

Universidad de Sevilla



Bases moleculares de los inflamomas:  
Implicaciones patológicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Farmacia

Carlos Pérez Márquez



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Grado en Farmacia

Trabajo de Fin de Grado: Revisión bibliográfica

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

BASES MOLECULARES DE LOS INFLAMASOMAS:IMPLICACIONES PATOLÓGICAS

Carlos Pérez Márquez

Tutor: José Luis Venero Recio

1. Resumen
2. Introducción
3. Objetivos de la revisión
4. Metodología
5. Resultados y discusión
  - 5.1. Términos relacionados: PRR y caspasas
    - 5.1.1. PRR
    - 5.1.2. Caspasas
  - 5.2. Inflamasomas
    - 5.2.1. Clasificaciones de los inflamasomas
      - 5.2.1.1. Familia NLR: inflamasoma NLRP3 e inflamasoma NLRC4
        - 5.2.1.1.1. Inflamasoma NLRP3
        - 5.2.1.1.2. Inflamasoma NLRC4
      - 5.2.1.2. Familia PYHIN: inflamasoma AIM2 e inflamasoma IFI16
  - 5.3. Regulación de los inflamasomas
    - 5.3.1. Proceso de señalización de los inflamasomas
    - 5.3.2. Mecanismos moleculares de la activación del inflamasoma NLRP3
      - 5.3.2.1. Activación del inflamasoma por señalización de ERO
      - 5.3.2.2. Activación del inflamasoma y flujo de potasio
      - 5.3.2.3. Desestabilización del lisosoma y activación del inflamasoma
    - 5.3.3. Regulación negativa
    - 5.3.4. Autofagia
  - 5.4. Enfermedades relacionadas
    - 5.4.1. Enfermedad de Alzheimer
      - 5.4.1.1. Disfunción y muerte celular
      - 5.4.1.2. Patología inducida por la proteína TAU
      - 5.4.1.3. Aclaramiento de péptidos A $\beta$  por fagocitosis
      - 5.4.1.4. Terapias enfocadas en la microglia
    - 5.4.2. Diabetes mellitus tipo II
    - 5.4.3. Aterosclerosis
6. Anexo: Interferón tipo 1
7. Conclusión
8. Bibliografía

## **1. Resumen**

Esta revisión bibliográfica llevada a cabo, nos acerca hacia varios conceptos relativos a diferentes mecanismos que se suceden en las células y que pueden dar lugar a la muerte de la misma.

Esto se sucede debido a la plataforma molecular estudiada aquí, denominada inflamasoma, y que es la responsable principal del proceso inflamatorio que desencadena esa posible muerte de las células y las enfermedades que se dan lugar por la síntesis de este inflamasoma, que no es uno solo, sino que hay varios tipos que pueden sintetizarse y llevar a cabo el proceso inflamatorio. Esta síntesis lo que produce es la activación de uno de los componentes del mismo, que son las caspasas, principalmente la caspasa-1, que producen la liberación de ciertas interleuquinas, principalmente IL-1 $\beta$ , uno de los principales mediadores de la respuesta inflamatoria en la célula. Estos inflamasomas se sintetizan en respuesta a algún factor interno o externo del organismo reconocido por alguno de los receptores que se encuentran en la célula, y sea indicativo de infección o toxicidad en la célula, dando lugar al proceso de señalización, que culmina con la salida de las interleuquinas mencionadas anteriormente.

Además de la señalización, también abordaremos el tema de la regulación de esa señalización y de las propias caspasas que forman parte de esta plataforma molecular, para ayudarnos a entender mejor todo el proceso inflamatorio.

Aparte del estudio del inflamasoma como plataforma molecular, debemos ver cómo están implicados en las diferentes enfermedades que pueden producir, tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, diabetes mellitus tipo 2 o aterosclerosis, entre otras.

## **Abstract**

This review brings up closer to several concepts about different mechanisms that occur in cells and can lead to death of them.

This occur due to the molecular platform studied here, denominated inflammasome, and it's the main responsible of the inflammatory process that triggers that possible cells' death and the illness that occurs because of the synthesis of this inflammasome, that is not one just only, there are several types that can synthesized and carry out the inflammatory process. This synthesis produces the activation of one of the components thereof, called caspases, mainly caspase-1, that produces the liberation of several interleuquinas, mainly IL-1 $\beta$ , one of the key mediators of the inflammatory response in the cell. These inflammasome are synthtized in response of any internal or external factor of the organism recognized for any of the receptors

that are found in the cell, and is indicative of infection or toxicity in the cell, resulting in the signaling, that ends with the exit of the interleukines mentioned previously.

Furthermore of the signaling, we also address the topic of the signaling regulation of the same caspases that form part of this molecular platform, to help us to understand better the inflammatory process.

Apart of the study of the inflammasome like molecular platform, we see how they are involved in the different illnesses that can produce it, like Alzheimer disease, Parkinson disease, diabetes mellitus type 2 or atherosclerosis, among others.

## **2. Introducción**

El estudio del cuerpo humano es algo que parece que nunca acabará, como la comprensión de los procesos cerebrales, el almacenamiento de información o el origen de las enfermedades y su tratamiento. La ciencia siempre ha querido dar respuestas a estas cuestiones mediante la realización de diferentes estudios.

Para ello, los estudios iniciales de toda investigación deben abarcar un mayor área de conocimiento, en este caso los procesos de inflamación celular, para adentrarnos en otros estudios que se acerquen más al objetivo final de la investigación y obtengamos las respuestas a las cuestiones planteadas, que serían el por qué esta inflamación celular puede llegar a provocar la muerte de la célula y propiciar el inicio de diferentes enfermedades.

Dentro de estos procesos inflamatorios están involucradas diferentes moléculas que, al asociarse, generan plataformas moleculares responsables del inicio de la inflamación, que son los inflamasomas, los cuales reclutan una mayor cantidad de proteínas que median en la inflamación y en la muerte celular, que son las caspasas inflamatorias. Que haya activación de caspasas no significa que siempre se vaya a producir la muerte de la célula, ya que puede suceder que sólo se produzcan mecanismos inflamatorios sin necesidad de producirse la piroptosis, un tipo de muerte celular asociada a la activación de los inflamasomas.

A su vez, la activación de las caspasas da lugar a la activación y liberación de ciertos tipos de citoquinas conocidas como interleuquinas, que culminarían un proceso de respuesta inmune que podría acabar con la muerte de la célula.

La activación del sistema inmune se puede producir en cualquier célula por la aparición de una serie de factores que ponen en marcha la maquinaria de ensamblaje del inflamasoma en la célula, aparte de los propios factores de riesgo que tiene cada enfermedad de las aquí tratadas

como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer o la aterosclerosis, donde la muerte celular podría producirse en neuronas implicadas en funciones cognitivas o en los macrófagos y otras células que intentan reducir la concentración de colesterol arterial, respectivamente.

Nuestro trabajo consiste en explorar con mayor profundidad esas áreas de la ciencia y el cuerpo humano de las que aún poco sabemos, enfocándolas a su completa comprensión, intentando, por fin, dar respuesta a esas cuestiones que tanto preocupan a la sociedad de hoy en día, que cada vez es más longeva y que, por lo tanto, a lo largo de los años, padecerá alguna de estas enfermedades con mayor o menor prontitud y severidad.

### **3. Objetivos de la revisión**

A lo largo de este trabajo de revisión se plantea como objetivo principal un tema de relativa actualidad. Para llevar la exposición de los objetivos, cabe diferenciar entre objetivos generales y objetivos específicos.

Teniendo en cuenta esta información, en este caso en particular, un objetivo general sería el estudio de las diferentes estructuras moleculares que entran en juego a la hora de iniciarse un proceso inflamatorio en el organismo, como son los inflammasomas y los varios tipos que hay, las diferentes estructuras celulares que son partícipes y las condiciones que originan el inicio de este proceso patológico. Dentro de este objetivo general es necesaria la diferenciación de dos objetivos específicos: indagar sobre qué es un inflammasoma y conocer las diferentes patologías que pueden estar relacionadas con el mismo.

El estudio de los diferentes factores que participan en el desarrollo del proceso inflamatorio sería otro de los objetivos generales de esta revisión, ya que no es suficiente conocer solo el proceso inflamatorio en sí, también conocer qué puede desencadenar dicho proceso.

### **4. Metodología**

Para la elaboración del trabajo, hemos procedido a la búsqueda de información clara y concisa sobre el tema a tratar, utilizando la base de datos de Medline, accediendo a ella a través del buscador PubMed, y centrando la búsqueda en revistas específicas de alto impacto en la comunidad científica. Para ello hemos acotado la búsqueda, mediante la introducción en el buscador de varios términos tales como inflammasomas (inflammasomes), enfermedad de Alzheimer (Alzheimer's disease), enfermedades neurodegenerativas (neurodegenerative diseases), aterosclerosis (atherosclerosis) o diabetes mellitus (diabetes mellitus), entre otros.

También hemos reducido la búsqueda a artículos de ciertos años de publicación (2012-2016), estudios de doble ciego, estudios que fueran revisiones y otros parámetros de búsqueda.

Esta búsqueda de información se ha realizado en base a los diferentes apartados que debe tener esta revisión para abordar el tema tratado, en relación a la temática de esta revisión y a la correlación de estos apartados entre sí, incluyendo una breve explicación sobre el inflamasoma, las familias que se incluyen, la señalización, la participación de las caspasas y las enfermedades relacionadas con él.

## **5. Resultados y discusión**

### **5.1. Términos relacionados: Receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y caspasas**

#### **5.1.1. PRR**

Los PRR (receptores de reconocimiento de patrones) son las estructuras proteicas que van a reconocer a los diferentes activadores de inflamasomas, los cuales son los PAMP (patrones moleculares asociados a un patógeno) y los DAMP (patrones moleculares asociados a un daño). Estos PRR se expresan generalmente en células inflamatorias o del sistema inmune, como monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (Schroder y Tschopp, 2010; Fullard y O'Reilly, 2015).

Los PRR podríamos clasificarlos, utilizando como criterio su localización en la célula, en: asociados a la membrana, solubles y citosólicos.

**Asociados a la membrana:** están formados por la familia de receptores TLR (Toll Like Receptor), CLR (Receptores de Lectina tipo C) y otros como TRIM (familia de motivos tripartitos).

Dentro de los TLR (Toll Like Receptors) encontramos diez integrantes (desde TLR-1 hasta TLR-10). Estos TLR comparten un dominio en el citoplasma llamado TIR que inicia el proceso de señalización, por lo que estos receptores se unen a sus ligandos. También poseen un dominio LRR (secuencia rica en leucinas). Los dominios extracelulares de los diferentes integrantes de este grupo hacen que estos se unan a un ligando o a otro. Tras la unión con el ligando, se forman heterodímeros u homodímeros, un paso esencial en su activación (Mortensen y cols., 2008; Medzhitov y cols., 1997; Takeda y cols., 2007; Martinon y cols., 2009).

Dentro de los receptores CLR, encontramos también muchos integrantes (unos 17), y todas estas proteínas poseen un dominio C-lectina en su estructura, como aquellas que facilitan la unión célula-célula o aquellas necesarias para la unión con agentes patógenos y la apoptosis en la inmunidad.

Los receptores TRIM (familia de motivos tripartitos) son receptores que poseen un dominio RING que ha sido identificado como un regulador negativo de las señales de los TLR, suprimiendo la activación del inflamasoma NLRP3 promovida por varios activadores conocidos, como son el ATP, nigericina, sílice y cristales de urato (Hu y cols., 2010). El más característico es el TRIM30 y son receptores expresados a partir de la activación de células mieloides.

**Solubles:** dentro de los solubles tenemos a las colectinas, pentraxinas, PGR y MBL. No son PRR con una participación fundamental en el tema que nos ocupa.

**Citosólicos:** dentro de estos van a estar los fundamentales y principales PRR que constituirán el futuro inflamasoma. Tenemos la familia RLR (receptores citosólicos tipo ANA helicasa), NLR, ALR, y otros como DAI.

La familia RLR está compuesta por RIG-1 (ácido retinoico inducido por gen 1) y MDA-5 (gen asociado a diferenciación del melanoma 5)

La familia NLR está constituida por los receptores tipo NOD (dominio de oligomerización de nucleótidos que contiene proteínas) NOD1 y NOD2, los receptores tipo NLRP (dominio de oligomerización de nucleótidos, dominio rico en leucina y pirina que contiene proteínas), dentro de los cuales hay varios tipos, entre ellos el NLRP3, que es el más importante y estudiado.

También encontramos los receptores tipo NLRC (dominio de oligomerización de nucleótidos, rico en leucina, compuesto por un dominio CARD y que contiene proteínas), donde el más representativo es NLRC4.

Por último, nos encontramos la familia PYHIN en la que los receptores son de tipo ALR (AIM2 like receptors), donde aparecen AIM2 (absent in melanoma-2) y el IFI16 (interferón-γ inducido por la proteína IFI16).

Para acabar, nos quedaría el receptor DAI (regulador y activador de IFN ADN dependiente), también conocido como DLM-1/ZBP1).



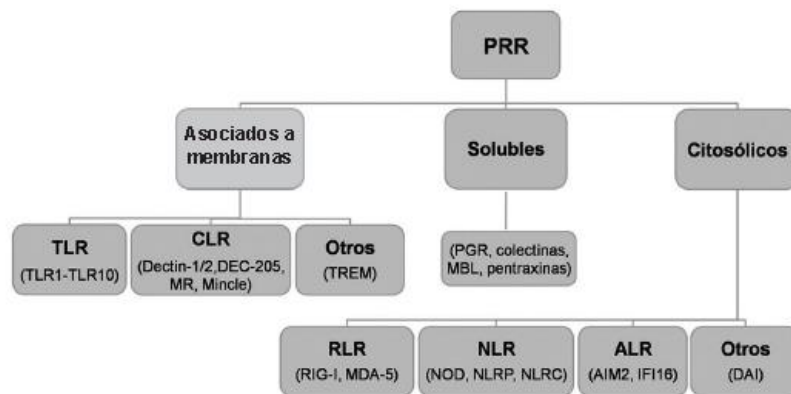


Figura 1. Clasificación de los diferentes receptores de patrones, entre los que se encuentran los citosólicos, los más importantes y estudiados, como es el NLRP3, uno de los PRR que posteriormente quedará ensamblado en la plataforma molecular denominada inflamasoma.

### **5.1.2. Caspasas**

Las caspasas son proteínas que van a ensamblarse en la plataforma molecular denominada inflamasoma, cuya activación da lugar a la liberación de citoquinas proinflamatorias que desarrollarán la respuesta mediada por el sistema inmune.

Estas caspasas podríamos clasificarlas según la función que van a desempeñar en el inflamasoma: responsables de sólo el proceso inflamatorio o responsables de la muerte celular derivada de ese proceso inflamatorio. Las caspasas más afines a los inflasomas son la caspasa-1 y la caspasa-11, las cuales provienen de una proteína anterior que deberá activarse, la cual es la procaspasa-1 y la procaspasa-11, respectivamente, de forma autoproteolítica. Estas procaspasas son zimógenos, enzimas que necesitan ser activadas para poder desempeñar su función, por lo que éstas deben ser reclutadas por el inflamasoma para poder activarse posteriormente. Cabe destacar que la caspasa-11 no se encuentra en el ser humano, sino que se encuentra en ratones, los animales de los estudios de investigación que van a aparecer en esta revisión. Los homólogos humanos de la caspasa-11 son la caspasa-4 y la caspasa-5.

La procaspasa-1 está formada por dos dominios: p35 y p10. El dominio p35 contiene un dominio CARD que le va a servir para unirse a una proteína de reclutamiento del inflamasoma (ASC) mediante interacciones CARD-CARD, además de unirse un dominio p20, resultante del dominio p35. A su vez, dos dominios p20 se heterodimerizan con dos moléculas del dominio

p10 para activar a la caspasa-1 en este caso, ya que la caspasa-11 posee otros dominios diferentes, entre los cuales está la subunidad p26, fundamental para esta caspasa.

Continuando con la caspasa-1, ésta pasará a ser una proteasa de cisteína-aspartato específica, cuya activación se llevará a cabo en respuesta a patógenos bacterianos que den lugar a la activación específica de esta caspasa, como Salmonella typhimurium, entre otros activadores como el ATP, toxinas que forman poros en la membrana de la célula, sustancias cristalinas tales como asbestos y sílice, entre otros. Cuando varias proteínas ASC unidas entre sí se unen al inflamasoma, se induce la autoproteólisis de la caspasa-1, produciéndose la muerte celular por piroptosis. Pero la formación de los componentes del inflamasoma no es suficiente para facilitar la activación de la caspasa (Broz y cols., 2010), sino que hacen falta la aparición de varias señales endógenas conocidas como DAMPs, como por ejemplo la escisión de enzimas en la vía glucolítica, restricción de la replicación bacteriana en macrófagos infectados o el aumento de las vías de reparación de las células a través de la regulación del metabolismo lipídico (Lamkanfi, 2011; Keller y cols., 2008).

Con respecto a la caspasa-11, es mediadora en la muerte celular por piroptosis y en la salida de moléculas endógenas peligrosas a través de la secreción por parte de células del sistema inmune de “moléculas alarma” como es HMGB-1 (en inglés high mobility group box 1). A diferencia de la caspasa-1, la caspasa-11 puede unirse directamente al PAMP o DAMP que ataque a la célula, dentro de los cuales se encuentran bacterias Gram negativas como Escherichia coli. Las bacterias Gram positivas no dan lugar a la activación de la caspasa-11 (Ratinham y cols., 2012). Normalmente cuando se produce la detección de algún producto microbiano, se pone en marcha la maquinaria de síntesis de inflamasomas canónicos que dan lugar a la activación de la caspasa-1, después del reclutamiento y autoproteólisis de la procaspasa-1. Sin embargo, la caspasa-11 puede unirse directamente a estos productos microbianos, como LPS uniéndose gracias a la lisina de sus dominios CARD (Shi y cols., 2014). Además de LPS, la caspasa-11 necesita para activarse otras señales producidas por otras proteínas como el interferón tipo 1 (IFN-1), que a su vez se activa por proteínas unidas a guanilato (GBPs en inglés) (Pilla y cols., 2014; Meunier y cols., 2014). Según varios estudios, esta unión es necesaria para que el sistema inmune detecte al patógeno, comience la respuesta inflamatoria con el inicio del ensamblaje del inflamasoma, lo que dará lugar a un mayor reclutamiento de caspasa-11. Como ya dijimos, son las caspasas homólogas humanas (caspasa-4 y caspasa-5) las que tienen la misma función que la caspasa-11. Otra de las funciones de esta caspasa-11 es la participación en la activación de la caspasa-1, ya que al ser

reguladora del proceso inflamatorio, debe regular también el proceso de activación de la caspasa-1 como desencadenante del proceso inflamatorio.

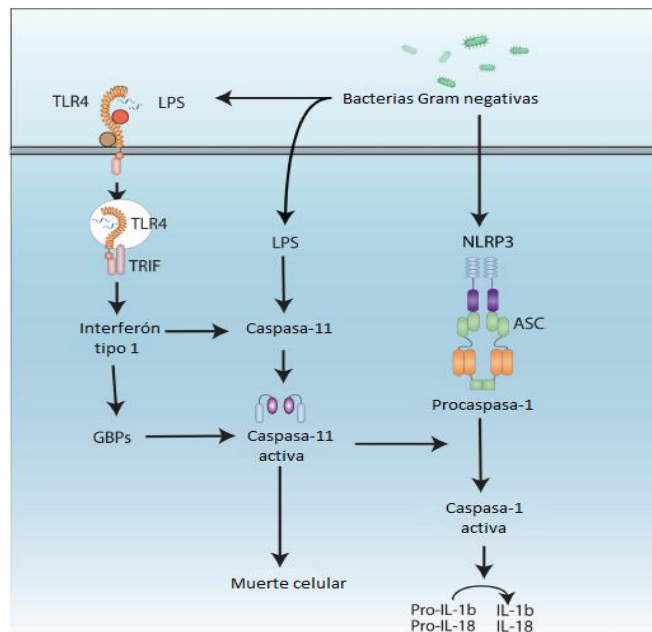


Figura 2. Proceso de activación de un inflamasoma no canónico, donde participa la caspasa-11, que actúa como reguladora de la activación de la caspasa-1 final.

## 5.2 Inflamasomas

Un inflamasoma es una plataforma molecular ensamblada por varios dominios proteicos, los cuales son producidos de manera independiente en la célula. Este complejo multiproteico es el resultado de la respuesta mediada por el sistema inmune, donde éste puede ejercer dos funciones: combatir infecciones microbianas o conducir a la célula a un proceso inflamatorio, siempre y cuando las caspasas activadas, que continúan el proceso iniciado por el sistema inmune, estén destinadas a ejercer una de estas funciones, ya que hay dos tipos de caspasas, inductoras de la muerte celular e inductoras de procesos inflamatorios.

Esta plataforma, una vez que está completa, induce la activación de la procaspasa-1 o la procaspasa-11, las cuales son las precursoras de la caspasa-1 y la caspasa-11, produciéndose la liberación de las citoquinas de la familia de las interleuquinas-1, que son las IL-1 $\beta$  e IL-18, las cuales se forman a partir de las precursoras proIL-1 $\beta$  y proIL-18.

El proceso de activación se desarrolla debido a la presencia de activadores endógenos o exógenos conocidos como PAMPs y DAMPs, que serán reconocidos por los PRR de los que ya hemos hablado con anterioridad y que promoverá la movilización de los diferentes

componentes de la plataforma molecular y conllevará a su señalización, de la que hablaremos más adelante.

### **5.2.1. Clasificaciones de los inflamasomas.**

Vamos a clasificar a los inflamasomas según dos criterios: según la forma de activación de la caspasa-1 y según la conformación estructural que posee el inflamasoma, es decir, según la proteína principal a la cual se unen el resto de componentes proteicos que será la que proporcione el nombre al inflamasoma.

Según el primer criterio, tenemos los inflamasomas canónicos y los no canónicos. Los canónicos son aquellos en los que la caspasa-1 se activa por medio de los DAMPs y PAMPs ya conocidos. Son los más representativos, es decir, la mayor parte de los inflamasomas permite la unión de esta caspasa-1. Estos inflamasomas canónicos van a ser activados en respuesta a varios ligandos, como pueden ser bacterias Gram positivas, componentes del sistema secretor bacteriano tipo III (T3SS), ADN de doble cadena bacteriano o virásico que se encuentre en el citosol, entre otros ligandos. Los no canónicos son aquellos en los que la caspasa-1 va a activarse gracias a la colaboración de la caspasa-11. Esta caspasa-11 puede ser activada en respuesta a bacterias Gram negativas y conducir a la muerte de la célula por piroptosis y a la salida de moléculas endógenas conocidas como “moléculas alarma” como es HMGB1 (high mobility group box 1 en inglés) de forma caspasa-1 independiente, ayudando a la activación de la caspasa-1 como veíamos en la figura anterior (Ver Figura 2) (Kayagaki y cols. 2011).

Según el segundo criterio, la conformación estructural, los vamos a clasificar según el tipo de dominio NACHT (dominio central de unión y oligomerización de nucleótidos) que lo conforma. Estos inflamasomas los clasificamos en dos grandes familias, que serían la familia NLR y la ALR, siendo la familia NLR la más numerosa, importante e investigada. Dentro de la familia NLR, aparecen tres subfamilias: IPAF (está formado a su vez por NLRC4 y NAIP), NOD (NOD1-2, NOD3/NLRC3, NOD4/NLRC5, NOD5/NLRX1, CIITA) y NLRP (NLRP1-14) (Ting y cols., 2008). La familia ALR, como miembros más representativos, contiene a los inflamasomas AIM2 e IFI16.

#### **5.2.1.1. Familia NLR: inflamasoma NLRP3 e inflamasoma NLRC4**

##### **5.2.1.1.1. Inflamasoma NLRP3**

El inflamasoma NLRP3 es el más estudiado de todos los inflamasomas que conocemos hasta ahora. Este inflamasoma NLRP3 participa en varias enfermedades tales como Alzheimer (Halle

y cols., 2008), Parkinson, gota (Martinon y cols., 2006), aterosclerosis y diabetes tipo 2. Está constituido por la unión de varias proteínas, incluyendo a la proteína NLRP3 (constituida por un dominio en la región central, el cual es un dominio central de unión y oligomerización de nucleótidos denominado NACHT, un dominio PYD constituido por uniones de pirina y una secuencia repetitiva rica en leucinas (LRR) que posee en la región C-terminal), la proteína adaptadora ASC (proteína asociada a apoptosis que contiene un dominio que recluta a la caspasa, CARD y un dominio PYD que facilita la unión a NLRP3) y la procaspasa-1 que contiene un dominio CARD para unirse a la proteína ASC.

Las interacciones entre estas tres proteínas regulan la función del inflamasoma que conforman, con la finalidad de que la actividad inmune sea la apropiada. Estas interacciones se suceden debido a los dominios que poseen las proteínas que conforman el inflamasoma. Dependiendo de la ausencia o existencia de activadores de la respuesta inmune, aparecerá un tipo de interacción u otra. Si vemos una ausencia de estos activadores, aparecerán interacciones entre el dominio NACHT y el dominio LRR de la proteína NLRP3, imposibilitándose la interacción entre esta proteína y la proteína ASC, por lo que no se forma el inflamasoma (Inoue y Shinohara, 2013).

Ahora bien, si aparecen activadores de la respuesta inmune, como pueden ser PAMPs, DAMPs o estrés oxidativo, entre otros, se darán lugar a dos tipos de interacciones. La primera de ellas es la interacción PYD-PYD entre los dominios PYD de la proteína NLRP3 y la proteína ASC, que permite la unión de éstas entre sí, y la otra interacción es la CARD-CARD entre el dominio CARD de la proteína ASC y el dominio CARD de la procaspasa-1. Estas interacciones permiten el ensamblaje del inflamasoma NLRP3 en este caso, ya que la proteína que se une es la proteína NLRP3, y se producirá la secreción de interleuquinas, previa activación de la procaspasa-1 durante el proceso de señalización del inflamasoma que dan lugar a la caspasa-1.

#### **5.2.1.1.2. Inflamasoma NLRC4**

El inflamasoma NLRC4 va a estar compuesto por una proteína NLRC4 que contiene los mismos dominios que conforman la proteína NLRP3, (dominio NACHT, dominio LRR y dominio PYD), una proteína ASC, aunque para la activación del inflamasoma no es imprescindible su unión y varias proteínas NAIP.

Las proteínas NAIP van a unirse al inflamasoma NLRC4 y formar complejos que podrían dar lugar al inflamasoma, pero que aún no lo es por sí mismo, sino que sólo es una estructura

promotora del mismo. Para que se dé la formación del inflamasoma, la proteína NAIP une sus ligandos con la proteína NLRC4 y se forma el inflamasoma NAIP/NLRC4. Para ello, debe ocurrir una autoinhibición que permita la oligomerización por parte de las proteínas NAIP, pero aún no se sabe cómo ocurre este proceso (Tenthorey y cols. 2014). Las proteínas NAIP que conforman este inflamasoma son NAIP1 NAIP 2 NAIP 5 y NAIP 6.

La proteína NAIP 1 va a unirse PrgJ, un componente del T3SS el cual necesita una proteína que en este caso va a ser la NAIP 1 (Yang y cols., 2013; Rayamajhi y cols., 2013).

NAIP 2 va a unirse a otro tipo de sistema secretor que en este caso es T3SS en forma de bastoncillo, procedente de un componente basal en forma de bastoncillo de la bacteria *Salmonella* sp. (Kofoed y cols., 2011; Zhao y cols., 2011). NAIP 5 y NAIP6 se van a unir a una flagelina bacteriana.

Respecto a los humanos, solo vamos a poseer un tipo de proteína NAIP, que es la proteína NAIP1 que va a interactuar con el T3SS dependiente de proteína a través de la unión a la proteína CprI, que sería la verdadera activadora del inflamasoma NLRC4. Esta proteína forma parte del T3SS de la bacteria *Chromobacterium violaceum* (Yang y cols., 2013).

Esto quiere decir que NLRC4 no es un inflamasoma que guarde tanta relación con la inflamación como si pasa con el inflamasoma NLRP3.

Estudios posteriores en ratones han demostrado que puede haber una fosforilación en el residuo Ser<sup>533</sup> (Qu y cols. 2012) de este inflamasoma NLRC4 que lo active, promovido, por ejemplo, por la infección bacteriana de *Salmonella typhimurium*, aunque aún no se ha podido demostrar esto con veracidad (Kajiwara y cols., 2014).

También se ha descubierto en humanos dos mutaciones que confieren al inflamasoma una ganancia de funciones que puede ser perjudicial, causando síndromes autoinmunes espontáneos (Romberg y cols., 2014).

#### **5.2.1.2. Familia PYHIN: inflamasoma AIM2 e inflamasoma IFI16**

El inflamasoma AIM2 y el inflamasoma IFI16 pertenecen a la familia de los inflamasomas PYHIN, dentro de la cual se encuentran otros como MNDA e IFIX. Estos inflamasomas poseen un dominio PYD y uno o dos dominios HIN-200 que se unen a ADN, además de la proteína ASC, para reclutar a la procaspasa-1 al complejo multiproteico. Esta familia de inflamasomas activa

a la caspasa-1 y, a diferencia de la familia NLR, el inflamasoma se une directamente al ligando, que es ADN de doble cadena, por lo que no posee el dominio CARD. La unión del inflamasoma al ADN depende de la longitud de la secuencia del mismo, donde esa secuencia debe ser de al menos 80 pares de bases para que se proceda a la activación del inflamasoma, proceso que ocurre en todos los inflamasomas de esta familia PYHIN.

Estos inflamasomas se unen directamente al ADN, pero su localización en la célula es diferente. AIM2 se encuentra en el citosol e IFI16 en el núcleo. AIM2 es capaz de unirse directamente al ADN y activarse para dar lugar al inflamasoma, pero parece ser que cuando el ADN no se elimina adecuadamente del medio extracelular o no se ha degradado bien en el fagolisosoma, el ADN accede a compartimentos citosólicos, donde se produce la transcripción de genes que codifican al interferón de tipo 1 y otros genes asociados. Es en estas condiciones donde AIM2 es capaz de activarse y dar lugar al inflamasoma.

IFI16 en cambio, se encuentra en el interior del núcleo de las células, aunque también puede encontrarse en pequeñas cantidades en el citosol de algunas. Estando en el citosol, IFI16 atrae al ADN viral, lo cual conduce a la producción de interferón tipo 1, al igual que AIM2 (Unterholzner y cols. 2010).

Estando en el núcleo, es capaz de reconocer, por ejemplo, el genoma de herpes virus asociados al sarcoma de Kaposi, lo que pone en marcha una respuesta por parte de IFI16, el cual se une a la proteína ASC y se transloca al citosol para poder comenzar el ensamblaje del inflamasoma, siendo la caspasa-1 la caspasa integrante del inflamasoma. El mecanismo por el cual IFI16 es capaz de reconocer a este genoma virásico y evitar al genoma humano aún no ha podido establecerse. Una posibilidad es que, en el contexto de la cromatina, el ADN humano sea inaccesible a IFI16, aunque cómo se mantiene esta inaccesibilidad durante la división celular es una cuestión importante que queda aún por tratar.

Esta familia de inflamasomas puede estar relacionada con el desarrollo de ciertas enfermedades autoinmunes, como es el lupus eritematoso. Esto, lo convierte en una diana farmacológica para la investigación del tratamiento de esta enfermedad. También es usado como coadyuvante en ciertas vacunas (Suschak y cols., 2014).

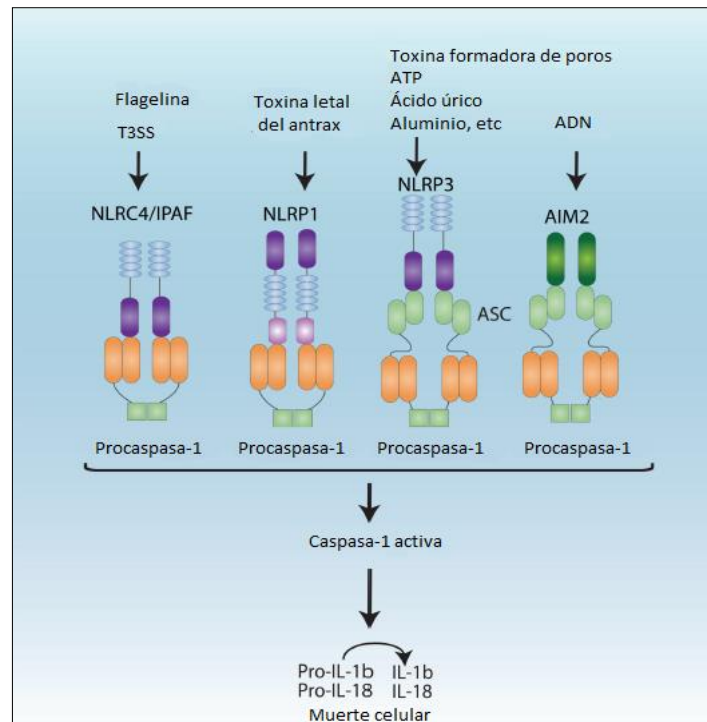


Figura 3. Diferentes tipos de inflamasomas, con los diferentes DAMPs y PAMPs que activan a cada uno. Todos los ensamblajes culminan con la activación de la procaspasa-1, que dará lugar a la caspasa-1 y esta promueve la liberación de las interleuquinas.

### **5.3. Regulación de los inflamasomas**

#### **5.3.1. Proceso de señalización de los inflamasomas.**

Como ya hemos comentado, los inflamasomas son plataformas moleculares que consisten en el ensamblaje de varias proteínas sintetizadas en la célula, cuyo proceso de ensamblaje se inicia por la aparición de una serie de señales endógenas o exógenas, que serán capaces de desencadenar el proceso inflamatorio en la célula que da lugar a la síntesis del inflamасoma, pudiéndose producir un fenómeno de muerte celular no programada como es la piroptosis.

Estas señales se producen de acuerdo a la aparición de DAMPs o PAMPs. Dentro de estos DAMPs y PAMPs, nos encontramos la síntesis de ATP, toxinas que forman poros en la membrana de la célula, sustancias cristalinas tales como asbestos y sílice, radiación UVB, ácidos nucleicos, ácido hialurónico, péptidos  $\beta$ -amiloides, los cuales son una de las principales causas de daño cerebral en la enfermedad de Alzheimer (Halle y cols., 2008), los cristales de ácido úrico, producido por una hiperuricemia que desencadenaría en la gota (Martinon y cols., 2006) y diversos antígenos fúngicos, bacterianos y virales. También hay otros procesos que son capaces de iniciar esta señalización del inflamасoma, como es un aumento de flujo de calcio, junto con otros mecanismos que veremos más adelante. Además de todos estos posibles



PAMPs y DAMPs, nos encontramos otro proceso que va a ser fundamental en la finalización de la síntesis del inflamasoma NLRP3, que sería la participación del lisosoma liberando una enzima, la cual es la catepsina B, que daría lugar a la autoproteólisis de la procaspasa-1, y quedaría activada la caspasa-1. Con la activación de la caspasa-1, se dará lugar a la producción de citoquinas, las cuales son la interleuquina-1 $\beta$  y la interleuquina-18, que darán lugar a los procesos inflamatorios celulares, pudiendo ocasionar la muerte de la célula por piroptosis, mediada únicamente por la caspasa-1.

A continuación, vamos a ver cómo se produce esta señalización de forma más detallada (Ver Figura 4):

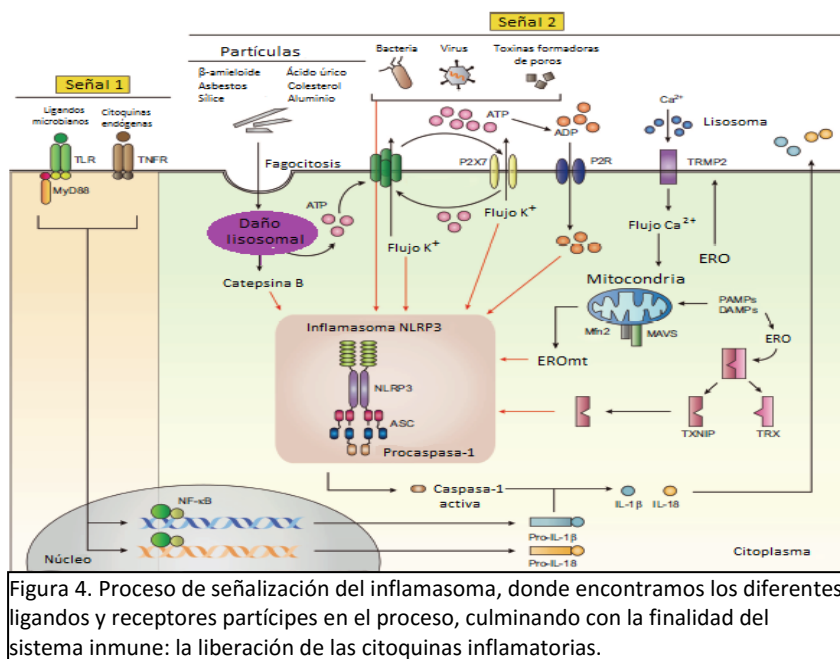


Figura 4. Proceso de señalización del inflamasoma, donde encontramos los diferentes ligandos y receptores que participan en el proceso, culminando con la finalidad del sistema inmune: la liberación de las citoquinas inflamatorias.

Durante el proceso de señalización, hay que tener en cuenta dos situaciones cruciales que posibilitan el mecanismo de ensamblaje del inflamasoma, las cuales se suceden a medida que avanza el proceso de señalización. Estas situaciones van a ser el desarrollo de la primera y segunda señal que van a producirse y que darán pie a la continuación del proceso. Tomaremos como ejemplo de iniciador del proceso los lipopolisacáridos (LPS) de la pared bacteriana.

Estos lipopolisacáridos, los cuales van a ser la primera señal del proceso de señalización, son reconocidos por los PRR y da lugar a la síntesis de una molécula que desencadenará una mayor producción de la proteína NLRP3 en el núcleo vía activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Tras la síntesis de esta proteína NLRP3 se procede a su salida del núcleo hacia el citosol y ahí se dará lugar a un proceso de desubiquitinización de NLRP3 (Juliana y cols., 2012). La producción

de la molécula NF- $\kappa$ B va a favorecer esta desubiquitinización de NLRP3 en el citosol, además de aumentar su producción, mencionado anteriormente.

Otro de los componentes del inflamasoma, que es la proteína ASC, se sintetiza al mismo tiempo, produciéndose en ella una fosforilación y una ubiquitinización, todo ello en el citosol, igual que NLRP3.

Tras la formación de la proteína ASC se da lugar a la relocalización de la proteína NLRP3 que procedía del núcleo y que posteriormente se expulsó del mismo hacia el citosol dónde a partir de él se introdujo en la mitocondria. La introducción en la mitocondria se realiza gracias a la colaboración del adaptador proteico de señalización antiviral mitocondrial (MAVS en inglés), y su heterodímero pequeño asociado a él (SHP en inglés), necesarios para el reclutamiento de NLRP3 a la mitocondria, aunque estas dos moléculas tienen funciones opuestas. Los MAVS contribuyen a la activación del inflamasoma, mientras que SHP interviene en la regulación negativa (Yang y cols., 2015). Una deficiencia de SHP da lugar al acercamiento entre NLRP3 y ASC en el retículo endoplasmático, lugar donde la activación del inflamasoma está muy favorecida.

A partir de aquí, se van a suceder una serie de procesos que van a contribuir a la continuación de la señalización y que van a formar parte de la segunda señal. Estos van a ser la salida de NLRP3, ERO (Especies Reactivas de Oxígeno), ADNmt (ADN mitocondrial) y de cardiolipina de la mitocondria, además de producirse un aumento del flujo de potasio y de calcio.

Con esto, se producirán las uniones entre los diferentes dominios de los componentes del inflamasoma final. Primero, se producirá la unión entre la proteína NLRP3 y la proteína ASC mediante interacciones PYD-PYD. Tras la unión de la proteína ASC a la proteína NLRP3 se producirá la unión del zimógeno, que va a ser la procaspasa-1, con la proteína ASC mediante uniones CARD-CARD, donde el dominio CARD es el dominio de ASC que recluta a la procaspasa. La unión de la procaspasa-1 a la proteína ASC está favorecida por la liberación de una enzima denominada catepsina B procedente del lisosoma, el cual sufre una desestabilización y gracias a esta catepsina B se podrá producir la activación de la procaspasa-1 y dar lugar a la caspasa-1, mediante un proceso de autoproteólisis que sufre la procaspasa-1. Con la activación de la caspasa-1, se procederá a la liberación de las interleuquinas, las cuales van a ser la IL-1 $\beta$  y la IL-18, con lo que se procederá a la iniciación del proceso inflamatorio.

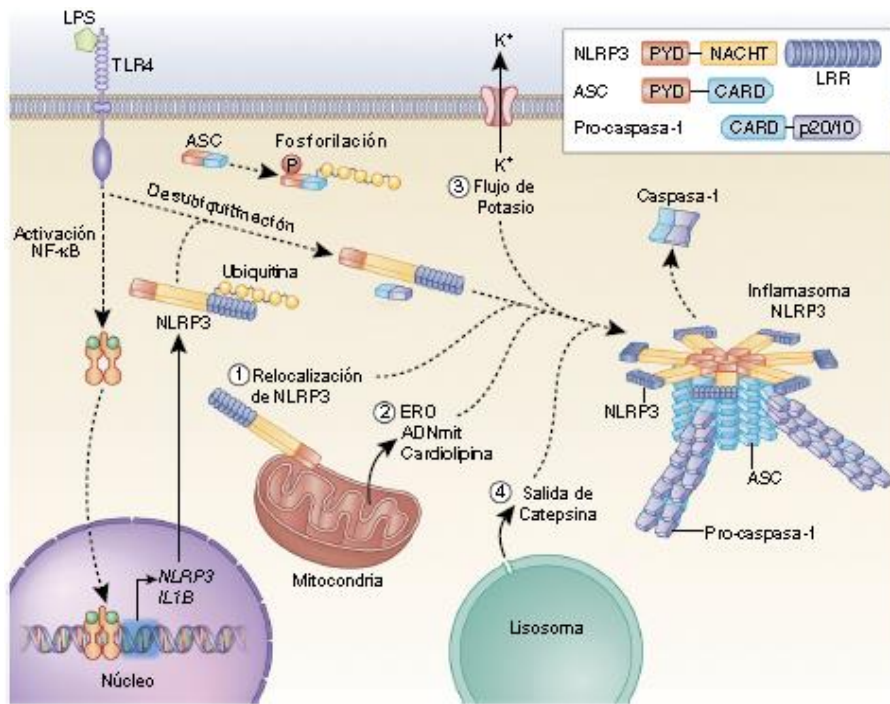


Figura 5. Proceso de síntesis del inflamasoma en la célula.

### 5.3.2. Mecanismos moleculares de la activación del inflamasoma NLRP3

Como ya sabemos, para que se produzca la activación del inflamasoma, debe procederse al mecanismo de señalización que dé lugar a la síntesis de la plataforma molecular. Durante esta señalización se producen varios mecanismos que conllevan a esta activación, los cuales vamos a detallar más específicamente.

#### 5.3.2.1. Activación del inflamasoma por señalización de ERO

La activación del inflamasoma se va a deber a la concentración excesiva de ERO en la célula, a lo que contribuye, en mayor parte, la mitocondria. La mitocondria produce la liberación de estas ERO promovida por los diferentes activadores del inflamasoma, como por ejemplo los ácidos grasos saturados, que producen la salida de IL-1 $\beta$  que es dependiente de la concentración de ERO (Wen y cols., 2011). Además de los ácidos grasos, existen otras moléculas que llevan a la mitocondria a no cumplir bien su función o a desencadenar la muerte de la célula al haber incrementado la cantidad de ADN mitocondrial oxidado en el citosol, lo cual activaría al inflamasoma, que podría producir la muerte de la célula.

Otros partícipes de la disfunción de la mitocondria relacionados con los ácidos grasos sería la activación del inflamasoma mediada por liposomas, que es dependiente de la generación de

ERO por parte de la mitocondria y, a su vez, esta generación de ERO es dependiente de flujo de calcio producido por el canal TRPM2 (Zhong y cols., 2013).

Además de los ácidos grasos y apoyándonos en estudios en ratones, las ERO pueden generarse por varias enzimas, como la xantina oxidasa, xantina oxigenasa y NADPH oxidasa. A través del estudio en ratones, en los que los macrófagos de los mismos, que eran deficientes en NADPH oxidasa, se vio que la maduración y producción de IL-1 $\beta$  en respuesta a las señales que desencadenan este aumento de producción, como la sílice, ATP o cristales de urato, el mecanismo era normal.

### **5.3.2.2. Activación del inflamasoma y flujo de potasio**

Otro mecanismo que facilita la activación del inflamasoma es la disminución de la concentración de potasio intracelular. Algunos activadores del inflamasoma NLRP3 como el ATP y la nigericina producen una conductancia de potasio que atraviesa la membrana celular, que da lugar a la alteración de la concentración de iones intracelulares, para que pueda iniciarse el proceso de movilización de proIL-1 $\beta$  (Perregaux y cols., 1994). Se ha visto que la reducción de la concentración de potasio es esencial para que el inflamasoma NLRP3 se active en macrófagos y monocitos, causado por activadores del inflamasoma ya conocidos como la nigericina y el ATP. Podemos concluir que la producción de ERO y el flujo de potasio contribuyen juntos o por separado a la activación del inflamasoma NLRP3 y con ello a la activación de la caspasa-1 y la producción de IL-1 $\beta$ .

### **5.3.2.3. Desestabilización del lisosoma y activación del inflamasoma**

La desestabilización del lisosoma, junto con la producción de ERO y la disminución del potasio intracelular, debido a la aparición de activadores como bacterias, partículas como los asbestos y la sílice o los ácidos grasos saturados, contribuyen a la activación del inflamasoma NLRP3 (Dostert y cols., 2008). De hecho, varios DAMPs y PAMPs parecen ser dependientes de la desestabilización del lisosoma para que se inicie la activación del lisosoma. Por ejemplo, la desestabilización del inflamasoma y la salida de catepsina B del mismo son necesarios para la activación del inflamasoma por parte del adenovirus tipo 5.

Recientemente, la ruptura del lisosoma con la posterior salida de hidrolasas del interior del mismo, ha demostrado que es esencial para que la albúmina desencadene la inflamación tubulointersticial y fibrosis, procesos implicados en la patogénesis crónica de enfermedades renales (Liu y cols., 2015).

De forma relativa al lisosoma, la activación de la caspasa-1 durante la piroptosis, aumenta la permeabilidad de la membrana a los iones de calcio, que provoca la salida de componentes desde el interior del lisosoma. Sin embargo, la ruptura del lisosoma es un evento tardío después de la activación del inflamasoma NLRP3 en respuesta a los activadores de éste, como el ATP y la nigericina, por ejemplo.

Además de estos activadores, también teníamos a los ácidos grasos saturados, como el ácido palmítico esterificado, que produce la activación del inflamasoma al estar relacionado con la ruptura del lisosoma y la liberación de catepsina B. que continuaría con el proceso de señalización del inflamasoma.

### **5.3.3. Regulación negativa**

La regulación negativa del inflamasoma NLRP3 tras su activación es necesaria para mantener de forma correcta la función del inflamasoma. Uno de estos reguladores es la proteína de la familia TRIM (familia de motivos tripartitos) TRIM30, que posee un dominio RING que ha sido identificado como un regulador negativo de las señales de los TLR, suprimiendo la activación del inflamasoma NLRP3 promovida por varios activadores conocidos, como son el ATP, nigericina, sílice y cristales de urato (Hu y cols., 2010).

Además de TRIM30, encontramos otros reguladores del inflamasoma, como el monóxido de carbono (CO), el cual es capaz de inhibir la generación mitocondrial de ERO y la translocación al citoplasma de ADN mitocondrial en macrófagos, promovido por LPS y ATP.

Otro regulador del inflamasoma es A20, el cual actúa a nivel de NF- $\kappa$ B. Este A20 inhibe la activación del inflamasoma al suprimir la expresión de NLRP3 inducida por LPS.

Además de los reguladores anteriores, el receptor huérfano nuclear SHP (pequeño heterodímero asociado) actúa como regulador negativo uniéndose a NLRP3, donde hace falta que NLRP3 se haya translocado desde la mitocondria hacia el citosol. En los macrófagos deficientes de SHP, la generación de EROs y la translocación de ADN mitocondrial se incrementan significativamente (Yang y cols., 2015).

Otras investigaciones más detalladas de esta regulación negativa son las respectivas a la autofagia (Pedraza-Alva y cols., 2015). Los esfuerzos para identificar nuevos reguladores negativos pueden proporcionar nuevas estrategias para tratar enfermedades inflamatorias agudas y crónicas asociadas con la activación inusual del inflamasoma NLRP3.

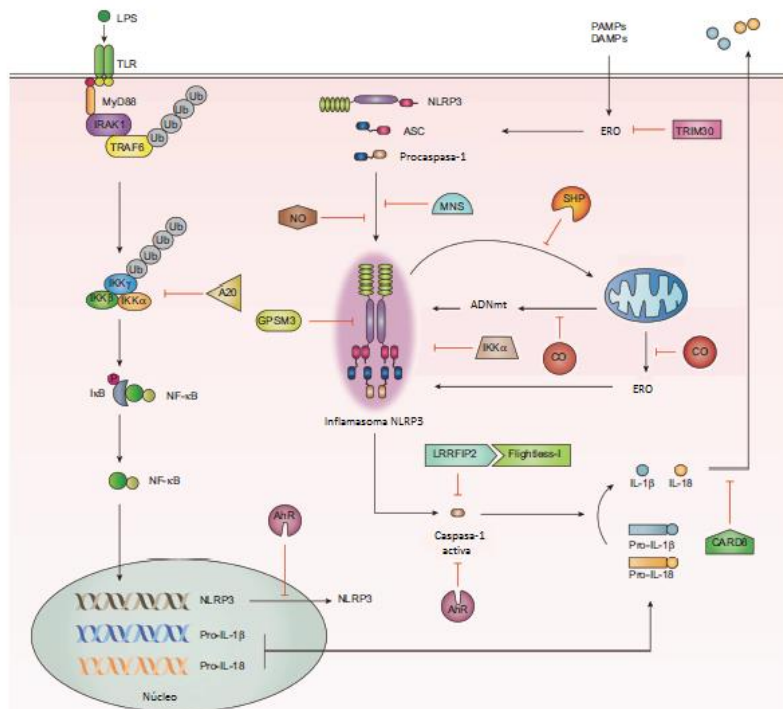


Figura 5. Proceso de regulación negativa en la que participan diferentes subprocesos y moléculas, cuya finalidad sería la de evitar la activación del inflammasoma.

### 5.3.4. Autofagia

La autofagia, proceso catabólico conservado evolutivamente, facilita el reciclaje de proteínas y orgánulos de células dañadas. En el proceso, se produce el englobamiento de estos productos celulares a través de la síntesis de un autofagosoma, que es enviado a los lisosomas para degradarse. Existen evidencias de que una disfunción en este proceso pueda resultar en la aparición de cáncer, alteraciones neurodegenerativas y deterioro de los mecanismos de defensa celulares.

La autofagia regula varios aspectos importantes y relativos al inflammasoma, como son la muerte celular o la secreción de citoquinas por las células inmunitarias, donde podemos apoyarnos en estudios realizados en ratones donde carecían del gen *Atg16<sup>-/-</sup>*, lo cual daba lugar a una sobreproducción de IL-1β e IL-18 en respuesta a la aparición de un DAMP o PAMP (Saitoh y cols., 2008). Esta sobreproducción no es debida al aumento en la transcripción del gen que codifica a proIL-1β, sino que se debe a la intensificación de la activación de la caspasa-1. Este aumento se basa en el fallo de la célula en realizar esta autofagia para eliminar los restos mitocondriales dañados de la célula, lo que se traduce en una producción excesiva de ERO que saldrá al espacio intracelular, acompañado de la salida de ADN mitocondrial, aunque no está claro aún si estos dos procesos están relacionados con el aumento de la producción de IL-1β e IL-18, favoreciendo, para ello, la síntesis del inflammasoma (Nakahira y cols., 2010; Zhou y cols., 2010).

Además, tenemos evidencias de que la maquinaria autofágica regula la producción de IL-1 $\beta$  de manera independiente al inflamasoma mediante los autofagosomas, los cuales secuestran a la proIL-1 $\beta$  que será destinada a su degradación, limitando así el sustrato disponible para la caspasa-1 (Harris y cols., 2011). Todo esto difiere en el ser humano, donde en las células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs en inglés), aparece una inhibición de la autofagia, lo que produce un aumento de la transcripción del ARNm que codifica a proIL-1 $\beta$  en respuesta a los ligandos de los TLR (Crisan y cols., 2011). Por otro lado, hay evidencias de que la autofagia puede regular positivamente la respuesta de la IL-1 $\beta$ . Las células de los mamíferos expulsan una gran cantidad de proteínas por un proceso dependiente del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi.

Otra situación en donde la maquinaria autofágica está involucrada es en la eliminación de inflamasomas de otras células. La autofagia facilita la renovación de proteínas dañadas o agregadas. Como ya sabemos, el inflamasoma interviene en la muerte celular, pero aunque se produzca un proceso inflamatorio, éste no tiene por qué derivar en la muerte de la célula necesariamente. Cuando la célula muere, los inflamasomas y otros componentes celulares salen al espacio extracelular, donde, probablemente, son degradados por proteasas. Sin embargo, cuando esta muerte celular no llega a producirse, estos complejos multiproteicos deben ser retirados para prevenir la excesiva activación de las interleuquinas. Por lo que podemos concluir que la autofagia tiene un papel importante en estos procesos inflamatorios.

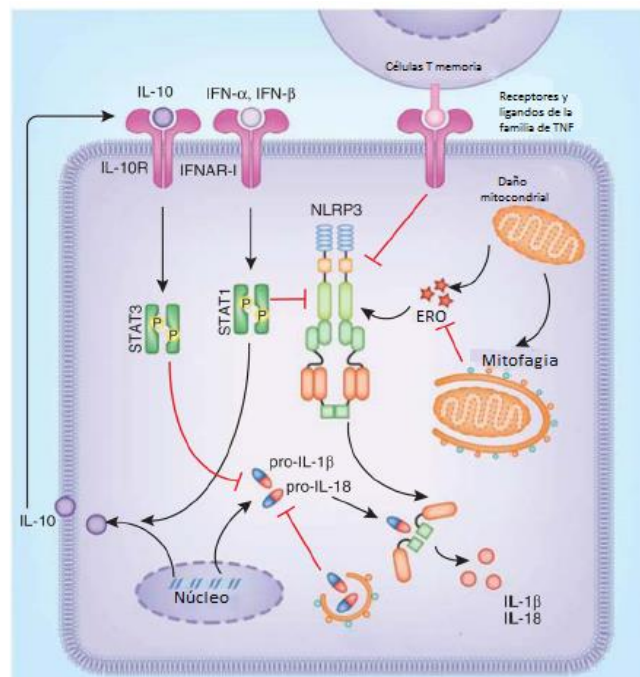


Figura 6. Proceso de autofagia en la célula, donde se representan diferentes interferones y el factor de necrosis tumoral (TNF) y otras estructuras.

#### **5.4. Enfermedades relacionadas**

Los inflamasomas participan en la generación de la respuesta inflamatoria. Esta respuesta inflamatoria no se deriva solo en el hecho de dar lugar a una muerte celular no programada por piroptosis, sino que deriva también en la consecución de diferentes procesos patológicos potencialmente mortales y crónicos como es la enfermedad de Alzheimer, la aterosclerosis y la diabetes mellitus tipo II. El papel de los inflamasomas en estas enfermedades podría ser clave o al menos crucial para el desarrollo de algunas de estas enfermedades, teniendo también en cuenta otros factores que den lugar a estas enfermedades, como la edad, la dieta, la obesidad o la descendencia genética entre otros, como la inflamación producida por el sistema inmune que puede llegar a crear placas seniles, en el caso concreto de la enfermedad de Alzheimer.

##### **5.4.1. Enfermedad de Alzheimer**

La enfermedad de Alzheimer es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes en el mundo, que afecta a más de 150 millones de personas. Se diagnostica en pacientes a partir de los 65 años, y los primeros síntomas aparecen unos años después. Se caracteriza por ser crónica, progresiva e irreversible en la que se produce una pérdida de memoria, demencia y discapacidad cognitiva (Huang y Mucke, 2012). En esta enfermedad, una de las características más importantes es la inflamación que se produce por la activación de células gliales y la salida de citoquinas proinflamatorias, además del depósito de placas  $\beta$ -amiloides extracelulares, la acumulación de proteína TAU hiperfosforilada y la formación de ovillos neurofibrilares. En esta inflamación participan las interleuquinas  $1\beta$  y 18 tras la activación del inflamasoma y sobre la activación del inflamasoma y cómo poder controlarlo (Huang y Mucke, 2012). Otra característica está relacionada con la fisiología cerebral donde hay una disminución de la masa cerebral en zonas específicas del cerebro, con pérdida de neuronas, pérdida de memoria e indisposición de realizar funciones intelectuales, incluso también trastorno de la personalidad.

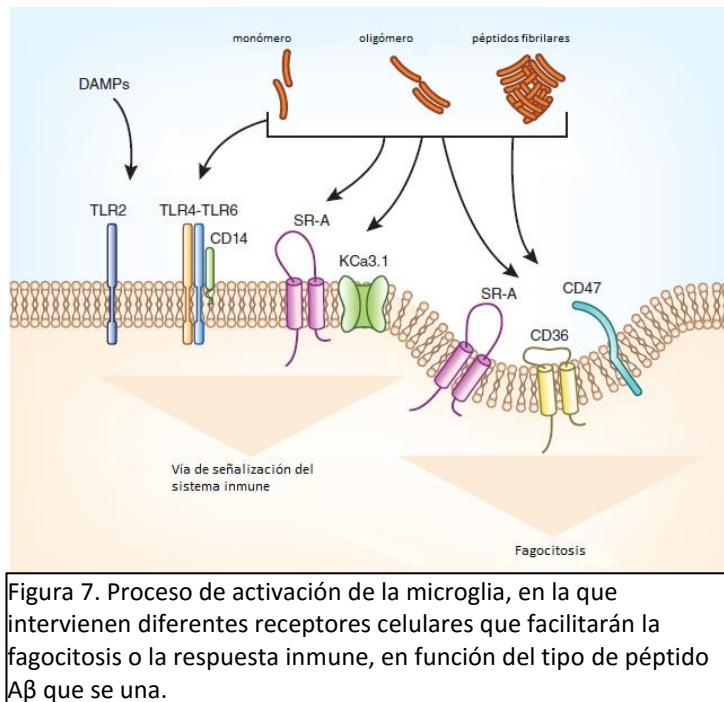
En los primeros años de la enfermedad, lo más común ha sido sugerir que la deposición de péptidos  $\beta$ -amiloides ( $A\beta$ ) marca la primera etapa de la enfermedad. Los péptidos  $A\beta$  se generan continuamente a través de la secuencia de acción de dos proteasas,  $\gamma$ -secretasa y  $\beta$ -secretasa sobre la proteína precursora amiloide (APP en inglés) (Querfurth y cols. 2010).

La concentración tisular de péptido  $A\beta$  parece ser crítica a la hora de mantener la estructura de la proteína, y un aumento de la concentración en el tejido es la causa más probable de mal plegamiento y agregación.



La fase de transición de péptido A $\beta$  monomérico a péptido A $\beta$  oligomérico facilita la formación de especies agregadas y fibrilares que son reconocidas por varios receptores mediadores de la endocitosis y la fagocitosis. Los oligómeros A $\beta$  son considerados la forma más neurotóxica cuando se añade directamente a cultivos neuronales (Walsh y cols., 2002). Esta toxicidad puede estar mediada en parte por citoquinas proinflamatorias derivadas de la microglia activada (conjunto de células gliales que tienen varias funciones en el cerebro, como es la fagocitosis y la inducción de citotoxicidad ante diversos estímulos). El mal plegamiento del péptido A $\beta$  puede representar un patrón molecular por el cual el sistema inmune puede actuar como mediador de la inflamación. La inflamación es uno de los desencadenantes principales de la enfermedad, por lo que el uso de fármacos antiinflamatorios como los AINE (antiinflamatorio no esteroideo) disminuye el riesgo de desarrollar la enfermedad, pero no quiere decir que sean fármacos profilácticos ni que se usen como tratamiento.

Los depósitos de péptido A $\beta$  del cerebro, contribuyen a la disminución de la memoria y a la activación de la microglia, que solo se activa por la deposición de estos péptidos y forman un complejo que genera un aumento de la expresión de receptores inmunológicos TLR2 y CD36, aumentando la respuesta a la exposición del péptido A $\beta$ . En el proceso de activación de la microglia, se requiere del receptor SR-A y del canal de potasio KCa3.1. Al igual que en la activación provocada por LPS, solo se necesita una pequeña cantidad de péptido A $\beta$  para la activación de la microglia. Una activación crónica de la microglia podría conducir a la desaparición de la microglia y la posterior sustitución a través de la proliferación de más células gliales. El sistema inmune responde a los agentes microbianos con una cascada proteolítica que regula la producción de las citoquinas proinflamatorias, la cual, como hemos visto a lo largo de esta memoria, se realiza, en parte, gracias a la formación del inflamasoma. El inflamasoma más importante en la respuesta que se genera al formarse la agregación de los péptidos A $\beta$  es el inflamasoma NLRP3, que culmina el final de la respuesta del sistema inmune. En estudios realizados en ratones APP/PS1 deficientes de NLRP3 (Lim y cols., 2011), se ha visto que los ratones estaban protegidos de la supresión de la plasticidad sináptica inducida por el péptido A $\beta$  (una medida de la capacidad de las neuronas para modular su respuesta a la estimulación por cambios en la sinapsis). La plasticidad sináptica es particularmente sensible a IL-1 $\beta$ , ya que es capaz de interrumpir la formación de dendritas de la neurona. Con esto se demuestra que la estimulación del sistema inmune en respuesta a los péptidos A $\beta$  perjudica la liquidación de la microglía y los residuos neuronales, al activarse el inflamasoma NLRP3.



#### **5.4.1.1. Disfunción y muerte celular**

El comienzo de la neurodegeneración y los mecanismos moleculares que participan está a la orden del día. Uno de los mecanismos implicados es la activación de la microglia, que puede dar lugar a la disminución de su actividad y al hinchazón de la célula, dándose una menor regulación de las sinapsis neuronales durante la respuesta inflamatoria, lo que produce cambios e interrupciones de los circuitos neuronales relacionados. Por tanto, mediadores inflamatorios como las citoquinas, afectan a las funciones neuronales. Pero esto no es lo único que induce la neurodegeneración cerebral. También existen otros factores que pueden destruir las funciones neuronales, como es la fagocitosis directa por parte de las células de la microglia de otras células gliales, denominada fagoptosis, pero esto requiere una estimulación promovida por el péptido Aβ.

#### **5.4.1.2. Patología inducida por la proteína TAU**

La deposición de los péptidos Aβ representa el inicio de los mecanismos que originarán el inicio de la enfermedad pero no es lo único que se genera. También se produce la formación de ovillos neurofibrilares (NFT en inglés), los cuales son proteína TAU hiperfosforilada, que al asociarse forman esos ovillos. Existen evidencias en las que se ve una relación entre la respuesta inflamatoria conducida por la microglia y la formación de los NFT, donde esta relación se ve plasmada en estudios en ratones PS19. En el estudio se vio que la activación de la microglia debe darse en primer lugar y, tras esto, producirse la síntesis de NFT en los ratones. Además, también se observó que en ratones jóvenes, se produce una disminución de

la patología producida por TAU y que la activación de la microglia es necesaria para la formación de NFT (Gorlovoy y cols., 2009), que requiere a su vez la liberación de IL-1 $\beta$ .

#### **5.4.1.3. Aclaramiento de péptidos A $\beta$ por fagocitosis**

La microglia contribuye al aclaramiento del péptido A $\beta$  por la fagocitosis y la degradación del péptido A $\beta$  realizadas por células fagocíticas de la microglia. También aparecen enzimas provenientes de las células gliales que liberan enzimas capaces de degradar este péptido A $\beta$ . La función de aclaramiento de la microglia puede verse afectada si hay una degeneración del locus coeruleus (LC) (Heneka y cols., 2010). La degeneración de este LC da lugar al aumento de la respuesta inflamatoria produciéndose la deposición de los péptidos A $\beta$ , debido a un descenso en los niveles de norepinefrina, basándonos en estudios realizados en ratones (Hoshino y cols., 2011).

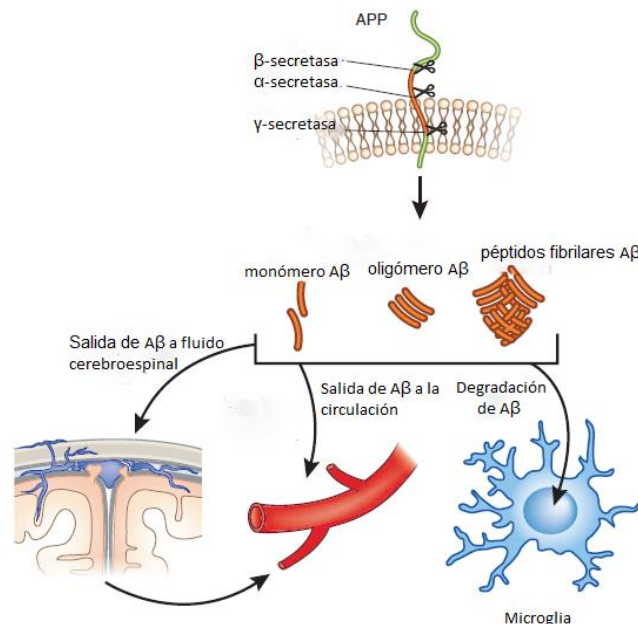


Figura 8. Aclaramiento de los péptidos A $\beta$ , mediado por la microglia y las diferentes enzimas secretasas que se encuentran en ella.

#### **5.4.1.4. Terapias enfocadas en la microglia**

Tras ver que una disminución del aclaramiento de la microglia puede ser un factor que estimule la aparición de alguna enfermedad, se han desarrollado varias estrategias contra este factor, incluyendo las farmacológicas, la terapia génica y las basadas en vacunas.

Una de las moléculas usadas como terapia farmacológica es la galantamina, una molécula que aumenta la captación del péptido A $\beta$  por parte de la microglia, ya que es una de las funciones de esta. La galantamina actúa como agonista de un receptor nuclear (PPAR- $\gamma$ ), que incrementa la eliminación de péptido A $\beta$  de la microglia, y puede ser que también de los astrocitos. Un

mecanismo relacionado con este proceso sería un incremento de la expresión del receptor CD36 (Takata y cols., 2010).

Otras de las moléculas que hacen frente a la microglia son los AINE, los cuales han sido probados como reductores del riesgo de padecer la enfermedad y que actúan sobre un receptor hormonal del núcleo, el PPAR- $\gamma$ .

Otras moléculas que participan en la retirada de los péptidos A $\beta$  es la enzima que degrada insulina (IDE en inglés), enzima que ha demostrado ser capaz de prevenir la deposición de placas de péptido A $\beta$ , ya que son capaces de dismantelar las estructuras extracelulares que forman estos péptidos A $\beta$  siguiendo estudios en ratones transgénicos, donde nos centramos en la expresión de APP (Leissring y cols., 2003). Además de IDE, existen otras moléculas que también retiran péptidos A $\beta$ , en este caso porque aumentan la secreción de IDE a través de exosomas.

#### **5.4.2. Diabetes mellitus tipo II**

Es una de las enfermedades más comunes de nuestra sociedad que consiste en la resistencia de los tejidos a la insulina, que es la hormona que regula la concentración de glucosa en sangre, además del glucagón. La insulina reduce la concentración de glucosa en sangre, haciendo que los tejidos la reciban e incorporen al interior de las células que los forman y el glucagón hace que aumente la concentración de glucosa en sangre.

Esta enfermedad da lugar a un aumento de TNF (factor de necrosis tumoral), interleuquinas, y unas proteínas llamadas adipoquinas que son secretadas por el tejido adiposo, y que forma parte de la regulación de las grasas y su movilización, además de estar relacionada también con la insulina. Una desregulación de estas adipoquinas podría dar lugar a una insuficiencia funcional de las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas y dar lugar a la diabetes tipo II.

Al igual que pasa en la aterosclerosis, es la IL-1 $\beta$  la que más influencia tiene sobre la génesis de la diabetes, ya que es capaz de promocionar la resistencia a la insulina e inducir la discapacidad y la apoptosis de las células  $\beta$  del páncreas. La IL-1 $\beta$  amortigua la sensibilidad a la insulina induciendo la fosforilación del receptor de insulina sustrato 1 (RIS-1) que da lugar a la ruptura de la señalización de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) en las células que posean receptores de insulina. Esta ruptura puede provocar que se inhiba la secreción de la insulina promovida por la concentración de glucosa en sangre (Hotamisligil y cols., 1993).

Al mismo tiempo que se produce esto, la IL-1 $\beta$  induce la expresión de TNF- $\alpha$ , el cual puede perjudicar la señalización de la insulina. Estos dos procesos juntos elevan la aparición de ácidos grasos libres en sangre debido al desequilibrio del metabolismo lipídico. Con ello, la IL-1 $\beta$  induce sustancias estresantes para el organismo, como ERO, los cuales inducen procesos de inflamación y pérdida de células  $\beta$  (Legrand-Poels y cols., 2014).

Varios ensayos clínicos nos dan a entender que podrían existir antagonistas de las interleuquinas (IL-1RA o anti IL-1 $\beta$ ), que mejorarían la neutralización de anticuerpos que van a controlar los niveles de glucosa y la función de las células  $\beta$  del páncreas. Los datos de este estudio revelan que la fatiga de estos pacientes se ve reducida, pero que hacen falta un mayor número de personas que realizan más ensayos clínicos para corroborar que el bloqueo de la IL-1 $\beta$  realmente mejora el tratamiento de la enfermedad.

En varios estudios se ha demostrado que una elevación de la concentración de NLRP3 contribuye a una peor sensibilidad a la insulina por parte de los tejidos. Por el contrario, una deficiencia de NLRP3, ASC o caspasa-1 contribuyen a una mejor sensibilidad a la insulina para que esta sea capaz de unirse a los tejidos y que puedan obtener la glucosa de la sangre. Y esto, claro está, da lugar a una menor producción de citoquinas que podrían dar lugar a la activación de PI3K y que la función de la insulina fuera la correcta.

En cuanto al papel del inflamasoma NLRP3 en la enfermedad, vamos a comenzar estableciendo algunas ideas relevantes y contrastadas sobre otros factores que hacen que la enfermedad se desarrolle. Este factor sería la producción de una hormona llamada amilina (IAPP polipéptido amiloide de los islotes), la cual es segregada por las células  $\beta$  del páncreas junto con la insulina. El receptor CD36, además de reconocer a los cristales de colesterol, también reconoce a este IAPP y facilita la conversión a péptido amiloide, partiendo de una forma soluble en el citosol. Este IAPP es un activador del inflamasoma debido a que induce la desestabilización del lisosoma, como lo hacía la catepsina B liberada por el propio lisosoma que dará lugar a la activación de la caspasa-1 y la liberación de IL-1 $\beta$  por parte de los macrófagos (Sheedy y cols., 2013).

En un estudio realizado con ratones transgénicos, los cuales tienen IAPP humana sobreexpresada, los macrófagos del páncreas muestran una alta expresión de la IL-1 $\beta$  debido a que se ha producido una activación del inflamasoma mediado por una sustancia: la proteína que interactúa con tioredoxina (TXNIP en inglés). La glucosa puede regular la expresión de esta proteína aumentando su producción por los islotes de Langerhans, además de que aumenta

también la producción de ERO debido al estrés oxidativo que ocurre en la diabetes tipo II, debido a un cambio conformacional en esta proteína, que daría lugar a la activación del inflammasoma NLRP3 al unirse a él. Estos datos no son reproducibles en otros grupos de investigación, donde se trabaje con macrófagos con deficiencia de TXNIP.

Finalmente, encontramos que hay otros activadores de inflammasomas, como son los ácidos grasos saturados como los palmitatos y las ceramidas. En macrófagos de ratón se ha visto que el palmitato inhibe a la enzima AMPK, produciéndose un defecto de la autofagia de las mitocondrias, liberándose ERO y activando al inflammasoma.

La ceramida activa también al inflammasoma, mediante la activación dependiente de caspasa-1 de macrófagos derivados de médula ósea y tejido adiposo de estos (estudio realizado en ratones en laboratorio). Curiosamente, la sustitución de ácidos grasos saturados por ácidos monoinsaturados aumenta la sensibilidad a insulina y reducen la producción de IL-1 $\beta$ .

Tenemos también ácidos grasos poliinsaturados que inhiben la activación del inflammasoma NLRP3 (ácidos  $\omega$ -3), debido a que estos son capaces de señalar a una proteína llamada arrestina que está unida a una proteína G y evita la activación del inflammasoma. Además, estos ácidos grasos monoinsaturados previenen la resistencia de los tejidos a la insulina, lo que da a entender que estos ácidos  $\omega$ -3 mejoran el desarrollo del tratamiento de la enfermedad.

### **5.4.3. Aterosclerosis**

La aterosclerosis es una enfermedad que se caracteriza por el estrechamiento de los vasos arteriales debido a diversos factores tales como la obesidad, el exceso de colesterol (hipercolesterolemia), la edad o factores genéticos entre otros. La enfermedad progresa a través de los vasos arteriales promovido por la acumulación de depósitos de colesterol en las ramificaciones de estos vasos (Weber y cols., 2011).

Los macrófagos también participan en la progresión de esta enfermedad, ya que llegan a transformarse en "células espumosas" al englobar grandes cantidades de colesterol y almacenarlos en forma de gotas de colesterol en su interior, dando lugar a una posible ruptura de estas células, continuando con una salida extracelular de este colesterol y haciendo que se recluten más células del sistema inmune. La lesión estará formada por células muertas, alta concentración de colesterol y una capa fibrótica producida por las células del sistema inmune

que intentan englobar al macrófago lisado, pudiéndose dar lugar así a la formación de un trombo que podría obstruir la arteria y producir daños cardíacos y tisulares.

Este colesterol se transporta en forma de LDL, un tipo de lipoproteína con alto contenido en colesterol. Estas LDL son reconocidas por receptores LDL celulares que necesitan este colesterol para llevar a cabo sus funciones, además de usarlo para elaborar estructuras celulares. Hay otro tipo de lipoproteínas que intentan "limpiar" de colesterol los vasos sanguíneos, como las apolipoproteínas E (APOE) (Tan y cols., 2010). Una mutación de los genes que desencadenarán la producción de estas APOE, se ha visto que podrían mutar en humanos y realizando estudios en ratones se comprobó que la enfermedad con esta mutación podría agravarse. Teniendo esto en cuenta y la participación de las células del sistema inmune las cuales pueden formar inflamomas y producir interleuquinas tipo I, vamos a ver la actuación de estos en la enfermedad. Estudios en ratones han demostrado que usando antagonistas del receptor de IL-1 se reduce la aterosclerosis.

La formación de autofagosomas (vesículas con una doble membrana que engloban orgánulos dañados o componentes patógenos intracelulares, y que posteriormente se fusionan con lisosomas para reciclar esos orgánulos o para evitar una infección respectivamente) que hayan sufrido una modificación genética, podría desencadenar una mayor producción de IL-1 $\beta$ .

Este estudio podría dar a entender que la formación de los fagosomas podría servir como autoprotección del organismo para evitar la acumulación de colesterol en las arterias y la formación de células espumosas y la posterior síntesis del inflamoma. También podría indicarse que estos fagosomas podrían también reducir la producción del inflamoma, evitando la generación de factores desencadenantes, como ERO o la desestabilización lisosomal que dé lugar a la activación de la caspasa y con ello se promueva la salida de IL-1 $\beta$ .

Además de los factores conocidos como ATP, cardiolipina o flujo de potasio extracelular, pueden haber genes que funcionen como reguladores transcripcionales, como es el caso de NFE-2, que aparece como respuesta al aumento de estrés oxidativo producido, por ejemplo, por la salida de ERO de las mitocondrias. Este regulador podría intervenir en la producción del inflamoma NLRP3 y encontrarse en los compartimentos nucleares y citosólico. Este factor estará promovido por la aparición de una señal generada por LPS. Este factor NRF-2 también estaría promovido por la concentración de cristales de colesterol. Todas estas posibilidades de activación del factor y su correlación con la activación de la cadena necesaria para la

producción del inflamasoma NLRP3 deben seguir investigándose en el laboratorio, usando para ello la experimentación animal (Ma, 2013).

Otra información que nos da este estudio es que los macrófagos están involucrados en la "síntesis de novo" de cristales de colesterol utilizando la LDL-oxidada. Con esto, se sugiere que las células de la inmunidad innata no solo montan respuestas inflamatorias contra el colesterol formado, sino que también podría participar en su acumulación en las arterias.

Varios estudios nos hablan sobre cómo esta LDL-oxidada está relacionado con la formación de colesterol intracelular, siendo reconocida esta enzima por el receptor CD36 extracelular (Sheedy y cols., 2013). El proceso de formación sería el siguiente:

El receptor CD36 se combina con un TLR (Toll Like Receptor), dándose lugar a la primera señal de activación del inflamasoma y generándose con ello la activación de NF- $\kappa$ B. En estudios realizados en ratones esterilizados, se ha llegado a la conclusión de que tener una infección bacteriana no tiene por qué dar lugar a la generación de la aterosclerosis ni tampoco se dé lugar a una activación del inflamasoma NLRP3. Lo que sí aparece es que los cristales de colesterol por sí solos pueden iniciar el proceso de síntesis del inflamasoma NLRP3. Con respecto a la infección bacteriana, es posible que algunas puedan agravar la enfermedad, como Chlamydomphila pneumoniae. En lo que respecta a los macrófagos, se desconoce si estos responden exclusivamente a los cristales de colesterol nuevos formados en el interior de la célula o si también responden a los cristales ya formados.

Con esto, debemos plantearnos en no sólo tratar esta enfermedad a través de los factores ya conocidos, sino también desde el punto de vista de la activación de los macrófagos partir de los cristales de colesterol.

Otros estudios sugieren que tras el conocimiento de que los cristales de colesterol intervienen directamente en el inicio del proceso de formación del inflamasoma NLRP3, las interleuquinas secretadas posteriormente a la formación del inflamasoma también influirán en esta patología, teniendo una mayor importancia la IL-18 sobre la IL-1 $\beta$ . Como sabemos, la IL-1 $\beta$  se produce tras la activación de la caspasa-1, pero la IL-18 no se conoce muy bien su mecanismo de secreción. Una hipótesis podría ser que la propia IL-1 $\beta$  que se forma medie en la producción de la IL-18, dándose posteriormente una salida extracelular de ambas. Por tanto, se da por descontado que se requiere la activación del inflamasoma. Otra hipótesis podría ser que la liberación de la IL-18 puede ocurrir de manera independiente a la formación del inflamasoma,



que requiere de un flujo intracelular de calcio y de una serie de proteasas denominadas "calpain-like" (Freigang y cols., 2013).

También puede haber un aumento de IL-18 en respuesta a altos niveles de ácidos grasos insaturados que se encuentran en el ateroma. Estos estudios sugieren que estos ácidos grasos desencadenan el desacoplamiento de la mitocondria y la salida de calcio intracelular, todo ello a través de las proteasas calpain. Hay diversos estudios que trabajan sobre esto y cómo puede haber una movilización de calcio y este desacoplamiento de la mitocondria.

Es indudable que los componentes genéticos son los que están detrás de la generación de la enfermedad. Sin embargo estos participan en una parte de esta progresión de la enfermedad, siendo responsable de otra parte de la progresión de la enfermedad las IL-1 $\beta$  y las IL-18.

Las divergencias que se pueden plantear en cuanto a cuál es el responsable residen en el propio estudio, teniendo en cuenta factores como la dieta, la raza de los ratones y la duración del estudio. En estos ratones se ha visto que los cristales de colesterol dan lugar a la activación del mecanismo de síntesis del inflamasoma NLRP3 que da lugar a la producción de las interleuquinas.

Sin embargo, en humanos, esto no ocurre así, ya que hay un mayor aumento de IL-1 $\beta$  en lugar de IL-18. Es más, muchos de los pacientes a los que hay que tratar, puede que ya tengan placas de ateroma formadas, por lo que el tratamiento va a ir enfocado a múltiples factores que habrá que controlar como la dieta, el ejercicio y la medicación que baje los niveles de colesterol, sin olvidarnos de los inmunosupresores que ya tome el paciente o vaya a tomar.

También hay otros estudios que evalúan los perfiles de citoquinas humanas que causan las lesiones ateroscleróticas, para ver cuál de las dos interleuquinas de la familia IL-1 es usada como mejor diana para desarrollar un tratamiento eficaz. Quizás el receptor extracelular CD36 pueda ser un comienzo en la lucha para combatir contra los cristales de colesterol formados que forman la placa aterosclerótica y que además podría expandirse. Con ello, debemos buscar un descenso de los niveles de colesterol y de ácidos grasos, además de un control de las respuestas inflamatorias, los cuales pueden activar la respuesta inflamatoria.

## **7. Anexo: Interferón tipo 1**

La respuesta desarrollada por el sistema inmune cuando tiene lugar un proceso de infección, incluye, entre otros procesos, la liberación de citoquinas como el interferón tipo 1 (IFN1).

Algunos estimuladores celulares, como activadores de receptores TLR y la propia IL-1 $\beta$  activan la transcripción de genes que codifican a la IL-1 $\beta$ . Tenemos otros casos, donde hay una relación entre los inflamasomas y las citoquinas, como ocurre con el inflamasoma AIM2 y el IFN1, en los que es necesario esta relación para promover la activación del inflamasoma NLRP3. Apoyándonos en algunos estudios sobre esta relación AIM2-IFN1 y una presumible infección causada por Francisella tularensis, en macrófagos deficientes en la transcripción del factor IRF3, que da lugar a un defecto en la secreción de IFN1 o macrófagos deficientes en el receptor interferón alfa y beta, que hacen que sean incapaces de responder a la presencia de IFN1, da lugar a una menor activación del inflamasoma AIM2 (Fernandes-Alnemri y cols., 2010; Jones y cols., 2010; Henry y cols., 2007). Aunque ocurran estos déficits, la cantidad de AIM2 en la célula no se verá afectada por esto, pero se ha visto que al producirse la lisis de Francisella tularensis, da lugar a la generación de ADN citosólico que activa al inflamasoma AIM2.

IFN1 también puede actuar como antagonista de alguno de estos procesos, dando lugar a una restricción de la producción de IL-1 $\beta$  por dos mecanismos, dependiendo del tipo de célula: disminuyendo la cantidad de proIL-1 $\beta$  y/o inhibiendo la activación de la caspasa-1 (Guarda y cols., 2011). El primer mecanismo se consigue dependiendo de la habilidad de IFN1 de activar a IL-10, que da lugar a la inhibición de la síntesis de IL-1 $\beta$ , mediante la vía STAT3. La inhibición de la activación de la caspasa-1 depende de la activación de la vía STAT1, donde el bloqueo afectaría principalmente a los inflamasomas NLRP3 y NLRP1, lo que da lugar a una disminución de la activación del inflamasoma NLRP3 en monocitos de pacientes con esclerosis múltiple que estaban tratándose con IFN- $\beta$ .

## **7. Conclusión**

El proceso inflamatorio celular es uno de los campos de investigación que más interés suscitan en la comunidad científica, debido a las enfermedades que se inician a causa de esto y al alto porcentaje de población de cierta edad a las que afectan estas enfermedades.

Las enfermedades inflamatorias en su mayor parte son crónicas y no agudas, por lo que el interés de los investigadores alrededor de ellas debe seguir en aumento, obteniéndose información sobre ellas y sobre cómo afrontarlas.

En cuanto a la investigación en sí del proceso inflamatorio, debemos seguir en la línea de investigación donde el inflamasoma es el protagonista, más concretamente el inflamasoma NLRP3. Debemos averiguar cómo controlarlos a través de fármacos que puedan ser administrados a la mayor parte de la población, que sea económico, que las señales que conocemos son las únicas que producen su activación, dar respuesta a cómo los microorganismos evitan al sistema inmune o cómo otras sustancias aumentan la actividad de

este sistema inmune, dando lugar a una mayor síntesis de citoquinas proinflamatorias. En definitiva, conocer más a fondo el mecanismo de activación del inflamasoma y, sobre todo, seguir en la investigación de la regulación negativa del inflamasoma, para evitar así su activación y las consecuencias que ello supone.

La investigación sobre el procesos inflamatorio va por buen camino, pero siempre habrá algo nuevo por descubrir, y que nos hará encarar con mayor fuerza la meta hacia una hipotética panacea.

## **8. Bibliografía**

1. Broz P, von Moltke J, Jones JW, Vance RE & Monack DM. Differential requirement for caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe*. 2010; 8:471–483.
2. Crisan TO, et al. Inflammasome-independent modulation of cytokine response by autophagy in human cells. *PLoS ONE*. 2011; 6:e18666.
3. Dostert C, Pe´ trilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT & Tschopp J. Innate immune activation through NALP3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*. 2008; 320: 674–677.
4. Fernandes-Alnemri T, et al. The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. *Nat. Immunol*. 2010; 11, 385–393.
5. Freigang S, Ampenberger F, Weiss A, Kanneganti TD, Iwakura Y, Hersberger M & Kopf M. Fatty acid-induced mitochondrial uncoupling elicits inflammasome-independent IL-1 $\alpha$  and sterile vascular inflammation in atherosclerosis. *Nat. Immunol*. 2013; 14, 1045–1053.
6. Fullard N, & O’Reilly S. Role of innate immune system in systemic sclerosis. *Semin. Immunopathol*. 2015; 37, 511–517.
7. Gorlovoy P, Larionov S, Pham TTH & Neumann H. Accumulation of tau induced in neurites by microglial proinflammatory mediators. *FASEB J*. 2009; 23, 2502–2513.
8. Guarda G, et al. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity*. 2011; 34:213–223.
9. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ & Golenbock DT. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat. Immunol*. 2008; 9:857–865.
10. Harris J, et al. Autophagy controls IL-1 $\beta$  secretion by targeting pro-IL-1 $\beta$  for degradation. *J. Biol. Chem*. 2011; 286:9587.

11. Heneka MT, et al. Locus ceruleus controls Alzheimer's disease pathology by modulating microglial functions through norepinephrine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107, 6058–6063.
12. Henry T, Brotcke A, Weiss DS, Thompson L J & Monack DM. Type I interferon signaling is required for activation of the inflammasome during *Francisella* infection. *J. Exp. Med.* 2007; 204:987.
13. Hoshino T, et al. Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by expression of heat shock protein 70 in mice. *J. Neurosci.* 2011; 31, 5225–5234.
14. Hotamisligil GS, Shargill NS, & Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993; 259, 87–91.
15. Hu Y, et al. Tripartite-motif protein 30 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation by modulating reactive oxygen species production. *J. Immunol.* 2010; 185:7699.
16. Huang Y & Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell.* 2012; 148:1204–1222.
17. Inoue M & Shinohara ML. NLRP3 Inflammasome and MS/EAE. *Autoimmune Dis.* 2013, 859145.
18. Jones JW, et al. Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of *Francisella tularensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107:9771–9776.
19. Juliana C, et al. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J. Biol. Chem.* 2012; 287, 36617–36622.
20. Kajiwara Y, et al. A critical role for human caspase-4 in endotoxin sensitivity. *J. Immunol.* 2014; 193, 335–343.
21. Kayagaki N, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature.* 2011; 479:117–121.
22. Keller M, Ruegg A, Werner S & Beer HD. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell.* 2008; 132:818–831.
23. Kofoed EM & Vance RE. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature.* 2011; 477, 592–595.
24. Lamkanfi M. Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11:213–220.
25. Legrand-Poels S, et al. Free fatty acids as modulators of the NLRP3 inflammasome in obesity/type 2 diabetes. *Biochem. Pharmacol.* 2014; 92, 131–141.
26. Leissring MA, et al. Enhanced proteolysis of  $\beta$ -amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron.* 2003; 40, 1087–1093.

27. Lim JE, et al. MyD88 deficiency ameliorates b-amyloidosis in an animal model of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 2011; 179, 1095–1103.
28. Liu D, Wen Y, Tang TT, Lv LL, Tang RN & Liu H. Megalin/cubulinlysosome-mediated albumin reabsorption is involved in the tubular cell activation of NLRP3 inflammasome and tubulointerstitial inflammation. *J. Biol. Chem.* 2015; 290: 18018–18028.
29. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2013; 53, 401–426.
30. Martinon F, Mayor A & Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* 2009; 27:229–65.
31. Martinon F, Pe' trilli V, Mayor A, Tardivel A & Tschopp J. Gout associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature.* 2006; 440, 237–241.
32. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P & Janeway CA. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997; 388(6640):394–7.
33. Meunier E, et al. Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. *Nature.* 2014; 509:366–370.
34. Mortensen ES, Fenton KA & Rekvig OP. Lupus nephritis: the central role of nucleosomes revealed. *Am. J. Pathol.* 2008 Feb; 172(2):275–83.
35. Nakahira K, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* 2010; 2:222–230.
36. Pedraza-Alva G, Perez-Martinez L, Valdez-Hernandez L, Meza-Sosa KF & Ando-Kuri M. Negative regulation of the inflammasome: keeping inflammation under control. *Immunol. Rev.* 2015; 265: 231–257.
37. Perregaux D & Gabel CA. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 15195–15203.
38. Pilla DM, et al. Guanylate binding proteins promote caspase-11-dependent pyroptosis in response to cytoplasmic LPS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2014; 111:6046–6051.
39. Poyet JL, Srinivasula SM, Tnani M, Razmara M, Fernandes-Alnemri T & Alnemri ES. Identification of IPAF, a human caspase-1-activating protein related to APAF-1. *J. Biol. Chem.* 2001; 276, 28309–28313.
40. Qu Y, et al. Phosphorylation of NLRC4 is critical for inflammasome activation. *Nature.* 2012; 490:539–542.
41. Querfurth HW & LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 2010; 362, 329–344.

42. Rathinam VA, et al. TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by Gram-negative bacteria. *Cell*. 2012; 150:606–619.
43. Rayamajhi M, Zak DE, Chavarria-Smith J, Vance RE & Miao EA. Cutting edge: mouse NAIP1 detects the type III secretion system needle protein. *J. Immunol.* 2013; 191, 3986–3989.
44. Romberg N, et al. Mutation of NLRC4 causes a syndrome of enterocolitis and autoinflammation. *Nat. Genet.* 2014; 46, 1135–1139.
45. Saitoh T, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production. *Nature*. 2008; 456:264–268.
46. Schroder K & Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010; 140, 821–832.
47. Sheedy FJ, et al. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat. Immunol.* 2013; 14, 812–820.
48. Shi J, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature*. 2014.
49. Suschak JJ, et al. Identification of AIM2 as a sensor for DNA Vaccines. *J. Immunol.* 2014; 194, 630–636.
50. Takata K, et al. Galantamine-induced amyloid- $\beta$  clearance mediated via stimulation of microglial nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* 2010; 285, 40180–40191.
51. Takeda K & Akira S. Toll-like receptors. *Curr. Protoc. Immunol.* 2007 May; Chapter 14: Unit 14.12.
52. Tan HW, et al. IL-18 overexpression promotes vascular inflammation and remodeling in a rat model of metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. 2010; 208, 350–357.
53. Tentorey JL, et al. Molecular basis for specific recognition of bacterial ligands by NAIP/NLRC4 inflammasomes. *Molecular cell*. 2014; 54:17–29.
54. Ting JPY, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis BK, Flavell RA, Girardin SE, Godzik A & Harton JA. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity*. 2008; 28, 285–287.
55. Unterholzner L, et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat. Immunol.* 2010; 11:997–1004.
56. Walsh DM, et al. Naturally secreted oligomers of amyloid- $\beta$  protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*. 2002; 416, 535–539.
57. Weber C & Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat. Med.* 2011; 17, 1410–1422.

58. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L & Huang MT. Fatty acid induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat. Immunol.* 2011; 12: 408–415.
59. Yang CS, Kim JJ, Kim TS, Lee PY, Kim SY & Lee HM. Small heterodimer partner interacts with NLRP3 and negatively regulates activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat. Commun.* 2015; 6:6115.
60. Yang J, Zhao Y, Shi J & Shao F. Human NAIP and mouse NAIP1 recognize bacterial type III secretion needle protein for inflammasome activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013; 110, 14408–14413.
61. Zhao Y, et al. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature.* 2011; 477, 596–600.
62. Zhong Z, Zhai Y, Liang S, Mori Y, Han R & Sutterwala FS. TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nat. Commun.* 2013; 4: 1611.
63. Zhou R, Yazdi AS, Menu P & Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature.* 2010; 469:221–225.