), 677–687.
- Hacker H, Mischak, H., Miethke, T., Liptay, S., Schmid, R., Sparwasser, T., Heeg, K., Wagner, H. (1998). CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation, *The EMBO Journal*. 17(21), 6230–6240.
- Hagberg, N., Rönnblom, L. (2015). Systemic Lupus Erythematosus--A Disease with A Dysregulated Type I Interferon System. *Scandinavian Journal of Immunology*, 82(3), 199–207.
- Hakkim, A., Fürnrohr, B.G., Amann, K., Laube, B., Abed, U.A., Brinkmann, V., Herrmann, M., Voll, R.E., and Zychlinsky, A. (2010). Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107, 9813-9818.
- Halle, A., Hornung, V., Petzold, G. C., Stewart, C. R., & Monks, B. G. (2011). *NIH Public Access*, 9(8), 857–865.

Halle, A., Hornung, V., Petzold, G.C., Stewart, C.R., Monks, B.G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K.A., Latz, E., Moore, K.J., and Golenbock, D.T. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nat Immunol* 9, 857-865.

Hanley, P. J., Kronlage, M., Kirschning, C., Rey, A., Di Virgilio, F., Leipziger, J., Schwab, A. (2012). Transient P2X7 receptor activation triggers macrophage death independent of Toll-like receptors 2 and 4, caspase-1, and pannexin-1 proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 287(13), 10650–63.

Hanley, P. J., Musset, B., Renigunta, V., Limberg, S. H., Dalpke, A. H., Sus, R., Preisig-mu, R. (2004). Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca²⁺ and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages, *PNAS*. Jun 22; 101(25):9479-84.

Harley, J.B., Moser, K.L., Gaffney, P.M., and Behrens, T.W. (1998). The genetics of human systemic lupus erythematosus. *Current Opinion in Immunology*. 10, 690-696.

Harris, J., Hartman, M., Roche, C., Zeng, S. G., O'Shea, A., Sharp, F. a, Lavelle, E. C. (2011). Autophagy controls IL-1 β secretion by targeting pro-IL-1 β for degradation. *The Journal of Biological Chemistry*. 286(11), 9587–97.

He, W., Wan, H., Hu, L., Chen, P., Wang, X., Huang, Z., Han, J. (2015). Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Research*, 25(12), 1285–98.

Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet. Neurology*. 14(4), 388–405 (15)70016-5

Henson, P.M., and Hume, D.A. (2006). Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends in Immunology* 27, 244-250.

Heppner, F.L., Ransohoff, R.M., and Becher, B. (2015). Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. 16, 358-372.

Herrman, M., Voll, R. E., Zoller, O. M., Hagenhofer, M., Ponner, B. B., Kalden, J. R., & Al, H. E. T. (1998). Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. Jul; 41(7):1241-50. 41(7), 1241–1250.

Hickman-Davis, J. M., O'Reilly, P., Davis, I. C., Peti-Peterdi, J., Davis, G., Young, K. R., Matalon, S. (2002). Killing of *Klebsiella pneumoniae* by human alveolar macrophages. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. 282(5), L944–56.

Hochreiter-hufford, A., Ravichandran, K. S. (2013). Clearing the Dead: Apoptotic Cell Sensing, Recognition, Engulfment, and Digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Jan 1;5 (1):a008748. 1–19.

Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Rock, K. L., Fitzgerald, K. A., & Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts mediate NALP-3 inflammasome activation via phagosomal destabilization. *NIH Public Access*. 9(8), 847–856.

Hsing, L. C., & Rudensky, A. Y. (2005). The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation, *Immunological Reviews*, 207, 229–241.

- Iba, T., Hashiguchi, N., Nagaoka, I., Tabe, Y., and Murai, M. (2013). Neutrophil cell death in response to infection and its relation to coagulation. *Journal of Intensive Care*. 1, 13.
- Ince, C., Duijn, B. Van, Ypey, D. L., Bavel, E. Van, & Weidema, F. (1987). Ionic channels and membrane hiperpolarization in human macrophages. *The Journal of Membrane Biology*. 97, 251–258.
- Inoue, M., Williams, K. L., Oliver, T., Vandenabeele, P., Rajan, J. V., Miao, E. a., & Shinohara, M. L. (2012). Interferon- Therapy Against EAE Is Effective Only When Development of the Disease Depends on the NLRP3 Inflammasome. *Science Signaling*. 5(225), ra38–ra38.
- Ippolito, A., Wallace, D., Gladman, D., Fortin, P., Urowitz, M., Werth, V., Costner, M., Gordon, C., Alarcón, G., Ramsey-Goldman, R., et al. (2011). Autoantibodies in systemic lupus erythematosus: comparison of historical and current assessment of seropositivity. *Lupus*. 20, 250-255.
- Jensen, B. S., Strøbæk, D., Christophersen, P., Jørgensen, T. D., Silaharoglu, A., Olesen, S., Hansen, C. (1998). Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca²⁺ - activated K⁺ channel. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. *Am J. Physiol*. Sep; 275(3 Pt 1):C848-56.
- Kahlenberg, J. M., & Dubyak, G. R. (2004). Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 286(5), C1100 – 8.
- Kahlenberg, J. M., Kaplan, M. J. (2014). The inflammasome and lupus-another innate immune mechanism contributing to disease pathogenesis? *Curr Opin Rheumatol*. Sep; 26(5):475-81.
- Kahlenberg, J. M., Yalavarthi, S., Zhao, W., Hodgins, J. B., Reed, T. J., Tsuji, N. M., & Kaplan, M. J. (2014b). An essential role of caspase 1 in the induction of murine lupus and its associated vascular damage. *Arthritis and Rheumatology*. 66(1), 152–162.
- Kahlenberg, JM., Carmona-Rivera, C., Smith, C K., Kaplan, MJ. (2013).Neutrophil Extracellular Trap-Associated Protein Activation of the NLRP3 Inflammasome IS Enhanced in Lupus Macrophages. *J Immunol*. Feb 1; 190 (3): 1217 1226
- Kakuta, Y., Okayama, H., Aikawa, T. (1988). K channels of human alveolar macrophages. *J Allergy Clin Immunol*. Feb; 81 (2):460-8.
- Kamphuis, S., and Silverman, E.D. (2010). Prevalence and burden of pediatric-onset systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 6, 538-546.
- Kaplan MJ. Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases.(2013).*Arthritis research & therapy*; 15: 219.
- Kaplan, M. J. (2012). Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. *NIH Public Access*, 7(12), 691–699.
- Katsnelson, M. a, Rucker, L. G., Russo, H. M., & Dubyak, G. R. (2015). K⁺ efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca²⁺ signaling. *Journal of Immunology*, 194(8), 3937–52.
- Kepp, O., Galluzzi, L., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2010). Pyroptosis - a cell death modality of its kind? *European Journal of Immunology*, 40(3), 627–30.

- Kepp, O., Galluzzi, L., Zitvogel, L., Kroemer, G. (2010). Pyroptosis - a cell death modality of its kind? *European Journal of Immunology*, 40(3), 627–30.
- Kolaczowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, 13(3), 159–75.
- Kremer, J.M., Westhovens, R., Leon, M., Di Giorgio, E., Alten, R., Steinfeld, S., Russell, A., Dougados, M., Emery, P., Nuamah, I.F., et al. (2003). Treatment of Rheumatoid Arthritis by Selective Inhibition of T-Cell Activation with Fusion Protein CTLA4Ig. *New England Journal of Medicine*. 349, 1907-1915.
- Laliberte, R. E., Egger, J., & Gabel, C. A. (1999). ATP Treatment of Human Monocytes Promotes Caspase-1 Maturation and Externalization. *The Journal of Biological Chemistry*. 274 (52), 36944–36951.
- Lam, J., Wulff, H. (2011). The Lymphocyte Potassium Channels Kv1.3 and KCa3.1 as Targets for Immunosuppression. *Drug Development Research*. 72(7), 573–584.
- Lamkanfi, M., & Dixit, V. M. (2012). Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(May), 137–61.
- Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., Gilliet, M. (2011). Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Science Translational Medicine*, 3(73), 73ra19.
- Latz, E., Xiao, T. S., Stutz, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews. Immunology*, 13(6), 397–411
- Lawlor, K. E., Vince, J. E. (2014). Ambiguities in NLRP3 inflammasome regulation: is there a role for mitochondria? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(4), 1433–40.
- Ledoux, J., Werner, M. E., Brayden, J. E., Nelson, M. T. (2006). Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology*. 21, 69–78.
- Lee, K., Rowe, I. C. M., Ashford, M. L. J. (1995). NS1619 activates BKCa channel activity in rat cortical neurones. *European Journal of Pharmacology*. 280, 215–219.
- Lee, S.J., Silverman, E., Bargman, J. M. (2011). The role of antimalarial agents in the treatment of SLE and lupus nephritis. *Nature Reviews Nephrology*. 7(12), 718–729.
- Link TM, Park U, Vonakis BM, Raben DM, Soloski MJ, Caterina MJ. (2010). TRPV2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis. *Nat. Immunol*. 11:232-39.
- Lu, J., Teh, B.K., Wang, L., Wang, Y., Tan, Y.S., Lai, M.C., and Reid, K.B.M. (2008). The Classical and Regulatory Functions of C1q in Immunity and Autoimmunity. *Cell Mol Immunol*. 5, 9-21.
- Lyssuk, E.Y., Torgashina, A.V., Soloviev, S.K., Nasonov, E.L., and Bykovskaia, S.N. (2007). Reduced Number and Function of CD4+ CD25 high FoxP3 + Regulatory T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. In *Immune-Mediated Diseases: From Theory to Therapy*, M.R. Shurin, and Y.S. Smolkin. *Adv Exp Med Biol*. 2007; 601:113-9.
- Mackenzie, A. B., Chirakkal, H., North, R. A. (2003). Kv1.3 potassium channels in human alveolar macrophages. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. 285(4), L862–8.

- Maezawa, I., Jenkins, D. P., Jin, B. E., & Wulff, H. (2012). Microglial KCa3.1 Channels as a Potential Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*. 868972.
- Magna, M., and Pisetsky, D.S. (2015). The Role of Cell Death in the Pathogenesis of SLE: Is Pyroptosis the Missing Link? *Scandinavian Journal of Immunology*. 82, 218-224.
- Mahajan, A., Herrmann, M., Muñoz, L. E. (2016). Clearance Deficiency and Cell Death Pathways: A Model for the Pathogenesis of SLE. *Frontiers in Immunology*, 7(Feb), 35.
- Malhotra, S., Río, J., Urcelay, E., Nurtdinov, R., Bustamante, M.F., Fernández, O., Oliver, B., Zettl, U., Brassat, D., Killestein, J., et al. (2015). NLRP3 inflammasome is associated with the response to IFN- β in patients with multiple sclerosis. *Brain*. 138, 644-652.
- Malik-Hall, M., Ganellin, C. R., Galanakis, D., Jenkinson, D. H. (2000). Compounds that block both intermediate-conductance (IKCa) and small-conductance (SKCa) calcium-activated potassium channels. *British Journal of Pharmacology*, (129)1431–1438.
- Mancilla E., Rojas E. (1990). Quinine blocks the high conductance, calcium-activated potassium channel in rat pancreatic beta-cells. *FEBS Lett*. 260:105–108.
- Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Dixit, V. M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*. 440(7081), 228– 32
- M. Sollberger, G., Strittmatter, G. E., Garstkiewicz, M., Sand, J., Beer, H.-D. (2014). Caspase-1: the inflammasome and beyond. *Innate Immunity*. 20(2), 115–25.
- Marshak-Rothstein, A. (2006). Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nature Reviews. Immunology*. 6(11), 823–35.
- Mayadas, T.N., Tsokos, G.C., Tsuboi, N., Mechanisms of Immune Complex Mediated Neutrophil Recruitment and Tissue Injury. (2010). *NIH Public Access*, 120(20), 2012–2024.
- Meera P, Wallner M, Song M, Toro L. (1997). Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 94, 14066–14071.
- Mellor, A.L., Munn D.H. (2013). Physiologic control of the functional status of Foxp3+ regulatory T cells. *NIH Public Access*, 186(8).
- Mevorach, D., Mascarenhas, J.O., Gershov, D., and Elkon, K.B. (1998). Complement-dependent Clearance of Apoptotic Cells by Human Macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*. 188, 2313-2320.
- Miao, E. A., Rajan J.V., Aderem, A. (2011). Caspase-1-induced pyroptotic cell death, *Immunol Rev*. 243, 206–214.
- Misra, U. K., Gawdi, G., Pizzo, S. V. (1997). Chloroquine, Quinine and Quinidine Inhibit Calcium Release From Macrophage Intracellular Stores by Blocking Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate Binding to its Receptor. *J Cell Biochem*. Feb; 64(2):225-32. 232, 225–232.
- Mok, M. Y., & Shoenfeld, Y. (2016). Recent advances and current state of immunotherapy in systemic lupus erythematosus. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 16(7), 927–39.

- Mona, B., Christian, M., Jan, M.B., Ricardo, C., Christina, J., Martin, H., and Luis, E.M. (2013). Surface code-biophysical signals for apoptotic cell clearance. *Physical Biology*. 10, 065007.
- Morales, P., Garneau, L., Klein, H., Lavoie, M.-F., Parent, L., Sauvé, R. (2013). Contribution of the KCa3.1 channel-calmodulin interactions to the regulation of the KCa3.1 gating process. *The Journal of General Physiology*, 142(1), 37–60.
- Moran, M.M., McAlexander, MA., Biro, T., Szallasi A. (2011). Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev. Drug Discov*. 10: 601-20.
- Moser, K.L., Kelly, J.A., Lessard, C.J., and Harley, J.B. (2009). Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 10, 373-379.
- Muñoz, L. E., Janko, C., Grossmayer, G. E., Frey, B., Voll, R. E., Kern, P., Gaipl, U. S. (2009). Remnants of secondarily necrotic cells fuel inflammation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*. 60(6), 1733–42.
- Munoz, L.E., Gaipl, U.S., Franz, S., Sheriff, A., Voll, R.E., Kalden, J.R., and Herrmann, M. (2005). SLE-a disease of clearance deficiency? *Rheumatology*. 44, 1101-1107.
- Munoz, L.E., Lauber, K., Schiller, M., Manfredi, A.A., and Herrmann, M. (2010). The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol*. 6, 280-289.
- Munoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martinez-Colon, G., Smith, B., Rajendiran, T., & Nunez, G. (2013). K⁺ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity*. 38(6), 1142–1153.
- Murakami, T., Ockinger, J., Yu, J., Byles, V., McColl, A., Hofer, A. M., Horng, T. (2012). Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *PNAS*. 109(28), 11282–11287.
- Nakahira, K., Haspel, J. A., Rathinam, V. a K., Lee, S.-J., Dolinay, T., Lam, H. C., Choi, A. M. K. (2011). Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nature Immunology*. 12(3), 222–30.
- Nelson, D. J., Jow, B., Popovich, K. J. (1990) Whole-Cell Currents in Macrophages: II. Alveolar Macrophages. *J.Memb Biol*. 117, 45–55.
- Nemeth T, Mocsai A. (2012). The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunology letters*. 143:9-19.
- Ostendorf, B., Iking-Konert, C., Kurz, K., Jung, G., Sander, O., & Schneider, M. (2005). Preliminary results of safety and efficacy of the interleukin 1 receptor antagonist anakinra in patients with severe lupus arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 64(4), 630–633.
- Padhan VD, Badakere ss, Bichile LS, Almeida AF. (2004) Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in systemic lupus erythematosus: Prevalence (Clinical Associations and correlation with other autoantibodies. *J. Assoc. Physicians India*; 52: 533-37.
- Papavlassopoulos, M., Stamme, C., Thon, L., Adam, D., Hillemann, D., Seydel, U., Schromm, a. B. (2006). MaxiK Blockade Selectively Inhibits the Lipopolysaccharide-Induced I B- /NF- B Signaling Pathway in Macrophages. *The Journal of Immunology*, 177(6), 4086–4093.

- Parekh AB and Putney JW (2005). Store operated Ca²⁺ channels. *Physiol. Rev.* 85:757-810.
- Perregaux, D. G., Laliberte, R. E., Gabel, C. A. (1996). Human Monocyte Interleukin-1 β Posttranslational Processing. *The Journal of Biological Chemistry.* 271(47), 29830–29838.
- Perregaux, D., Gabels, A. (1994). Interleukin-1 β Maturation and Release in Response to ATP and Nigericin. *The Journal of Biological Chemistry.* 269, 21: May 27, 15195-15203
- Peter, C., Wesselborg, S., Herrmann, M., and Lauber, K. (2010). Dangerous attraction: phagocyte recruitment and danger signals of apoptotic and necrotic cells. *Apoptosis.* 2010 Sep;15 (9):1007-28.
- Petri, M., Lakatta, C., Magder, L., Goldman, D., (1994) Effect of prednisone and hydroxychloroquine on Coronary Artery Disease Risk Factors in Systemic lupus erythematosus: a longitudinal data analysis. *The American journal of medicine.* 96 (3):254-259.
- Pétrilli, 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 and Differentiation.* 14(9), 1583–9.
- Piccini A, Carta S, Tassi S, Lasiglie D, Fossati G, Rubartelli A (2008) ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 β and IL-18 secretion in an autocrine way. *PNAS.* 105:8067-8072.
- Podolska, M.J., Biermann, M.H.C., Maueröder, C., Hahn, J., and Herrmann, M. (2015). Inflammatory etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus: an update. *Journal of Inflammation Research.* 8, 161-171.
- Ponce-Balbuena, D., Rodríguez-Menchaca, A. a, López-Izquierdo, A., Ferrer, T., Kurata, H. T., Nichols, C. G., Sánchez-Chapula, J. a. (2012). Molecular mechanisms of chloroquine inhibition of heterologously expressed Kir6.2/SUR2A channels. *Molecular Pharmacology,* 82(5), 803–13.
- Pons-Estel, B. a, Catoggio, L. J., Cardiel, M. H., Soriano, E. R., Gentiletti, S., Villa, A. R., Alarcón-Segovia, D. (2004). The GLADEL multinational Latin American prospective inception cohort of 1,214 patients with systemic lupus erythematosus: ethnic and disease heterogeneity among “Hispanics”. *Medicine,* 83(1), 1–17.
- Pontillo, A., Girardelli, M., Kamada, A. J., Pancotto, J. a T., Donadi, E. a, Crovella, S., & Sandrin-Garcia, P. (2012). Polimorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity,* 45(4), 271–8.
- Próchnicki, T., Mangan, M. S., Latz, E. (2016). Recent insights into the molecular mechanisms of the NLRP3 inflammasome activation. *F1000Research,* 5(0), 1–15.
- Putney, J. W. (2010). Store-operated Calcium Channels. *NIH.* 10(4), 209–218.
- Rainsford, K. D., Parke, A. L., Clifford-Rashotte, M., Kean, W. F. (2015). Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. *Inflammopharmacology,* 23(5), 231–69.
- Randriamampita, C; Trautmann, A; (1987). Ionic Channels in Murine Macrophages. *The Journal of Cell Biology.* 105, 761–769.

- Ravichandran, K.S., Lorenz, U. (2007). Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol.* 7, 964-974.
- Raychaudhuri, S. K., Wulff, H., & Raychaudhuri, S. P. (2016). KCa3.1 (-/-) Mice Do Not Develop CIA: Regulatory Role for KCa3.1 in Autoimmune Arthritis. *Journal of Cellular Physiology*, 231(11), 2313–4.
- Redmann, M., Benavides, G. a, Berryhill, T. F., Wani, W. Y., Ouyang, X., Johnson, M. S., Zhang, J. (2016). Inhibition of autophagy with bafilomycin and chloroquine decreases mitochondrial quality and bioenergetic function in primary neurons. *Redox Biology*, 11(November 2016), 73-81.
- Reich, E.-P., Cui, L., Yang, L., Pugliese-Sivo, C., Golovko, A., Petro, M., Chou, C.-C. (2005). Blocking ion channel KCNN4 alleviates the symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *European Journal of Immunology*, 35(4), 1027–36.
- Reichstein, E., Rothstein, A. (1981). Membrane Biology Effects of Quinine on Ca ++ -Induced K + Efflux from Human Red Blood Cells. *The Journal of Membrane Biology.* 59, 57-63
- Rekvig, O.P., Mortensen, E.S. (2012). Immunity and autoimmunity to dsDNA and chromatin – the role of immunogenic DNA-binding proteins and nuclease deficiencies. *Autoimmunity.* 45, 588-592.
- Renehan AG, Bach SP, Potten CS. (2001). The relevance of apoptosis for cellular homeostasis and tumorigenesis in the intestine. *Can J Gastroenterol.* 15 (3):166–176.
- Rhodes, B., and Vyse, T.J. (2008). The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies. *Rheumatology.* 47, 1603-1611.
- Robinson, E. S., & Werth, V. P. (2015). The role of cytokines in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. *Cytokine*, 73(2), 326–34.
- Rodriguez-Menchaca, A. A., Navarro-polanco, R. A., Ferrer-Villada, T., Rupp, J., Sachse, F. B., Sa, A., Tristani-firouzi, M. (2008). PNAS. The molecular basis of chloroquine block of the inward rectifier Kir2. 1 channel, 105, 1364-1368.
- Roumenina, L. T., Sène, D., Radanova, M., Blouin, J., Halbwachs-Mecarelli, L., Dragon-Durey, M.-A., Fremeaux-Bacchi, V. (2011). Functional complement C1q abnormality leads to impaired immune complexes and apoptotic cell clearance. *Journal of Immunology.* 187(8), 4369–73.
- Ruiz-Irastorza, G., Khamashta, M. a. (2008). Hydroxychloroquine: the cornerstone of lupus therapy. *Lupus.* 17(4), 271–3.
- Ruiz-Irastorza, G., Olivares, N., Ruiz-Arruza, I., Martinez-Berriotxo, A., Egurbide, M.-V., Aguirre, C. (2009). Predictors of major infections in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy.* 11(4), R109.
- Ruiz-Irastorza, G., Ramos-Casals, M., Brito-Zeron, P., Khamashta. (2010). Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 69(1), 20–8.
- Ruiz-Irastorza, G., Ugarte, a, Egurbide, M. V, Garmendia, M., Pijoan, J. I., Martinez-Berriotxo, a, Aguirre, C. (2007). Antimalarials may influence the risk of malignancy in systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 66(6), 815–817.

- Rutz M, Metzger J, Gellert T, Lippa P, Lipford GB, Wagner H, Bauer S. (2004) Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *European J Immunol.*; 34: 2541–2550.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M., Hafler, D.A. (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.*10, 490-500.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 133(5), 775–87.
- Saresella, M., La Rosa, F., Piancone, F., Zoppis, M., Marventano, I., Calabrese, E., Clerici, M. (2016). The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer’s disease. *Molecular Neurodegeneration*, 11, 23.
- Sato, T., Saito, T., Saegusa, N., Nakaya, H. (2005). Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation.* 111(2), 198–203.
- Savill, J. (1997). Apoptosis in resolution of inflammation. *Journal of Leukocyte Biology.* 61, 375-380.
- Schauer C, Janko C2, Munoz LE1, Zhao Y3, Kienhöfer D1, Frey B4, Lell M5, Manger B1, Rech J1, Naschberger E6, Holmdahl R7, Krenn V8, Harrer T1, Jeremic I9, Bilyy R10, Schett G1, Hoffmann M1, Herrmann M. (2014). Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat Med.* 20, 511-517.
- Scherbel, A. L., Schuchter, S. L. (1957). Comparison of effects of two antimalarials agents, hydroxychloroquine sulfate and chloroquine phosphate, in patients with rheumatoid arthritis. *Cleve Clin Q.* 1957 Apr; 24(2):98-104.
- Schorn, C., Frey, B., Lauber, K., Janko, C., Strycio, M., Keppeler, H., Herrmann, M. (2011). Sodium overload and water influx activate the NALP3 inflammasome. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(1), 35–41.
- Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell.* 140(6), 821–32.
- Schwab, A., Nechyporuk-Zloy, V., Fabian, A., Stock, C. (2007). Cells move when ions and water flow. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 453(4), 421–32.
- Shao, W., Cohen, P. L. (2011). Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis research and therapy*, 13:202 (1-7).
- Shi, J., Gao, W., & Shao, F. (2016). Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. *Trends in Biochemical Sciences.* 1–10.
- Shin, M. S., Kang, Y., Lee, N., Wahl, E. R., Kim, S. H., Kang, K. S., Lazova, R. (2013). Self Double-Stranded (ds) DNA Induces IL-1 β Production from Human Monocytes by Activating NLRP3 Inflammasome in the Presence of Anti-dsDNA Antibodies. *J Immunol.* Feb 15; 190(4):1407-15
- Shinjo, S. K., Bonfá, E., Wojdyla, D., Borba, E. F., Ramirez, L. a, Scherbarth, H. R., Pons-Estel, B. a. (2010). Antimalarial treatment may have a time-dependent effect on lupus survival: data from a multinational Latin American inception cohort. *Arthritis and Rheumatism.* 62(3), 855–62.

- Sims, J. E., Smith, D. E. (2010). The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature Reviews Immunology*. 10(2), 89–102.
- Smyth, J. T., Hwang, S.-Y., Tomita, T., DeHaven, W. I., Mercer, J. C., Putney, J. W. (2010). Activation and regulation of store-operated calcium entry. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 14(10), 2337–49.
- Sollberger, G., Strittmatter, G. E., Garstkiewicz, M., Sand, J., & Beer, H.-D. (2014). Caspase-1: the inflammasome and beyond. *Innate Immunity*, 20(2), 115–25.
- Sorbara, M. T., Girardin, S. E. (2011). Mitochondrial ROS fuel the inflammasome. *Cell Research*. 21(4), 558 - 60.
- Squatrito, D., Emmi, G., Silvestri, E., Ciucciarelli, L., D’Elios, M. M., Prisco, D., Emmi, L. (2014). Pathogenesis and potential therapeutic targets in systemic lupus erythematosus: from bench to bedside. *Auto-Immunity Highlights*. 5(2), 33–45.
- Srivastava S, Choudury P, Li Z, Liu G, Nadkarni V, Ko K, Coetzee WA, Skolnik EY (2006). Phosphatidylinositol 3-Phosphate indirectly activates KCa3.1 via 14 amino acids in the carboxy terminus of KCa3.1. *Mol. Biol. Cell*. 17:146-54
- Stefani, D. De, Patron, M., Rizzuto, R. (2016). *HHS Public Access*. 1853(9), 2006–2011.
- Su, D.-L., Lu, Z.-M., Shen, M.-N., Li, X., and Sun, L.Y. (2012). Roles of Pro-and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of SLE. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 347141. *J Biomed Biotechnol*.
- Szabo, I., Zoratti, M. (2014). Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiological Reviews*. 94(2), 519–608.
- Tan, M.S., Yu, J.T., Jiang, T., Zhu, X.-C., Tan, L. (2013). The NLRP3 inflammasome in Alzheimer’s disease. *Molecular Neurobiology*, 48(3), 875–82.
- Tan, W., Sunahori, K., Zhao, J., Deng, Y., Kaufman, K.M., Kelly, J.A., Langefeld, C.D., Williams, A.H., Comeau, M.E., Ziegler, J.T., et al. (2011). Association of PPP2CA polymorphisms with systemic lupus erythematosus susceptibility in multiple ethnic groups. *Arthritis & Rheumatism* 63, 2755-2763.
- Tanner, Hu, Huq, Tajhya, Sun, Khan, Laragione, Horrigan, Gulko, Beeton (2015). KCa1.1 inhibition attenuates fibroblast-like synoviocyte invasiveness and ameliorates rat models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Jan; 67(1):96-106.
- Tarr, T., Dérfalvi, B., Győri, N., Szántó, A., Siminszky, Z., Malik, A., Szabó, A.J., Szegedi, G., Zeher, M. (2015). Similarities and differences between pediatric and adult patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 24, 796-803.
- Tektonidou, M. G., Laskari, K., Panagiotakos, D. B., Moutsopoulos, H. M. (2009). Risk factors for thrombosis and primary thrombosis prevention in patients with systemic lupus erythematosus with or without antiphospholipid antibodies. *Arthritis and Rheumatism*. 61(1), 29-36.
- Tett, S. E., Mclachlan, A. J., Cutler, D. J., Day, R. (2010). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Hydroxychloroquine Enantiomers in Patients with Rheumatoid Arthritis Receiving Multiple Doses of Racemate. *Chirality*. 1994; 6(4):355-9.

Tiscornia, I., Sánchez-Martins, V., Hernández, A., Bollati-Fogolín, M. (2012). Human monocyte-derived dendritic cells from leukoreduction system chambers after plateletpheresis are functional in an in vitro co-culture assay with intestinal epithelial cells. *Journal of Immunological Methods*. 384(1-2), 164–70.

Tseng-crank, J., Godinot, N., Johansent, T. E., Ahringt, P. K., Strb, D., Mertz, R., T, P. H. R. (1996). Cloning, expression and distribution of Ca²⁺-activated K⁺ channel β -subunit from human brain. *PNAS*. 93, 9200–9205.

Tsokos, G.C. (2011). Systemic Lupus Erythematosus. *New England Journal of Medicine* 365, 2110-2121.

Tsokos, G.C., and Kammer, G.M. (2000). Molecular aberrations in human systemic lupus erythematosus. *Molecular Medicine Today*. 6, 418-424.

Urbonaviciute V, Fürnrohr BG, Meister S, Munoz L, Heyder P, De Marchis F, Bianchi ME, Kirschning C, Wagner H, Manfredi AA, Kalden JR, Schett G, Rovere-Querini P, Herrmann M, Voll RE. (2008). Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1–nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *The Journal of Experimental Medicine* 205, 3007-3018.

Urbonaviciute, V., Voll, R. E. (2011). High-mobility group box 1 represents a potential marker of disease activity and novel therapeutic target in systemic lupus erythematosus. *Journal of Internal Medicine*. 270(4), 309–18.

Vaeth, M., Zee, I., Concepcion, A. R., Maus, M., Shaw, P., Portal-Celhay, C., Feske, S. (2015). Ca²⁺ Signaling but Not Store-Operated Ca²⁺ Entry Is Required for the Function of Macrophages and Dendritic Cells. *Journal of Immunology*. 195(3), 1202–17.

Vallin, H., Blomberg, S., Alm, G. V, Cederblad, B., Ro, L. (1999). Patients with systemic lupus erythematosus (SLE) have a circulating inducer of interferon-alpha (IFN- α) production acting on leucocytes resembling immature dendritic cells. *Clin Exp Immunol*. Jan; 115(1):196-202

Vanaja, S., Rathinam, V. K., & Fitzgerald, K. A. (2016). Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *HHS Public Access*. 25(5), 308–315.

Venegas, C., & Heneka, M. T. (2017). Danger-associated molecular patterns in Alzheimer's disease. *Journal of Leukocyte Biology*, 101(1), 87–98.

Vermes I, Haanen C, Richel DJ, Schaafsma MR, Kalsbeek-Batenburg E, Reutelingsperger CP. (1997). Apoptosis and secondary necrosis of lymphocytes in culture. *Acta Haematol*; 98(1):8–13.

Vincenti F1, Larsen C, Durrbach A, Wekerle T, Nashan B, Blancho G, Lang P, Grinyo J, Halloran PF, Solez K, Hagerty D, Levy E, Zhou W, Natarajan K, Charpentier B. (2005). Costimulation Blockade with Belatacept in Renal Transplantation. *New England Journal of Medicine*. 353, 770-781.

Voll, R.E., Herrmann, M., Roth, E.A., Stach, C., Kalden, J.R., Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*. 390, 350-351.

W. H. Abdulahad, A. M. H. Boots, C. G. M. Kallenberg, (2011). Foxp3⁺ CD4⁺ T cells in systemic autoimmune diseases: the delicate balance between true regulatory T cells and effector Th-17 cells. *Rheumatology*. vol. 50, no. 4, Article ID keq328, 646–656.

- Wallace, D. J., Gudsoorkar, V. S., Weisman, M. H., & Venuturupalli, S. R. (2012). New insights into mechanisms of therapeutic effects of antimalarial agents in SLE. *Nature Reviews. Rheumatology*. 8(9), 522–33.
- Webb R, Kelly JA, Somers EC, Hughes T, Kaufman KM, Sanchez E, Nath SK, Bruner G, Alarcón-Riquelme ME, Gilkeson GS, Kamen DL, Richardson BC, Harley JB, Sawalha AH. (2011). Early disease onset is predicted by a higher genetic risk for lupus and is associated with a more severe phenotype in lupus patients. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 70, 151-156.
- Wei A, Solaro C, Lingle C, Salkoff L. (1994). Calcium sensitivity of BK-type KCa channels determined by a separable domain. *Neuron*.13: 671-81.
- Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, Wulff H. (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated channels. *Pharmacol Rev*. 57: 463–472.
- Wen, H., Miao, E. A., Ting, J. P. Y. (2013). Mechanisms of NOD-like receptor-associated inflammasome activation. *Immunity*. 39(3), 432–441.
- Wu, J. Y., Manley, J. L., Dev, G., Hirschberg, B., Bond, C. T., Kinzie, J. M., Adelman, J. P. (1990). Potassium Channels from Mammalian Brain KV4.
- Wu, X., Molinaro, C., Johnson, N., Casiano, C. A. (2001). Secondary Necrosis Is a Source of Proteolytically Modified Forms of Specific Intracellular Autoantigens Implications for Systemic Autoimmunity, 44(11), 2642–2652.
- Xia, X.M., Fakiert, B., Rivard, A., Wayman, G., Keen, J. E., Ishii, T., Hirschberg, B., Bond, C. T., Adelman, J. P. (1998). Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium- activated potassium channels, 438(1995), 167-170.
- Yaron, J. R., Gangaraju, S., Rao, M. Y., Kong, X., Zhang, L., Su, F., Meldrum, D. R. (2015). K (+) regulates Ca (2+) to drive inflammasome signaling: dynamic visualization of ion flux in live cells. *Cell Death & Disease*, 6, e1954.
- Ypey, D.L., Clapham, D.E. (1984). Development of a delayed outward-rectifying K+ conductance in cultured mouse peritoneal macrophages. *PNAS*. 81:3083- 3087
- Zhang, W., Cai, Y., Xu, W., Yin, Z., Gao, X., & Xiong, S. (2013). AIM2 facilitates the apoptotic DNA-induced systemic lupus erythematosus via arbitrating macrophage functional maturation. *Journal of Clinical Immunology*. 33(5), 925–937.
- Zhao J, Zhang H, Huang Y, Wang H, Wang S, Zhao C, Liang Y, Yang N. (2013) Bay11-7082 attenuates murine lupus nephritis via inhibiting NLRP3 inflammasome and NF-κB activation. *International Immunopharmacology*. 17(1):116–22.
- Zhao, J., Zhang, H., Huang, Y., Wang, H., Wang, S., Zhao, C., Yang, N. (2013). Bay11-7082 attenuates murine lupus nephritis via inhibiting NLRP3 inflammasome and NF-κB activation. *International Immunopharmacology*. 17(1), 116–122.
- Zhao, X.-F., Pan, H.-F., Yuan, H., Zhang, W.-H., Li, X.-P., Wang, G.-H., Wu, G.-C., Su, H., Pan, F.-M., Li, W.-X., et al. (2010). Increased serum interleukin 17 in patients with systemic lupus erythematosus. *Molecular Biology Reports*. 37, 81-85.

Zheng, X., Jin, X., Li, F., Liu, X., Liu, Y., Ye, F., Li, Q. (2017). Inhibiting autophagy with chloroquine enhances the anti-tumor effect of high-LET carbon ions via ER stress-related apoptosis. *Medical Oncology*. 34(2), 25.

Zhong Z, Zhai Y, Liang S, Mori Y, Han R. (2013). TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nat. Commun.* 4:1611.

Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 469:221-225