



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

IMPLICACIÓN DE NOX EN LA ACTIVACIÓN
DEL INFLAMASOMA NLRP3 A TRAVÉS DE ERO
EN NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A

LAURA GABRIELA GUTIÉRREZ CHÁVEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE



(CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2018)



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno
Gutiérrez
Chávez
Laura Gabriela
0445591112414
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
311106802
2. Datos del tutor
Dr.
Julio Eduardo Roque
Morán
Andrade
3. Datos del sinodal 1
M.C.
Diego Rolando
Hernández
Espinosa
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Tatiana
Fiordelisio
Coll
5. Datos del sinodal 3
Dra.
María Soledad
Funes
Argüello
6. Datos del sinodal 4
Dra.
Mina
Konigsberg
Fainstein
7. Datos del trabajo escrito
Implicación de NOX en la activación del inflammasoma NLRP3 a través de ERO en neuronas granulares de cerebelo
65 p
2018

Con o sin lentes nunca he alcanzado sino vislumbres, aproximaciones, balbuceos en busca de sentido en la delgada zona que se extiende entre la luz y las tinieblas.

[...]

Uno, me aventuro, es los libros que ha leído, la pintura que ha visto, la música escuchada y olvidada, las calles recorridas. Uno es su niñez, su familia, unos cuantos amigos, algunos amores, bastantes fastidios. Uno es una suma mermada por infinitas restas.

Sergio Pitol en 'El arte de la fuga' (1996).

No existe nada definitivo, ni en la ciencia más alta ni en leyes de ninguna especie; pertenecemos a un sin principio ni fin que borra toda clasificación, toda identificación. Somos una partícula sin nombre que evolucionamos siempre sin fin.

Manifiesto Nahui Olin (Carmen Mondragón), 1927.

Esta tesis se realizó bajo la tutoría del Dr. Julio Morán Andrade y asesoría del M.C. Diego Rolando Hernández Espinosa en el laboratorio BL-302 del departamento de Neuropatología Molecular en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, y con financiamiento de DGAPA-PAPIIT de la UNAM (IN210716).

El presente trabajo contó con el apoyo técnico de la M. en C. Guadalupe Domínguez Macouzet.

Además, contó con las valiosas correcciones y aportaciones de los miembros del jurado: la Dra. Tatiana Fiordelisis Coll, la Dra. Soledad Funes Argüello y la Dra. Mina Königsberg Feinstein.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por acogerme en la Facultad de Ciencias y ser hogar durante mi formación como bióloga y más importante, como ciudadana mexicana.

Al Dr. Julio Morán Andrade por confiar en mí y abrirme las puertas del laboratorio para formar parte de su equipo de investigación; por las enseñanzas y risas que siempre tendré presente.

Al M.C. Diego Rolando Hernández Espinosa por el apoyo y tiempo en asesorarme siempre con paciencia, comprensión y decisión en este proyecto, pero sobre todo por su amistad.

A todos los integrantes del laboratorio BL-302 que llegué a conocer durante mi estancia; por dejarme aprender tanto de cada uno, por grandes momentos e innumerables carcajadas, su apoyo y consejos siempre útiles. Los quiero.

Especialmente agradezco a mi amada familia: Lauris y Gagubi, mis padres, por brindarme la maravillosa oportunidad de elegir mi camino y estar al pendiente para no rendirme, y cuyo amor incondicional me mantiene siempre fuerte y en pie. Y Braulio, mi hermano menor, por quien me esfuerzo para ser un buen ejemplo. Gracias por hacerme tan feliz.

A todas mis tías y tíos, por ser como mis segundos padres; me siento muy afortunada de tenerlos.

A mis abuelitos. Ángel por siempre estar al pendiente con esa linda sonrisa. Y Cata, porque sé que estás, aunque no te vea.

También, a todas las personas que de alguna u otra forma han estado a lo largo de este camino compartiendo momentos en los que me divertí y aprendí; y sobre todo a los amigos que aún siguen ahí. Y especialmente, agradezco a mis amigas Yatziry, Cindie y Lumi por las vivencias, por escuchar y apoyarme de muchas maneras, así como compartir ideas y convicciones.

Finalmente, a mi país, México; con la esperanza de poner en alto su nombre, y que las difíciles condiciones de violencia e inequidad de género terminen.

Abreviaciones

AEBSF	Fluoruro 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonilo (4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride)
Apo	Apocinina
ATP	Adenosin trifosfato
dHEt	Dihidroetidio
DIV	Días <i>in vitro</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPI	Cloruro de difenil iodonio (Dhiphenyleneiodonium chloride)
DPN	Días posnatales
ERO	Especies reactivas de oxígeno
EUK	EUK 134
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
IL-18	Interleucina 1 beta
IL-1 β	Interleucina 18
LPS	Lipopolisacárido
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazoliumbromide
NGC	Neuronas granulares de cerebelo
NLRP3	Receptor tipo Nod con un dominio pirina 3 (Nod-like receptor with a pyrin domain 3)
NOX	NADPH oxidasa
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
SNC	Sistema Nervioso Central
URL	Unidades relativas de luminiscencia
URF	Unidades relativas de florescencia

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	9
2. INTRODUCCIÓN.....	10
2.1 Daño excitotóxico.....	10
2.2 Especies Reactivas de Oxígeno en el Sistema Nervioso Central.....	12
2.3 NADPH Oxidasas en el SNC.....	14
2.4 Respuesta inflamatoria y estrés oxidante.....	18
2.5 Los inflamasomas.....	20
2.6 El inflamasoma NLRP3.....	23
2.7 El papel de las ERO en la regulación del inflamasoma NLRP3.....	26
3. ANTECEDENTES.....	27
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
5. HIPÓTESIS.....	30
6. OBJETIVOS.....	30
6.1 Objetivo general.....	30
6.2 Objetivos particulares.....	30
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
7.1 Animales.....	31
7.2 Cultivos celulares primarios de neuronas granulares de cerebelo.....	31
7.2.1 Grupos y tratamientos evaluados.....	32
7.3 Obtención de lisados celulares.....	33
7.4 Viabilidad celular.....	33
7.5 Detección de ERO.....	34
7.6 Actividad enzimática.....	34
7.6.1 NADPH Oxidasa.....	35
7.6.2 Caspasa-1.....	35
7.7 Análisis proteico (Western Blot).....	35
7.8 Determinación de las citocinas IL-1 β e IL-18.....	36

7.8.1 Inmunocitoquímica.....	36
7.8.2 ELISA.....	36
7.9 Procesamiento de datos.....	37
8. RESULTADOS.....	38
8.1 Viabilidad celular.....	38
8.2 Evaluación de la producción de ERO por excitotoxicidad.....	39
8.3 Análisis de la actividad de NADPH Oxidasa.....	40
8.4 Presencia del receptor NLRP3.....	42
8.5 Análisis de la actividad del Inflamasoma NLRP3.....	44
8.5.1 Actividad de Caspasa-1.....	44
8.5.2 Perfil de citocinas.....	45
9. DISCUSIÓN.....	48
10. CONCLUSIONES.....	54
11. FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	55
12. BIBLIOGRAFÍA REFERIDA.....	56

1. Resumen

Introducción En enfermedades neurológicas y múltiples afecciones del sistema nervioso la excitotoxicidad juega un papel crítico. Esta condición ocurre por una sobre estimulación de receptores glutamatérgicos, lo que favorece la entrada de cationes (Ca^{2+} y Na^{+}) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) por las NADPH oxidasas (NOX). Se sabe también que la muerte neuronal excitotóxica va aparejada generalmente de una respuesta inflamatoria en función de la activación del sistema inmune local. Por otro lado, se sabe que las ERO regulan algunos mediadores proinflamatorios en varios tipos celulares del sistema inmune. Uno de estos mediadores es el inflamasoma, que desempeñan un papel central en la activación y secreción de interleucinas. En particular, el inflamasoma NLRP3 promueve la maduración de las interleucinas IL-1 β (proinflamatoria) e IL-18 (antiinflamatoria). El proceso de activación y regulación de la respuesta inflamatoria por el inflamasoma en respuesta al daño excitotóxico no se conoce.

Objetivo Caracterizar la participación del inflamasoma NLRP3 y su relación con las ERO producidas por las NOX durante un evento excitotóxico en neuronas granulares de cerebelo.

Estrategia experimental Se trataron cultivos primarios de neuronas granulares cerebelares de ratas Wistar de 7-8 días posnatales (DPN), los cuales se trataron con glutamato (100 μM durante 30 minutos) después de 7 días *in vitro*, en presencia y ausencia de inhibidores de NOX (DPI 200 nM o AEBSF 50 μM). Se evaluó la viabilidad, la producción de ERO, la actividad de NOX y la actividad de caspasa-1 a diferentes tiempos. También se exploraron los patrones proteicos del receptor NLRP3, así como los niveles de IL-1 β e IL-18.

Resultados y conclusiones El daño excitotóxico en NGC ocasiona un incremento en la cantidad de ERO hasta 24h posteriores al tratamiento con glutamato; además, la actividad de NOX mostró un aumento a partir de la primera hora con un máximo a las 12h. Por otro lado, se observó un incremento similar en los niveles del receptor NLRP3, que parecen ser dependientes de la actividad de NOX. También se detectó un incremento significativo en la actividad de caspasa-1 que se redujo marcadamente en presencia de un inhibidor de NOX, así como un incremento de IL-1 β y una reducción de IL-18. Los resultados indican por primera vez la activación del inflamasoma en este modelo y sugieren un mecanismo fino de regulación redox en la activación del inflamasoma NLRP3.

2. Introducción

2.1 Daño excitotóxico

El glutamato es un aminoácido no esencial que funciona como un importante mensajero químico en el sistema nervioso central (SNC). Es el neurotransmisor más abundante y constituye el mayor mediador de las señales excitadoras en el SNC de mamíferos, en donde del 80 al 90% de las sinapsis son glutamatérgicas (Zhou y Danbolt, 2014; Siegel *et al*, 2006).

La síntesis del glutamato se lleva a cabo en las neuronas a partir de la desaminación de la glutamina proveniente de los astrocitos o la transaminación del α -cetoglutarato (metabolito intermediario del ciclo de Krebs). El glutamato una vez sintetizado se almacena y transporta en vesículas sinápticas las cuales después de un estímulo, se fusionan con la membrana presináptica y lo liberan en la hendidura sináptica uniéndose a sus receptores ionotrópicos y metabotrópicos (NMDA, AMPA/Kainato, y la familia mGluR, respectivamente) en la postsinapsis. La activación de los receptores ionotrópicos permite el flujo de iones de Na^{2+} , K^+ y Ca^{2+} al interior de la célula, mientras que la estimulación de los metabotrópicos se asocia a la activación de proteínas G.

En condiciones fisiológicas existe una regulación estricta de las concentraciones extracelulares de glutamato mantenida mayormente por las proteínas transmembranales transportadoras de aminoácidos excitadores (EAAT, *excitatory amino acid transporters*) localizadas principalmente en astrocitos. Estas internalizan el glutamato al citosol donde es convertido por la glutamina sintetasa en glutamina y es captada por la neurona a través de un sistema de transporte específico. En mitocondrias neuronales, la glutamina es metabolizada nuevamente a glutamato por la glutaminasa activada por fosfatos, cumpliendo así con el ciclo glutamina-glutamato (Siegel *et al*, 2006; Purves *et al*, 2012).

Un evento patológico relacionado con la toxicidad producto de una alta concentración de glutamato es el daño excitotóxico, el cual resulta de una estimulación exacerbada de los receptores glutamatérgicos y puede provocar incluso muerte neuronal (Mark *et al*, 2001).

En condiciones basales, la concentración de glutamato extracelular es de aproximadamente $0.6 \mu\text{M}$, mientras que durante la actividad sináptica se eleva hasta 1 mM

por un par de milisegundos. Si este aumento no es controlado por los transportadores, puede ocasionar daños a las neuronas (Escobar y Pimienta, 2003; Clements *et al*, 1992). En ese sentido, la excitotoxicidad puede ser resultado de la liberación excesiva de glutamato en la hendidura sináptica o de la desregulación del sistema de recaptura; no obstante, el efecto en la célula es el mismo, produciéndose un influjo masivo de calcio al interior de la célula provocando, en parte, la despolarización de la membrana mitocondrial y una limitación en sustratos energéticos y ATP. Durante este evento los receptores glutamatérgicos se activan de manera secuencial, comenzando por los receptores tipo AMPA y kainato. Los receptores de tipo NMDA tienen una importancia particular en el daño, ya que son los más permeables a calcio, y son fundamentales para la activación de vías de señalización de daño, a través de sus subunidades, o bien, por medio de la unión de proteínas señalizadoras (Lai *et al*, 2014).

Por otra parte, la toxicidad por glutamato induce una gran producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Aunque clásicamente se considera a la mitocondria como la mayor fuente de producción de ERO, actualmente se conoce que la sobre activación de los receptores glutamatérgicos produce la activación de otras enzimas productoras de ERO (Atlante *et al*, 2001; Rueda *et al*, 2016). Además del estrés oxidante, el daño neuronal por glutamato produce la activación de nucleasas, proteasas y lipasas, así como la desregulación de proteínas implicadas en vías de señalización de supervivencia o vías comprometidas a muerte celular (Doble, 1999; Lai *et al*, 2014) (Figura 1). En cuanto a la muerte neuronal ocasionada por excitotoxicidad, se ha reportado que una parte de las neuronas mueren por necrosis en un curso temporal corto al estímulo glutamatérgico, mientras que otra sufre una muerte ‘tardía’ por apoptosis (Ankarcrona *et al*, 1995).

El daño excitotóxico ha sido ampliamente estudiado, tanto en eventos agudos como la isquemia, el traumatismo encefálico y la neuroinflamación asociada a infecciones virales; así como en la progresión de enfermedades neurodegenerativas tales como Parkinson, Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica (Doble, 1999; Lipton *et al*, 1991).

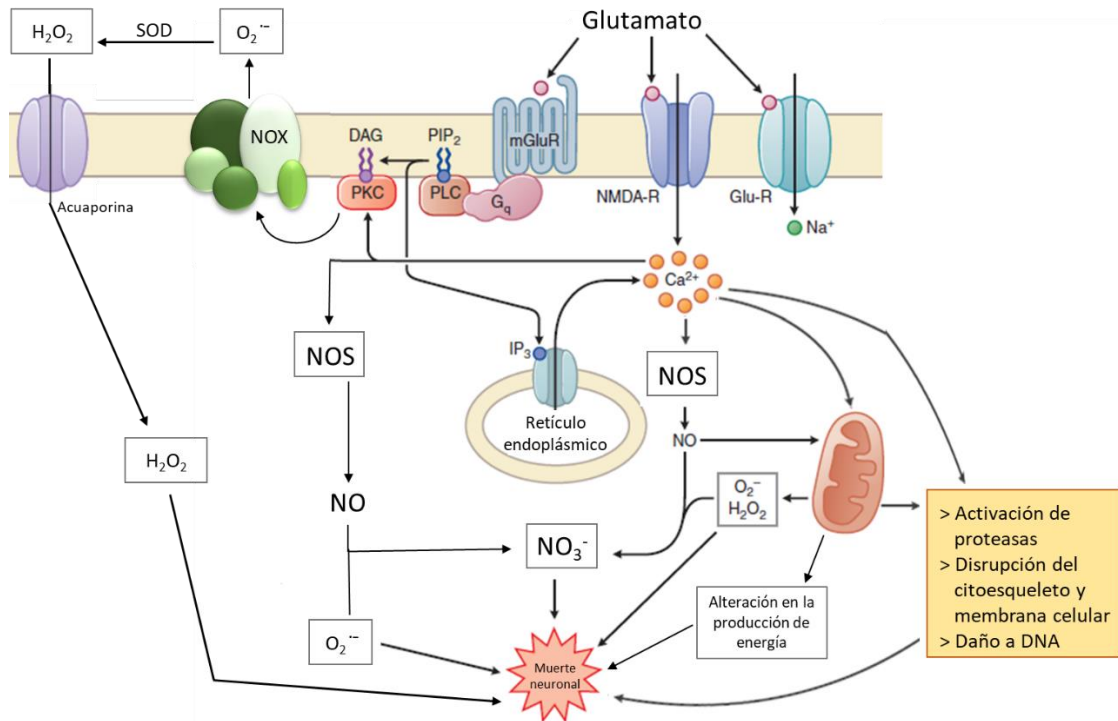


Fig. 1. Mecanismo de daño celular suscitado por excitotoxicidad glutamatergica. La sobreestimulación de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato favorece un influjo masivo de Ca^{2+} , así como una producción exacerbada de ERO; dichos fenómenos conducen a daño y muerte neuronal. Fosfolipasa C (PLC), fosfatidil inositol bifosfato (PIP_2), diacilglicerol (DAG), inositol 3-fosfato (IP_3), NADPH oxidasas (NOX), óxido nítrico sintasa (NOS). (Modificado de Free *et al*, en Brunton *et al*, 2008; y Hassel y Dingleding en Brady *et al*, 2012).

2.2 Especies Reactivas de Oxígeno en el Sistema Nervioso Central

Como se mencionó anteriormente, las ERO son moléculas que se producen durante un evento excitotóxico y contribuyen al progreso del daño e incluso a la muerte neuronal. La mayoría de las ERO actúan como radicales libres, las cuales, al tener un electrón desapareado promueven la oxidación de macromoléculas como lípidos, proteínas e incluso ácidos nucleicos (Dasuri *et al*, 2013). Dependiendo del contexto celular y las concentraciones de las ERO, éstas pueden funcionar como señales a través de la modificación reversible y transitoria de ciertas macromoléculas, incluyendo moléculas de señalización o proteínas específicas que participan en múltiples procesos, como las involucradas en la neuroinflamación y muerte programada (Michaelis, 1998). Se ha visto, por ejemplo, que las ERO generadas inhiben los

sistemas transportadores de glutamato, evitando de esta manera la remoción del glutamato excedente (Agostinho *et al*, 1997).

Por otra parte, se sabe que concentraciones altas y/o tiempos prolongados de exposición de ERO también pueden ejercer efectos deletéreos inespecíficos en la célula; por ejemplo, se sabe que niveles elevados de anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) inducen una oxidación masiva e irreversible de las membranas plasmáticas, proteínas y DNA, induciendo muerte de tipo necrótica (Lafon *et al*, 1993).

Las ERO son moléculas que resultan de una cascada de reacciones (Figura 2) que comienzan a partir de la reducción del oxígeno molecular (O_2), obteniendo ion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), reacción que puede ser catalizada por diversos complejos enzimáticos, como las NADPH oxidasas, xantina oxidasa, lipooxigenasas, ciclooxigenasas y el citocromo P450 (Vaquero y Molero, 2005). También, se tienen identificados al menos 10 sistemas mitocondriales productores de ERO, asociados al complejo I y III de la cadena de transporte de electrones, por mencionar algunos (Halliwell, 2001; Murphy, 2009). El superóxido puede dismutarse, dando lugar a la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por medio de la superóxido dismutasa (SOD). En ciertos casos, a partir de la reacción de Fenton el $O_2^{\cdot -}$ y el H_2O_2 dan lugar al radical hidroxilo (OH^{\cdot}) (Lambeth, 2004).

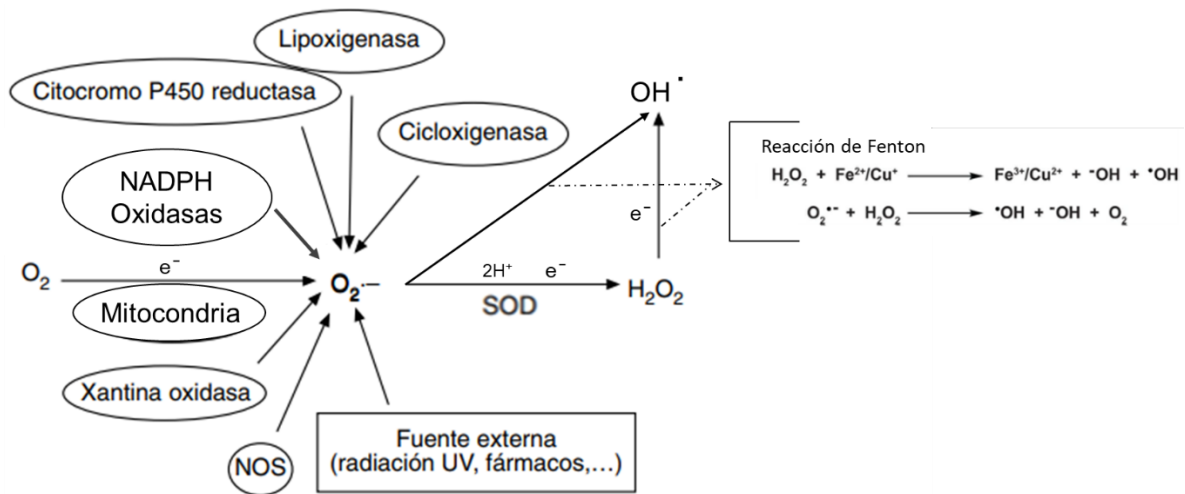


Fig. 2. Reducción del oxígeno molecular a ERO. NOS es la enzima óxido nítrico sintasa y SOD superóxido dismutasa (Modificado de Vaquero y Molero, 2005).

Las ERO juegan un papel importante en la fisiología celular, mediante su participación en fenómenos fisiológicos de homeostasis redox y en ciertos procesos patológicos. En cuanto a su participación como elementos reguladores, se sabe que tienen la capacidad de modificar de manera reversible sitios específicos en proteínas, regulando de esta forma su estado de activación. Los blancos más susceptibles a este tipo de regulación son residuos de cisteína, aunque también se han reportado modificaciones postraduccionalmente en residuos de triptófano, tirosina, histidina y metionina (Dröge, 2002; Paulsen y Carroll, 2013).

En condiciones fisiológicas se ha reportado que las ERO en el SNC participan durante el neurodesarrollo, particularmente en la proliferación, diferenciación, migración, polarización y maduración neuronal, donde las ERO funcionan como segundos mensajeros involucrados en vías de señalización (Covarrubias *et al*, 2008; Coyoy *et al*, 2013; Munnamalai *et al*, 2009; Olguín y Morán, 2017). Además de su participación durante el desarrollo, se sabe que pueden influir en procesos de la célula madura, como la neurogénesis y la plasticidad sináptica (Wilson *et al*, 2017; Le Belle *et al*, 2011; Covarrubias *et al*, 2008).

Generalmente, la regulación redox que ocurre en procesos fisiológicos sucede a bajas concentraciones de ERO; mientras que en condiciones patológicas asociadas a estrés oxidante se distinguen por un aumento importante en la producción de ERO y disminución en la actividad de sistemas antioxidantes, eventos que conllevan a daño a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, propiciando así la muerte celular (Schieber y Chandel, 2014). Cabe resaltar que el SNC es uno de los tejidos más susceptibles a daño oxidante, debido a su alto consumo de O₂, riqueza en ácidos grasos polinsaturados, deficiencia en los sistemas antioxidantes y a la presencia de grandes concentraciones de hierro (García y Massieu 2004; Valko *et al*, 2007).

2.3 NADPH Oxidasas en el SNC

A pesar de que canónicamente se considera a la mitocondria como una importante fuente productora de ERO durante la excitotoxicidad (Atlante *et al*, 2001), se sabe que existen otras fuentes de tipo enzimático determinantes en la progresión del daño. Por ejemplo, en cultivos de neuronas granulares de cerebelo (NGC) se ha demostrado la participación de

ciclooxigenasas y monoaminooxidasas en la generación de ERO ante un daño excitotóxico producido por NMDA (Boldyrev *et al*, 1999) o bien, de la xantina oxidasa en el mismo modelo de daño excitotóxico por la administración de kainato (Dykens *et al*, 1987). Así mismo tanto en modelos *in vitro*, como *in vivo* se ha descrito la participación de las NADPH oxidasas como fuentes primordiales de ERO durante el daño excitotóxico (Gomez *et al*, 2011; Wang *et al*, 2013).

Las NADPH oxidasas (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasas, NOX) son un grupo de enzimas, cuya única función descrita hasta el momento es la producción de ERO, diferenciándose de otros sistemas generadores en los cuales estas moléculas constituyen un producto secundario a su función metabólica principal. Las NOX constituyen un grupo de flavocitocromos membranales presentes en la mayoría de los eucariontes, encontrándose en algas, hongos, plantas y animales; e incluso reportándose en algunas especies de protistas (Aguirre y Lambeth, 2010).

De manera general, las NOX se encargan de catalizar la transferencia de dos electrones a través de la membrana plasmática, a partir de NADPH intracelular como donador y O₂ extracelular como aceptor. Una vez que el complejo se encuentra ensamblado, el transporte de electrones comienza en el dominio de unión a NADPH, de aquí sigue a FAD, y luego al hierro de los dos grupos hemo, para finalizar en las moléculas de O₂ (Figura 3.a). El producto principal de la reacción es O₂^{•-}, aunque también se discute aún la producción de H₂O₂ en algunos homólogos (Nayernia *et al*, 2014).

La familia de las NOX engloba un grupo de siete homólogos que comparten una estructura en común, con seis α -hélices transmembranales dentro de las cuales hay dos grupos hemo, y un extremo C-terminal que se encuentra en el citosol y contiene sitios de unión a NADPH y FAD (Segal, 2016). Los homólogos descritos (Figura 3.b), tienen características estructurales particulares, y se pueden agrupar en dos clases: los que requieren de la subunidad p22*phox*, como un potencial sitio de unión de los componentes citoplasmáticos, tales como NOX1-4; y en una segunda clase, los homólogos que poseen motivos EF de unión a calcio que regulan su activación, como son la NOX5 y las DUOX1-2; éstas últimas denominadas dual oxidasas pues poseen un motivo similar a la peroxidasa, ubicado en el extremo N-terminal de cara al lumen celular, por lo que se sugiere que su producto no sólo

sea $O_2^{\cdot -}$ sino también H_2O_2 (Aguirre y Lambeth, 2010; Nauseef, 2013; Segal, 2016; Paulsen y Carroll, 2013).

Las NOX generan ERO al activarse como parte de las vías de señalización de factores de crecimiento, citocinas, receptores tipo NMDA, y de respuesta al aumento de calcio intracelular (Lambeth, 2004; Brennan *et al*, 2009). Así mismo los diferentes homólogos presentan condiciones de activación diferentes; mientras que algunos sólo responden a estímulos en situaciones particulares (NOX1-3, DOUX2), otros se mantienen constitutivamente activos (NOX4, DUOX1) (Nauseef, 2013; Sorce *et al*, 2012; Brown y Griendling, 2009).

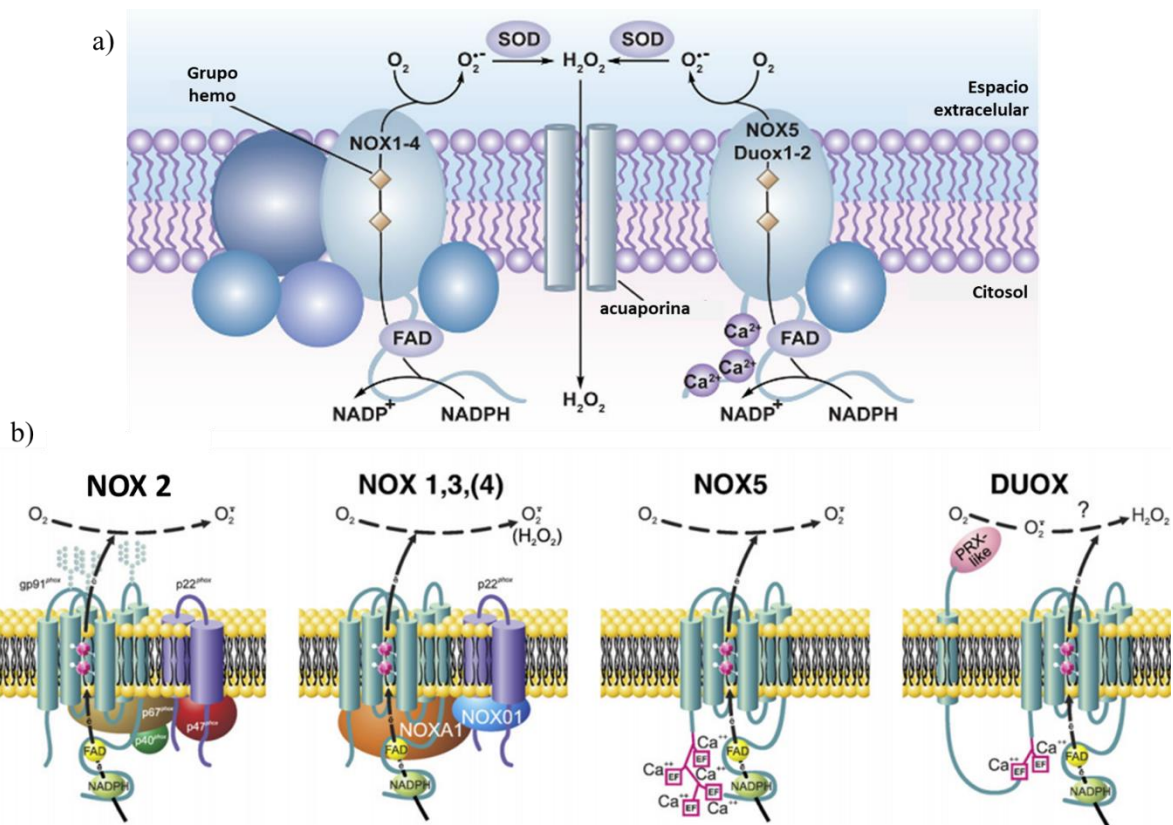


Fig. 3. Las NADPH Oxidasas como fuente de ERO. Una vez ensamblados/activos, estos complejos se encargan de canalizar electrones del citosol a partir de NADPH a través de la coenzima FAD (flavín-adenín-dinucleótido) y cofactores hemo a través de la membrana para generar $O_2^{\cdot -}$, mismo que puede dismutarse a H_2O_2 espontáneamente o por acción de la SOD (superóxido dismutasa); y trasladar por difusión o a través de acuaporinas al espacio intracelular (Paulsen y Carroll, 2013). En b) se observa a detalle las diferencias estructurales entre los siete homólogos de esta familia de flavoproteínas (Nauseef, 2013).

En mamíferos, los diferentes homólogos de esta familia presentan una distribución tisular diferencial, incluso en los diferentes tipos celulares que los conforman. Por ejemplo, mientras que en el colon hay gran expresión de NOX1, NOX2 tiene gran importancia en células del sistema inmune durante la fagocitosis, el oído interno se caracteriza por una marcada expresión de NOX3, NOX4 se encuentra altamente expresado en el riñón, NOX5 en testículos y tejido linfóide, y las DUOX1 y 2 en la tiroides (Nayernia, 2014).

Las NOX cumplen un papel importante en diversas funciones fisiológicas tales como la proliferación celular, apoptosis, señalización mediante hormonas y factores de crecimiento, remodelación del citoesqueleto y el control vascular; sin embargo, su activación también se relaciona a situaciones patológicas como son la hipertensión, aterosclerosis, diabetes mellitus y procesos neoplásicos, por mencionar algunas (Lambeth, 2004; Brown y Griendling, 2009).

La importancia de estos sistemas enzimáticos de producción de ERO ha sido ampliamente demostrada, en especial hay una gran cantidad de evidencia sobre el papel de la NOX2 en el sistema inmune y en particular sobre su activación durante la respuesta inmune innata. Esto queda de manifiesto en la granulomatosis crónica, una condición genética caracterizada por mutaciones en este homólogo, en la cual los individuos que la presentan son más susceptibles a sufrir infecciones frecuentes y graves (Deffert *et al*, 2014; Singel y Segal, 2016).

En el SNC se ha documentado ampliamente la expresión de NOX1, NOX2 y NOX4 en neuronas, astrocitos y microglía (Nayernia, 2014; Sorce y Krause, 2009). En el cerebelo, las neuronas granulares expresan mayormente NOX2 y NOX4 tanto en el desarrollo como en el sistema adulto (Sorce y Krause, 2009). Al igual que en otros tejidos, las NOX en el SNC cumplen funciones importantes en condiciones fisiológicas y patológicas. En neuronas, su actividad ha sido ligada a fenómenos como la plasticidad neuronal, neurogénesis, diferenciación, desarrollo neuronal, polarización y crecimiento axonal (Wilson *et al*, 2017).

Con relación a la participación de las ERO en muerte neuronal y enfermedades neurodegenerativas, se ha reportado en modelos *in vitro* e *in vivo* que las ERO provenientes de las NOX son determinantes en el establecimiento y progresión de patologías como el Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, eventos cerebrovasculares, así como

apnea del sueño, glioblastomas, y desórdenes psiquiátricos como esquizofrenia y el trastorno de ansiedad (Sorace y Krause, 2009; Nayernia *et al*, 2014). Es por ello, que se ha evaluado en muchas de estas condiciones la inhibición de la actividad de las NOX como posible herramienta terapéutica (Sorace *et al*, 2012), mostrando resultados positivos a distintos niveles; no obstante, esta posibilidad debe ser evaluada con más rigor debido a la participación de las NOX en otros eventos fisiológicos.

2.4 Respuesta inflamatoria y estrés oxidante

Las ERO participan en diversos mecanismos asociados a la respuesta inflamatoria secundaria al daño en el SNC. Se sabe por ejemplo que generar un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) resultante de procesos infecciosos o de estrés del sistema nervioso (Gu *et al*, 2011). El aumento en la producción de ERO es un denominador común entre el daño excitotóxico y el proceso inflamatorio. Existe evidencia de esta asociación en diversos modelos. Por ejemplo, se les ha vinculado como componentes importantes de la neuroinflamación crónica que acompaña a las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, en la cual el estrés oxidante induce peroxidación lipídica de la membrana celular, lo que sumado al fenómeno excitotóxico aumenta el influjo de calcio, alterando así la neurotransmisión y por ende las funciones cognitivas (Salim, 2016). Adicionalmente, en las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, se ha sugerido por diversos grupos de investigación la existencia de una relación entre la alta producción de ERO y la formación de agregados proteicos característicos de dichas enfermedades neurodegenerativas, lo que se sugiere podría contribuir a la progresión de estas enfermedades (Salim, 2016). Igualmente, evidencia reciente sugiere que las ERO están implicadas en desórdenes neuropsiquiátricos de alta incidencia a nivel mundial, como el trastorno de depresión mayor, el trastorno de ansiedad, la esquizofrenia e incluso el espectro autista (Ng *et al*, 2008).

Por su parte, en la isquemia cerebral, las ERO participan en la activación de vías como las de NFκB, MAPK's y JNK, promoviendo la respuesta inflamatoria y la muerte apoptótica (Crack *et al*, 2006; Morgan y Liu, 2010; Kacimi *et al*, 2011). Forrester y colaboradores (2018), revisaron en modelos de oclusión de la arteria cerebral media que la delección de NOX1, NOX2 y NOX4, tiene efectos neuroprotectores, constatados por la disminución de

edema y del volumen de infarto, así como una disminución del estrés oxidante y de la permeabilidad de la BHE permitiendo la infiltración de neutrófilos. No obstante, estos mismos autores mencionan que en otros modelos como el de aterosclerosis, las ERO generadas por las NOX regulan negativamente la progresión de la patología, sugiriendo así que su actividad podría estar ligada a procesos homeostáticos. En este sentido, Schieber y Chandel (2014), muestran que las diferentes características de la respuesta inmune se encuentran dadas en parte por los niveles de ERO; si el aumento no sobrepasa a las barreras antioxidantes, se traducirá en una respuesta dirigida a contrarrestar al agente nocivo, sin incurrir en daño tisular; mientras que si se trata de un aumento de gran magnitud, que sobrepase las barreras antioxidantes, podría promoverse una condición inflamatoria desregulada, misma que comprometería la integridad, estabilidad y viabilidad del tejido.

En cuanto a la respuesta inmune humoral, las ERO provenientes de las NOX se han visto implicadas en la activación y proliferación de los linfocitos B, células responsables de la inmunidad mediada por anticuerpos (Wheeler y Defranco, 2012). Además de su participación en la producción de anticuerpos, también se sabe que estas ERO participan en el proceso de autofagia, promovido por la administración de lipopolisacárido (LPS) (Yuan *et al*, 2008). Aunque aún se desconocen los mecanismos exactos por los cuales las NOX participan en esta regulación, se sabe que las ERO provenientes de estos complejos enzimáticos NOX pueden participar directamente en la regulación del proceso inflamatorio o bien, mediante elementos modificados por efecto del estrés oxidante, tales como los productos de la peroxidación lipídica y fosfolípidos oxidados (Kumagai *et al*, 2004; Furnkranz y Leitinger, 2004).

Como se mencionó previamente, diversos homólogos participan en el proceso inflamatorio, sin embargo, NOX2 ha sido el más ampliamente estudiado y es considerado un elemento central en el estallido respiratorio durante la fagocitosis, produciendo aproximadamente 10nM/min de $O_2^{\cdot -}$ por cada millón de neutrófilos (Babior, 1999). El aumento en la actividad de NOX2 se ha observado bajo diversos estímulos proinflamatorios como la liberación de $TNF\alpha$, interleucina 1 β (IL-1 β) y/o quimiocinas (Gao *et al*, 2007; Brown, 2007). Particularmente en la microglía, posterior a un evento inflamatorio o neurotóxico se observa un incremento en la expresión de NOX2 y en la producción de ERO,

que se relaciona a un fenotipo proinflamatorio de activación microglial conocido como M1, el cual se caracteriza por un cambio morfológico, partiendo de un fenotipo ramificado o de reposo, a una forma ameboide de activación, la cual se acompaña de la secreción de mediadores inflamatorios que conducirán a una reducción en la proliferación y supervivencia celular (Nayernia *et al*, 2014).

Un claro ejemplo de la participación de las NOX en la regulación del proceso inflamatorio es la activación del factor nuclear κ B (NF κ B) que a pesar de que existe una multiplicidad de estímulos y situaciones que llevan a su activación, hay un mecanismo en común, que es el estrés oxidante. En virtud de ello, las ERO, particularmente el H₂O₂, pueden activar a NF κ B en respuesta a agonistas inflamatorios por oxidación directa o de otras proteínas asociadas a la vía (Morgan y Liu, 2010). Posterior a un aumento de H₂O₂, se promueve la translocación de NF κ B del citosol al núcleo, donde actúa como factor de transcripción induciendo a la vez la expresión de mediadores inflamatorios. Aunado a esto, se conoce que hay una regulación recíproca entre algunos miembros de la familia de las NOX y NF κ B. Por ejemplo, ante un estímulo por LPS bacteriano, NOX4 participa en la activación de NF κ B (Park *et al*, 2004). En otro trabajo, con un modelo de Alzheimer, se observó que la inhibición general de las NOX en la microglía reduce la activación de NF κ B, y por lo tanto la producción de IL-1 β (Kang *et al*, 2001).

Otro componente del proceso inflamatorio relacionado con las ERO y el NF κ B, es el inflamasoma NLRP3, complejo proteico cuya expresión es regulada parcialmente por la actividad de NF κ B (Bauernfeind *et al*, 2009), además de que se conoce que la activación de dicho inflamosoma puede ser regulada por el aumento de las ERO (Sun *et al*, 2016).

2.5 Los inflamasomas

El evento inflamatorio, como parte de la respuesta inmune innata, inicia cuando una célula reacciona a señales de daño externas (PAMPS; patrones moleculares asociados a patógenos, por sus siglas en inglés), o internas (DAMPS; patrones moleculares asociados a daño, por sus siglas en inglés); por medio de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Dentro de estos PRRs se encuentran los inflamasomas, los cuales se caracterizan por ser receptores citosólicos que desencadenan la activación de caspasas involucradas en el proceso

inflamatorio. Desde la primera descripción de la actividad de los inflamasomas (Martinon *et al*, 2002) se han estudiado cuatro con particular énfasis: el inflamasoma NLRP1, NLRP3, NLRC4 y el AIM2; cabe destacar que a pesar de que se conocen otros receptores de la misma familia que comparten algunas características con los previamente mencionados, aún no se cuenta con información suficiente para caracterizarlos (Lu y Wu, 2014).

Los inflamasomas pertenecen a la familia de receptores tipo NOD (NLRs, *NOD like receptors*; con dominio de unión a nucleótidos y repeticiones ricas en leucinas), los cuales se encuentran particularmente en el citosol. Una vez ensamblados, se componen de una estructura polimérica, con un dominio de repeticiones ricas en leucinas (LRR) capaz de detectar PAMPS o DAMPS, un dominio NACHT y un efector en el N-terminal asociado al inicio de la señalización; mismo que en el caso de los NLRPs es un dominio de Pirina y para los NLRCs un dominio CARD (Figura 4). Este último dominio como lo indica su acrónimo tiene la propiedad de reconocimiento y activación de caspasas, de manera que cuando algún estímulo promueve su activación, se produce la conversión de procaspasa-1 a caspasa-1, su forma catalíticamente activa. Así, los inflamasomas contribuyen a través de la actividad de caspasa-1 al procesamiento proteolítico de dos citocinas principalmente: la proIL-1 β y la proIL-18. Aunque se menciona que la caspasa-1 también procesa los precursores de las IL-33 e IL-1F7 (Dinarello, 2009).

Aunque clásicamente se asocia la actividad de los inflamasomas a la actividad catalítica de caspasa-1, reportes recientes indican que las caspasas 8, 4, 5 y 11, están involucradas en la actividad de los inflamasomas, interactuando directamente con la totalidad del complejo proteico, o bien con la caspasa-1 (Man y Kanneganti, 2016); la mayoría de éstas caspasas se asocian a la producción de intermediarios proinflamatorios a excepción de la caspasa-8 (asociada al proceso apoptótico) que conducen a una forma pro-inflamatoria de muerte celular programada denominada piroptosis, cuyas características principales son la ruptura de la membrana celular, la liberación del contenido celular y la condensación de la cromatina (Man y Kanneganti, 2016).

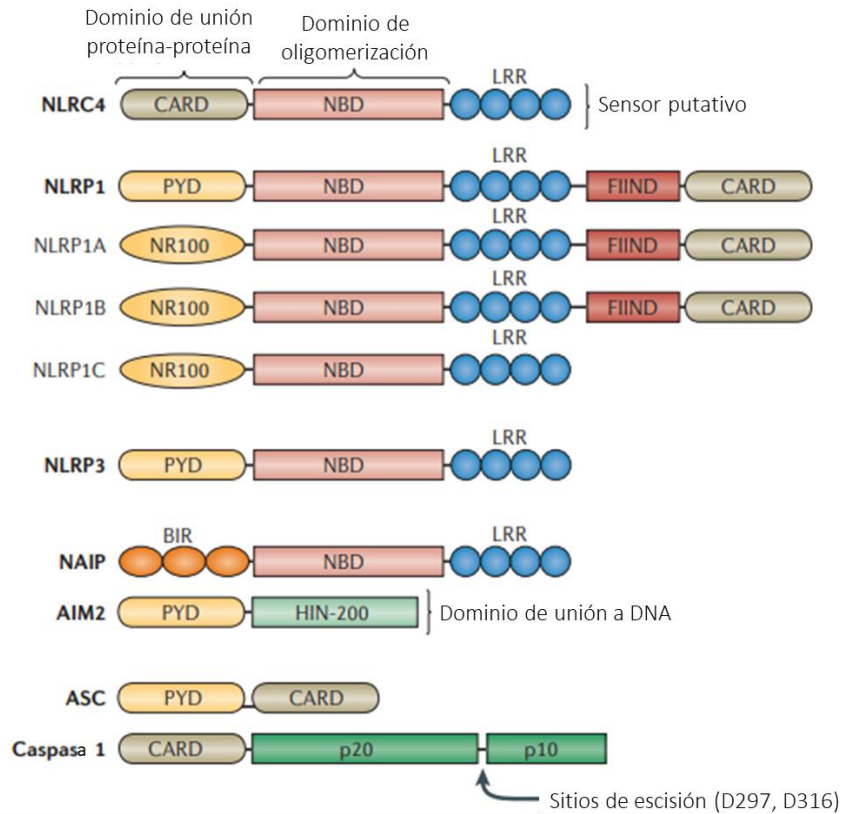


Fig. 4. Composición proteica de los inflammasomas canónicos conocidos. La caspasa-1 se compone de las subunidades p10 y p20 junto con un dominio CARD (dominio de reclutamiento de caspasas, por sus siglas en inglés); la proteína ASC, posee de igual manera este dominio y otro denominado PYD (dominio de pirina, por sus siglas en inglés), mismo que se encuentra en los receptores formadores de inflammasomas, además de un dominio de oligomerización NBD (dominio de unión a nucleótidos). Algunos inflammasomas poseen otros más específicos, entre ellos el NR100 (dominio amino terminal de NLRP1 de roedor de aproximadamente 100 aminoácidos), BIR (dominio de repeticiones del inhibidor de apoptosis de baculovirus), FIIND (dominio de “función por encontrar”) y HIN200 (dominio de proteínas nucleares indicibles por interferón hematopoyético con repetición de 200 aminoácidos, por sus siglas en inglés), así como un segmento de repeticiones rico en leucinas (LRR), según sea el caso (Walsh *et al*, 2014).

Los diferentes inflammasomas se activan por distintas señales, por ejemplo; el NLRP1 se activa específicamente en presencia de la toxina del ántrax, un muramil dipéptido que es un fragmento de peptidoglicano bacteriano de la bacteria *Bacillus anthracis*; sin embargo, también responde a alteraciones metabólicas como la disminución en los niveles celulares de ATP (Chavarría y Vance, 2015). Por su parte, el NLRC4 es activado por ciertas proteínas de origen bacteriano, especialmente la flagelina; mientras que el inflammasoma AIM2 se activa ante fragmentos de DNA de doble cadena por medio del dominio HIN200 de unión a dsDNA

(Bauernfeind *et al*, 2011; Lamkanfi y Dixit, 2014). Finalmente, el inflamasoma NLRP3 (también conocido como NALP3 o criopirina), se activa en respuesta a RNA bacteriano, RNS de cadena sencilla, y LPS (PAMPS), así como a cristales de ácido úrico, ATP, glucosa, β -amiloide (DAMPS), e incluso sustancias inorgánicas (asbesto y sílice). Ante la diversidad de activadores del NLRP3 y la falta de evidencia de la unión directa al ligando, varios autores también postulan al NLRP3 como un sensor de cambios del medio celular mediante la interacción con proteínas intermediarias (Davis *et al*, 2010; Lu y Wu, 2014).

2.6 El inflamasoma NLRP3

El macrocomplejo NLRP3, cuya masa es de aproximadamente 700 kDa (Elliott y Sutterwala, 2015), está conformado de tres elementos: el principal y por el cual recibe su nombre es el receptor tipo NOD, que posee un dominio pirina 3 (NOD-like receptor with a pyrin domain 3), el cual permite la unión a una proteína adaptadora llamada ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing CARD*, proteína asociada a apoptosis con dominio CARD). La formación del inflamasoma requiere fundamentalmente que la proteína ASC se polimerice y forme oligómeros denominados *ASC specks* o piroptosomas, los cuales son capaces de reclutar y activar al tercer componente del inflamasoma, la proteasa casapasa-1 a través de la unión de dominios CARD (Chung *et al*, 2016; Lu *et al*, 2014; Lu y Wu, 2014) (Figura 4).

La actividad del NLRP3 se encuentra regulada parcialmente de forma transcripcional, mediante el aumento en la expresión de sus componentes, es decir del receptor NLRP3, del adaptador ASC y de la caspasa-1 (Liu *et al*, 2013; Gu *et al*, 2016); en ocasiones este aumento en la expresión puede condicionar un auto ensamblaje del complejo (Lechtenberg *et al*, 2014). Sin embargo, otros grupos han reportado la activación del complejo a tiempos muy cortos sin indicar cambios en la expresión proteica, lo cual sugiere que existen otras formas de regulación, a pesar de presentarse una expresión basal de los elementos del inflamasoma NLRP3. Además de los cambios transcripcionales, se han descrito modificaciones postraduccionales que promueven la oligomerización y la activación del complejo, entre ellos la desubiquitinación, fosforilación y nitrosilación que pueden influir sobre el receptor NLRP3, así como en ASC (Juliana *et al*, 2012; Py *et al*, 2013; Hara *et al*, 2013; Song *et al*, 2017; Stutz *et al*, 2017; Chung *et al*, 2016; Yang *et al*, 2016). Adicionalmente, existen

factores reguladores externos al complejo proteico ocurriendo en la célula una reorganización de elementos, orquestada por el dinamismo del citoesqueleto en la localización del NLRP3 ubicado principalmente en el retículo endoplasmático, y los agregados de ASC (en mitocondria) al espacio perinuclear, promoviendo el ensamblaje por medio de la interacción por cercanía de los componentes del inflammasoma (Zhou *et al*, 2011; Misawa *et al*, 2013).

Aunque aún no se han descrito plenamente los mecanismos de activación del inflammasoma NLRP3, sabemos que independientemente del estímulo, *ergo* de la vía de activación, se observan fenómenos en común, los cuales son agrupados en los siguientes modelos de activación (Figura 5) y que no necesariamente implican ser excluyentes (Tschopp y Schroder, 2010; Schroder *et al*, 2010):

- 1) Modelo de activación por ERO. El aumento de la producción de ERO, promueve la activación del inflammasoma NLRP3.
- 2) Modelo de canal. Ocurre un fenómeno de *cross-talk* entre el receptor purinérgico P2X7 y el canal Panexina-1. El primero permite la entrada de ATP extracelular, y con ello un importante eflujo de K^+ , y la apertura del canal Panexina-1, el cual admite el ingreso de factores extracelulares que son activadores del NLRP3. Adicionalmente en este modelo, se han implicado otros canales cuya apertura permite el intercambio de otros iones, tales como Cl^- (eflujo) y Ca^{2+} (influjo) (Latz *et al*, 2016).
- 3) Modelo de ruptura lisosomal. La liberación de catepsina y del contenido lisosomal al citoplasma debido a la fagocitosis de estructuras cristaloides.

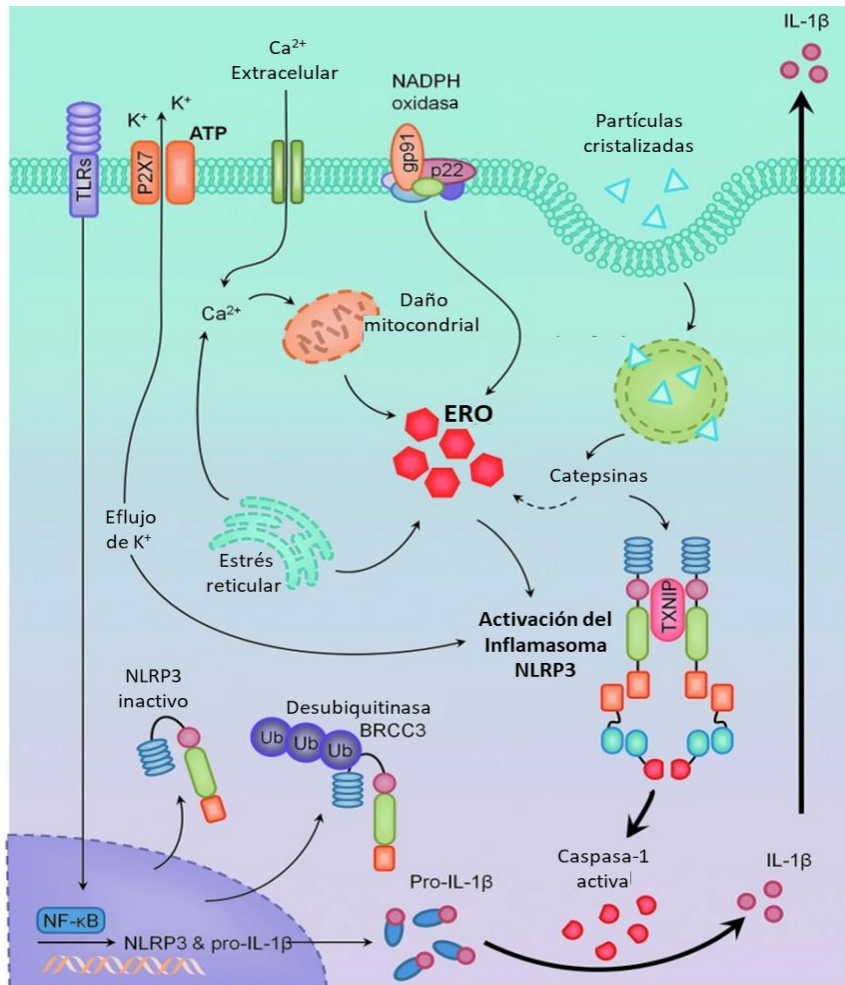


Fig. 5. Modelos de activación del inflammasoma NLRP3, ver detalles en el texto (Tomado de Abais *et al.*, 2015).

Es importante mencionar la participación del inflammasoma NLRP3 no sólo en condiciones de infección por patógenos, sino también en condiciones de lesión en diversos tejidos, así como múltiples enfermedades crónico-degenerativas contribuyendo al desarrollo del proceso inflamatorio. Algunas de las patologías en las cuales se ha caracterizado su participación son la obesidad, diabetes mellitus tipo 2, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares y neoplasias (Guo *et al.*, 2015; Abderrazak *et al.*, 2015). Particularmente en el SNC se ha observado su participación en la esclerosis múltiple, las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, así como en traumatismo encefálico, demencias de diversas etiologías y epilepsia (Zhou *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2015).

2.7 El papel de las ERO en la regulación del inflamasoma NLRP3

El estrés oxidante es particularmente relevante en la activación del inflamasoma NLRP3, ya que se consideran a las ERO como elementos fundamentales para la activación del complejo. Esto se debe en parte, a que su producción es uno de los eventos evolutivamente más conservados en respuesta al daño (Scroder y Tschopp, 2010). Existen varias hipótesis acerca del mecanismo por el cuál las ERO activan al inflamasoma NLRP3; una de las más estudiadas plantea la interacción con el sistema antioxidante tiorredoxina/TXNIP (TRX/TXNIP). En condiciones fisiológicas la proteína TRX se encuentra unida a TXNIP, sin embargo, cuando ocurre un incremento en la concentración intracelular de ERO, TRX se oxida y se disocia de TXNIP, la cual interacciona entonces con el segmento LRR del receptor NLRP3 promoviendo su activación (Zhou *et al*, 2010). Otra hipótesis postula que el aumento de las ERO promueve la activación de NFκB, factor que se sabe, aumenta la expresión del receptor NLRP3, ASC y de caspasa-1 (Mezzasoma *et al*, 2017; Gu *et al*, 2016; Bauernfeind *et al*, 2009). Algunos autores incluso, proponen que las ERO directamente podrían oxidar a las proteínas del inflamasoma NLRP3 e inducir de esta manera su activación (Bae y Park, 2011; Elliott y Sutterwala, 2015).

Las fuentes de ERO que participan en la regulación del NLRP3 también constituyen un campo principal de estudio, dada la multiplicidad de agonistas y situaciones patológicas que implican la activación del inflamasoma. Aunque no se han caracterizado del todo, hay evidencia de la participación de sistemas enzimáticos como la NOX (Dostert *et al*, 2008; Gao *et al*, 2015) o la xantina oxidasa (Ives *et al*, 2015), así como la mitocondria (Zhou *et al*, 2011).

3. Antecedentes

Evidencias recientes señalan la importancia de las NOX como fuente primordial de ERO en la regulación del NLRP3. Por ejemplo, en un modelo *in vitro* de infección por *Trichomonas vaginalis* se observó que la actividad de las NOX resulta determinante en la activación del inflammasoma NLRP3 (Gu *et al*, 2016). En el caso de modelos de patologías no infecciosas, se encontró que la activación de NOX2 promueve la unión de TXNIP al receptor NLRP3 con una consecuente activación del inflammasoma (Gao *et al*, 2015; Dostert *et al*, 2008; Tseng *et al*, 2016; Sun *et al*, 2015). En este modelo se constató que la inhibición farmacológica de las NOX provoca la disminución en la expresión del NLRP3 y de la caspasa-1 activa, resultando en una disminución en la producción de IL-1 β (Gao *et al*, 2015).

En trabajos previos de nuestro grupo, se corroboró en un modelo *in vivo*, que durante el daño excitotóxico ocurre un aumento en la actividad de NOX2 dependiente de la estimulación de los receptores glutamatérgicos, lo que lleva a un incremento en la producción de ERO (Gomez *et al*, 2011). Otras investigaciones respaldan estos resultados, siendo que la activación de los receptores tipo NMDA activan a NOX2 ocasionando gran producción de ERO en neuronas postsinápticas de la neocorteza de ratón (Girouard *et al*, 2009). Resultados similares se han observado en neuronas hipocámpales y corticales de ratón, mediante la inhibición farmacológica de las NOX y en ratones KO de p47^{phox}, constatando así la importancia de estos sistemas enzimáticos en la producción de ERO (Brennan *et al*, 2009; Brennan *et al*, 2013).

Por otro lado, se sabe que el calcio promueve indirectamente la activación del inflammasoma NLRP3. Por ejemplo, en macrófagos derivados de médula ósea de ratón se observó que el aumento de calcio intracelular promueve el procesamiento de caspasa-1 y por lo tanto la maduración de IL-1 β (Murakami *et al*, 2012). Adicionalmente, se ha visto que el influjo de Ca²⁺ por la activación de los canales TRPM2 inducen la activación de NOX que genera la producción de ERO, lo cual, junto con TXNIP, lleva a la activación del inflammasoma NLRP3 en un modelo de hiperglicemia (Tseng *et al*, 2016).

Se ha sugerido una relación entre la excitotoxicidad y los procesos inflamatorios. Por ejemplo, la activación de los receptores NMDA durante el evento excitotóxico regula

positivamente la expresión de genes inflamatorios, incluido el gen de la IL-1 β (Jander *et al*, 2000; Viviani *et al*, 2003). En un modelo *in vivo* de lesión cerebral de rata secundaria a la administración de ácido kaínico en el hipocampo, se reportó aumento en la actividad de caspasa-1 y consecuentemente una alta producción de IL-1 β en neuronas de la capa piramidal y el giro dentado (Compan *et al*, 2012); no obstante, no se determinó directamente cual es el inflamasoma responsable de la producción de IL-1 β , dejando abierta la posible participación tanto del NLRP1 como del NLRP3. La evidencia apunta a que la IL-1 β no sólo participa en la instauración del daño, sino que es un factor importante en la progresión, ya que la administración de esta citocina potencia el daño por isquemia/reperfusión en el cerebro de ratones, fenómeno que se debe posiblemente a un sistema de retroalimentación positiva entre la citocina y la actividad de NOX (Chen *et al*, 2011).

El entendimiento de la expresión del inflamasoma NLRP3 como respuesta al daño excitotóxico también depende del tipo celular, por lo cual ha sido tema de estudio de diversos grupos. Recientemente se ha reportado la expresión del complejo en microglía y astrocitos, sin embargo, aún no hay certeza suficiente para caracterizar su expresión en los diversos tipos de neuronas (Freeman *et al*, 2017; Yang *et al*, 2014; Kaushal *et al*, 2015). Existe evidencia de la expresión de NLRP3 en algunas neuronas en específico, por ejemplo, en un modelo de esclerosis lateral amiotrófica en ratones, reportan la presencia del inflamasoma activo en neuronas del núcleo anterodorsal del tálamo (Debye *et al*, 2018); mientras que Lui y colaboradores (2013), observaron la presencia del receptor NLRP3 en neuronas corticales sometidas a traumatismo encefálico.

En cuanto a modelos *in vitro* se demostró que, en condiciones de privación de glucosa y oxígeno, en neuronas corticales aumenta la expresión del receptor NLRP3, así como del resto de los componentes del inflamasoma, y que además este incremento es dependiente de la activación de NF κ B, y de otras vías en las que participan cinasas como JNK y ERK (Fann *et al*, 2018). En cuestión de nuestro modelo, otros grupos han reportado que durante la muerte apoptótica en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC), se observa la presencia del receptor NLRP1, así como la expresión de los elementos ASC y caspasa-1 (Liu *et al*, 2004).

4. Planteamiento del problema

El daño excitotóxico es un evento que provoca muerte neuronal, observado frecuentemente en patologías agudas y crónicas del SNC, y en consecuencia al daño, se desencadena una serie de eventos que culminarán en un evento inflamatorio en el que participa principalmente la microglía, pero también, en menor grado, las propias neuronas. La respuesta inflamatoria es necesaria para la resolución del evento excitotóxico, sin embargo, el aumento en la producción de citocinas inflamatorias es capaz de desencadenar muerte necrótica y apoptótica y, por lo tanto, incrementar el daño tisular. En este sentido, el aumento de IL-1 β producido por el inflamasoma NLRP3 durante el proceso neuroinflamatorio, se ha asociado a muerte celular en diversos modelos de daño excitotóxico, así como a la progresión de diversas patologías del SNC, por lo que caracterizar su regulación es esencial para incluso mejorar el pronóstico de múltiples condiciones patológicas.

La mayoría de los estudios han situado el papel del inflamasoma directamente sobre las células del sistema inmune, y en el caso del sistema nervioso en microglía, desconociendo con precisión el papel de las neuronas en este proceso. Por ello, resulta importante evaluar la respuesta inflamatoria y la posible participación del inflamasoma NLRP3 en un cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo libre de microglía bajo condiciones excitotóxicas. Por otro lado, las ERO provenientes de las NOX juegan un papel crítico en el evento excitotóxico y en la inflamación en otras células, razón por la que en este trabajo se precisa caracterizar el papel que tiene la actividad de las NOX en la expresión del NLRP3 y su repercusión en la muerte excitotóxica en este modelo neuronal.

5. Hipótesis

Las ERO provenientes de las NOX regulan la expresión y actividad del inflammasoma NLRP3 en condiciones de excitotoxicidad en neuronas granulares de cerebelo.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Caracterizar la presencia y activación del inflammasoma NLRP3 y su regulación por las ERO producidas por las NOX durante un evento excitotóxico en neuronas granulares de cerebelo.

6.2 Objetivos particulares

En cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo sometidos a una condición excitotóxica:

- ❖ Confirmar un ambiente de estrés oxidante por medio de la determinación de ERO y la participación de NOX en estos niveles.
- ❖ Evaluar la actividad del inflammasoma NLRP3 a través de tres parámetros distintos; caracterizando el patrón de expresión del receptor, así como su actividad por medio de la caspasa-1 y la presencia de sus productos IL-1 β e IL-18.
- ❖ Determinar la participación de NOX en la activación del inflammasoma NLRP3 en distintos momentos de la respuesta subsecuente al estímulo excitotóxico.

7. Materiales y métodos

En la Figura 6, se muestra de forma esquemática la metodología empleada con el modelo y técnicas utilizadas, las cuales se detallan a continuación.

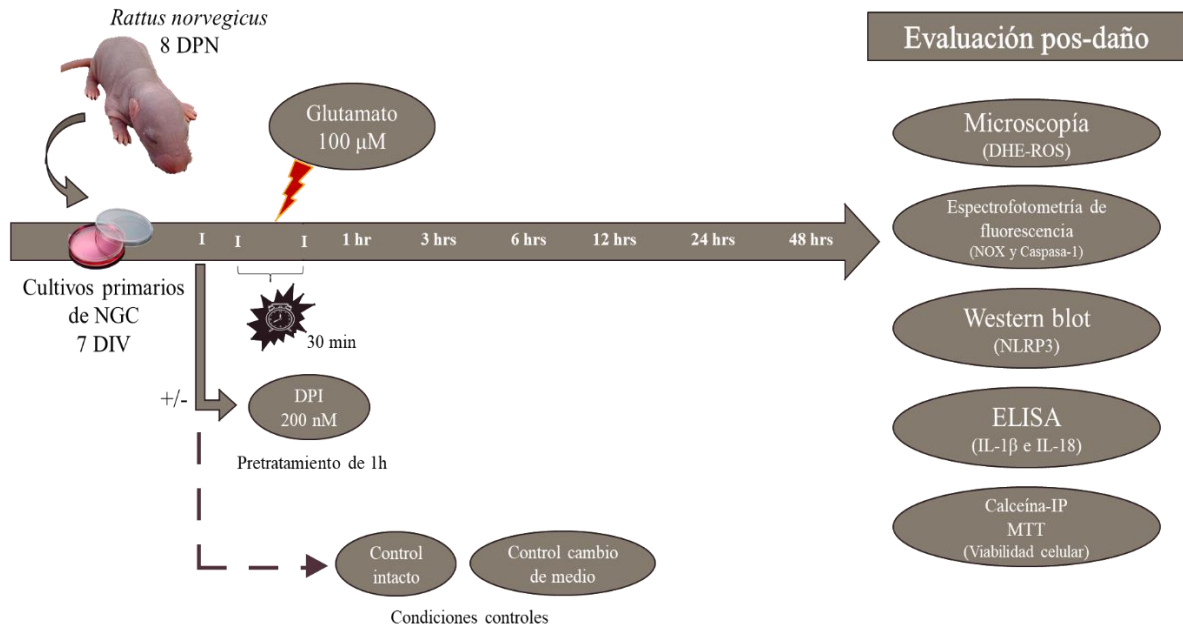


Fig. 6. Esquema de la estrategia metodológica seguida para la obtención y el tratamiento de NGC sometidas a daño excitotóxico, así como los tiempos a los que se evaluaron los diferentes parámetros experimentales.

7.1 Animales

Los animales empleados en este estudio fueron ratas de la cepa *Wistar* (*Rattus norvegicus*) de 7 a 8 días de edad, proporcionados por el bioterio del Instituto de Fisiología Celular (IFC). Su manejo y tratamiento se realizó bajo los estándares de cuidado animal y procedimientos aprobados internacionalmente (NIH Publicación No.8023, revisado en 1978) y localmente por el Comité de Investigación y Ética del IFC de la Universidad Nacional Autónoma de México (Protocolo No. JMA72-15).

7.2 Cultivos celulares primarios de neuronas granulares de cerebelo

Posterior a la eutanasia por sección cervical, se disecó el cerebelo para subsecuentemente disociar el tejido y aislar las neuronas granulares, las cuales fueron cultivadas como se

describió anteriormente (Morán y Patel, 1989). Las células se sembraron a una densidad de 265×10^3 células/cm² en cajas Petri pretratadas durante 24 horas con poli-L-lisina (5µg/ml). Las neuronas granulares de cerebelo (NGC) fueron dispuestas en medio basal Eagle suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (inactivado por efecto del calor), 25mM de KCl, 2mM de glutamina, 50µg/ml de estreptomocina y 50U/ml de penicilina. Los cultivos fueron mantenidos en incubación durante 7 días *in vitro* (DIV) a una temperatura constante de 37°C y una atmósfera humidificada de aire al 95% y CO₂ al 5% .

Con el objetivo de inhibir la proliferación de células gliales, se adicionó citosina arabinosa (10µM) 24 horas después del sembrado celular, la cual actúa promoviendo la muerte de células gliales en proliferación celular al ser un inhibidor de la síntesis del DNA (Negishi *et al*, 2003). Dichos cultivos neuronales poseen más del 90% de pureza (Morán y Patel, 1989).

7.2.1 Grupos y tratamientos evaluados

Transcurridos 7 DIV, tiempo en que se reporta la máxima respuesta de activación de receptores glutamatérgicos tipo NMDA (Nicholls *et al*, 2006), se retiró el 50% del medio y se mantuvo en incubación, mientras las células se trataron con glutamato monosódico (100µM) durante 30 minutos. Con el objetivo de evaluar un daño agudo y evitar una estimulación crónica por parte del glutamato, posteriormente se retiró el medio adicionado con el neurotransmisor y se regresó el que se separó previamente para continuar con la incubación de los cultivos durante diferentes tiempos (1, 6, 12, 24 y 48 horas). Con la finalidad de evaluar la participación de NOX, se trabajó de manera paralela con otros dos grupos, a los cuales además de la adición de glutamato monosódico, se les pretrató durante una hora con cloruro de difenil iodonio (DPI) (200 nM) el cual es un inhibidor de NOX, caracterizado por una alta eficiencia *in vitro* (Nayernia *et al*, 2014); o con fluoruro 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonilo (AEBSF) (50 µM), un inhibidor irreversible de serín proteasas.

En todos los casos se incluyeron cuatro condiciones control: 1) un control intacto, al que no se le sometió a ninguna manipulación experimental; 2) un control de cambio de medio, en el cual se simuló la manipulación de la caja de cultivo, al realizar el cambio del medio sin administrar ningún tratamiento; 3) tratamiento de bajo potasio (K5), para inducir

un estado de muerte apoptótica (sólo en ensayo de viabilidad por MTT), caracterizado por el incremento en la actividad de NOX y una alta producción de ERO (Zaragoza y Morán, 2017; Guemez y Morán, 2009); y 4) tratamiento con LPS (500ng/ml) por 5 horas y ATP (5 mM) por 1 hora para inducir una respuesta inflamatoria.

7.3 Obtención de lisados celulares

Se trabajó con dos protocolos para la obtención de lisados celulares.

- 1) La muestra se obtuvo a partir del raspado de las NGC, este fue realizado con amortiguador salino de fosfatos (PBS); los lisados fueron sometidos de manera inmediata al ensayo. Dichas muestras se ocuparon con la finalidad de evaluar la actividad de NOX.
- 2) Por otro lado, para los ensayos de actividad de caspasa-1 y el análisis de proteínas por Western Blot, las células fueron lavadas con PBS, posteriormente se rasparon con amortiguador de lisis (Tris- HCl 10Mm, NaH₂PO₄ 10 mM, NaCl 130 mM, Tritón X-100 1%), y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10min a 4°C, para después recuperar el sobrenadante.

Para determinar el contenido proteico del lisado se utilizó el método de cuantificación Bradford (Bradford, 1976).

7.4 Viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó como se indica a continuación.

Los cultivos se incubaron con 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-1)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) por 15 min y posteriormente se eliminó el sobrenadante y se incubó a temperatura ambiente con dimethyl sulfoxide (DMSO) durante 40 min, para solubilizar el azul de formazán, producido como resultado de la reducción del MTT. Esta reducción, se lleva a cabo por la enzima succinato deshidrogenasa, por lo que la velocidad de la reacción indica el grado de actividad mitocondrial e indirectamente la viabilidad celular (Bahuguna *et al*, 2017). La reacción produce un aumento colorimétrico que es directamente proporcional

a la viabilidad celular, el cual se expresa como la diferencia entre la absorbancia de la solución medida a 570 y 630 nm y se reporta como porcentaje con respecto al control intacto.

Adicionalmente, se empleó el marcaje con calceína-AM e ioduro de propidio, el primero es un compuesto que emite fluorescencia al interactuar con las esterasas de células vivas (Bratosin *et al*, 2005), mientras que el segundo es un marcador de daño celular, el cual produce fluorescencia al ingresar a la célula e intercalarse con ácidos nucleicos, debido a la pérdida de la integridad de la membrana (Rieger *et al*, 2011). Se tomaron fotografías de tres campos por cada condición, con un microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon ECLIPSE Ti) con filtros para detección de fluorescencia, utilizando el objetivo 20x. Los resultados de la cuantificación se expresan como porcentaje de las células metabólicamente activas (positivas a calceína-AM) respecto al total de células.

7.5 Detección de ERO

La producción de ERO subsecuente al evento excitotóxico, fue medido por microscopía de fluorescencia, por medio de la utilización de dihidroetidio (dHEt), el cual se oxida por efecto del $O_2^{\cdot -}$, transformándose en etidio, un compuesto capaz de intercalarse entre la cromatina, permitiendo observar el núcleo celular con un color fluorescente rojo (Tanaka *et al*, 2002).

Las células fueron incubadas a 37°C durante 20 min con dHEt (3.2µM). Posteriormente, se observaron con un microscopio de epifluorescencia (Nikon ECLIPSE Ti), utilizando un filtro de excitación/emisión de 546/590nm. Con fines de cuantificación, fueron tomadas 3 fotografías por condición experimental en diferentes campos seleccionados aleatoriamente, de las cuales se cuantificó la intensidad de fluorescencia por medio del software Image J (Wayne Rasband). El promedio de las fotografías por muestra se consideró como una n=1, expresando los resultados en unidades relativas de fluorescencia (URF).

7.6 Actividad enzimática

La actividad enzimática de NOX y de la caspasa-1 posterior al daño excitotóxico, se determinó utilizando un ensayo de actividad de ambas moléculas por medio de quimioluminiscencia y espectrofotometría de fluorescencia, respectivamente.

7.6.1 NADPH Oxidasa

Se siguió el procedimiento descrito por Minkenberg y Ferber (1984). Este ensayo consistió en la adición de lucigenina (100 μM) y β -NADPH (100 μM) directamente a la muestra dispuesta en una placa oscura de 96 pozos. Posteriormente, se evaluó la intensidad de luminiscencia, dado que la lucigenina es un compuesto que se reduce por acción del $\text{O}_2^{\cdot -}$, producto directo de las NOX; la molécula reducida se descompone en dos partes, una de las cuales se encuentra en un estado excitado presentando una luminiscencia amplificada (Rojas, 2013; Halliwell y Gutteridge, 2015). La cuantificación de la luminiscencia fue realizada en un lector Synergy HT durante un lapso de 30 minutos.

La actividad de la NOX se calculó como el delta de la luminiscencia de la lectura final con respecto a la inicial en cuestión a las unidades relativas de luminiscencia; expresando los resultados como $\Delta\text{URL}/\text{min}/\mu\text{g}$ de proteína.

7.6.2 Caspasa-1

La actividad de caspasa-1 fue medida a partir de la escisión del sustrato fluorogénico específico YEVD-AMC (Peptide Institute, Código 3161-v), el cual emite fluorescencia al ser cortado proteolíticamente de manera específica por la caspasa-1. La muestra (250 y 400 μg de proteína) fue colocada en una placa oscura para fluorescencia de 96 pozos, a la cual se le agregó el amortiguador de ensayo (EDTA 5mM, CHAPS 0.1%, sacarosa 1.5%, HEPES 500mM, DTT 1M y YEVD-AMC). La fluorescencia fue leída a una longitud de onda de excitación/emisión de 380/460nm en un lector Synergy HT cada 10 minutos durante 2 a 4h.

Se obtuvo la delta de la lectura de fluorescencia final con respecto a la inicial expresada en URF. Los resultados fueron expresados en $\Delta\text{URF}/\text{min}/\mu\text{g}$ de proteína.

7.7 Análisis proteico (Western blot)

Posterior a su tratamiento, las NGC se sometieron a 2 lavados con PBS y se realizaron homogenados con amortiguador de lisis adicionado con una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Se cargó 80 μg de proteína (determinada por método Bradford) en un gel SDS-PAGE al 8%, que subsecuentemente fue transferido a una membrana de polifluoruro

de vinilideno (PVDF), y posteriormente bloqueada en una solución de leche libre de grasas al 5% y TTBS (Tris- 100mM, NaCl 150mM y Tween 0.1%, pH 7.4). Subsecuentemente, las membranas fueron incubadas a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios: anti-NLRP3 (1:1000; Cell Signaling D4D8T) y anti-GAPDH (1:2500; Millipore MAB374); seguido de lavados con TTBS para eliminar el exceso de anticuerpo primario y luego incubados a temperatura ambiente durante una hora con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano (HRP). Las proteínas fueron visualizadas con la utilización de un sistema de quimioluminiscencia y la exposición en placas fotosensibles (Kodak BioMaxLightFilm).

La densitometría se realizó con el software Image Studio Lite versión 5.2 (LI-COR), del cual se obtuvo la intensidad de la señal por banda. La cuantificación se realizó de acuerdo con la relación de intensidad de señal de NLRP3/GAPDH.

7.8 Determinación de las citocinas IL-1 β e IL-18

7.8.1 Inmunocitoquímica

La detección de la IL-1 β en NGC, se realizó por medio de inmunofluorescencia. Para ello, las células se lavaron con PBS y fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 25 min a temperatura ambiente. Posteriormente fueron permeabilizadas durante 45 min con una solución de bloqueo de PBS adicionada con Tritón X-100 0.03% y albúmina sérica bovina al 2.5% a temperatura ambiente; después se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-IL-1 β (ab9787) en una dilución de 1:400 en PBS/BSA al 2.5%. A continuación, se incubó el anticuerpo secundario DyLight 488 (1:300) por 1 hora a temperatura ambiente, protegido de la luz. Para la tinción de núcleos, se utilizó HOECHST al 0.005%. Las células fueron montadas con medio Fluoromont y se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Nikon ECLIPSE Ti) para la obtención de imágenes.

7.8.2 ELISA

La determinación en los niveles de IL-1 β e IL-18, se realizó por método de ELISA en los sobrenadantes de las cajas de cultivo por medio de kits comerciales y siguiendo las instrucciones expresadas por el fabricante (eBioscience, No. Cat. 88-7013 y BMS618/3,

respectivamente). Cabe mencionar que, para la realización de estos ensayos fue preciso concentrar los sobrenadantes de los cultivos primarios de NGC, por medio de la utilización de tubos Amicon Ultra-15 (UFC900308), que fueron centrifugados a 4000 rpm a 4°C durante 1h, en una centrífuga refrigerada (Eppendorf modelo 5804 R).

7.9 Procesamiento de datos

Los datos obtenidos en los diferentes ensayos fueron analizados y graficados con el paquete estadístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) para Windows y se expresaron como la media estadística \pm desviación estándar (SD). La significancia se determinó a partir de un análisis de varianza (ANOVA de dos vías), seguida por una prueba *post hoc* de Tuckey, para la comparación múltiple entre controles, tratamientos y tiempos. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos datos con un valor de $p < 0.05$

8. Resultados

8.1 Viabilidad celular

Como primer acercamiento a la caracterización del daño excitotóxico en el cultivo primario de NGC se evaluó la condición de muerte inducida por glutamato utilizando las pruebas de transformación de MTT y la relación calceína-AM - yoduro de propidio. Como se muestran en las Figuras 7 y 8, respectivamente. En la prueba de MTT, se observa que la muerte ocasionada por excitotoxicidad a las 24h es de aproximadamente 15.51% ($\pm 14.58\%$) y ésta se incrementa a 19.89% ($\pm 18.85\%$) a las 48h.

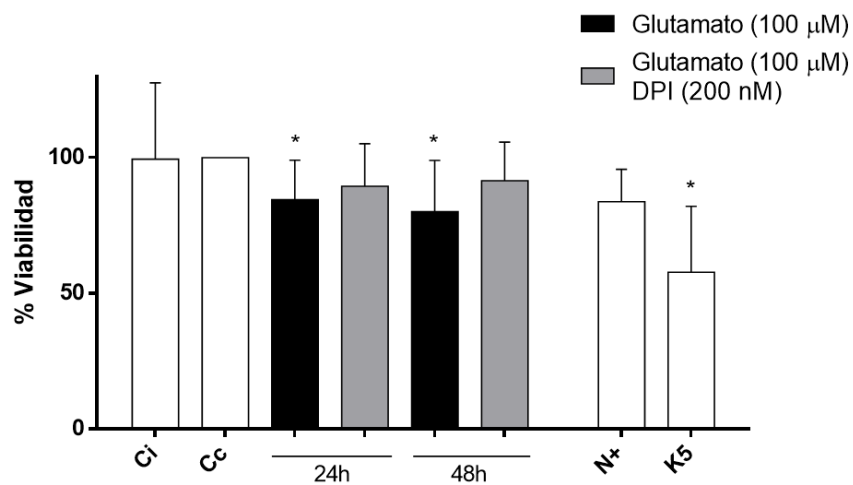


Fig. 7. Viabilidad celular resultado del daño por glutamato en cultivos de NGC evaluada por ensayo de MTT. Los resultados corresponden a experimentos en los que se evaluó el impacto del glutamato a 24 y 48 hrs, así como el efecto del DPI (200 nM). Se incluyen las condiciones controles intacto (Ci) y de cambio de medio (Cc), tratamiento de LPS y ATP (N+) y de bajo potasio (K5). Las barras muestran las medias estadísticas \pm SD, * corresponde a $p < 0.05$ con respecto al Cc, los resultados son el promedio de 4 experimentos independientes.

Para corroborar los datos obtenidos por el ensayo de MTT, se realizó también una prueba de calceína-AM y yoduro de propidio, cuyo resultado se ilustra en la Figura 8. En ella, es posible observar que la viabilidad celular es muy similar a la observada con la reducción del MTT.

Como era esperado, se observó que el modelo de excitotoxicidad por estimulación aguda de glutamato en cultivos de NGC es capaz de inducir muerte neuronal.

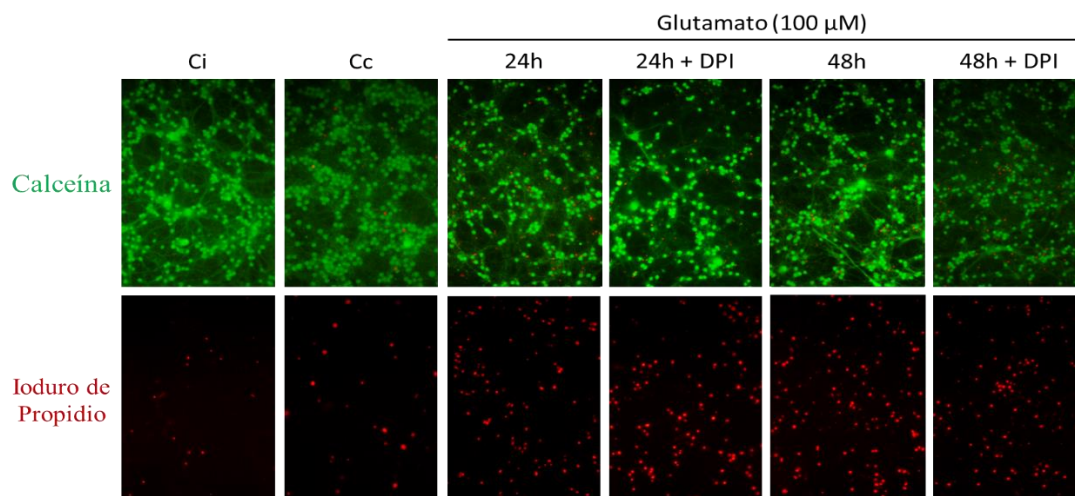


Fig. 8. Fotografías representativas de una prueba de calceína-AM y ioduro de propidio mostrando la viabilidad celular subsecuente al daño excitotóxico. En la imagen se observan un par de tomas representativas de un campo por cada condición, de 3 campos totales en un experimento (n=1), en el que se evaluó la viabilidad a las 24 y 48h posteriores al daño, así como el respectivo pretratamiento con DPI; también se incluyen las condiciones controles intacto (Ci) y de cambio de medio (Cc).

8.2 Evaluación de la producción de ERO por excitotoxicidad

Trabajos previos de nuestro grupo demostraron que la administración de glutamato promueve un aumento en la producción de ERO en cultivos primarios de NGC (Maycotte, 2009); sin embargo, esta determinación se realizó solo hasta 8 horas posteriores al evento agudo. El presente trabajo amplió esta ventana temporal, con el fin de valorar la producción de ERO hasta 48 horas posteriores a la administración de glutamato.

En la Figura 9.a se observa la cuantificación de la fluorescencia del dHEt como indicativo de la producción de ERO. Tras la administración de glutamato aumenta la producción de ERO 4.96 (± 0.49) veces con respecto a los niveles basales sin estímulo (control cambio de medio), que se mantiene a las 6h post-administración (6 ± 0.71 veces con respecto al control), 12h (4.88 ± 1.19 veces con respecto al control), y 24h (2.85 ± 1.38 veces con respecto al control). Sin embargo, la cantidad de ERO comienza a disminuir a partir de las 24 y 48h ($p < 0.05$ con 2.03 ± 1.38 , y $p < 0.001$ con 3.38 ± 0.85 veces respectivamente, con respecto a la producción a las 12h tras la administración de glutamato).

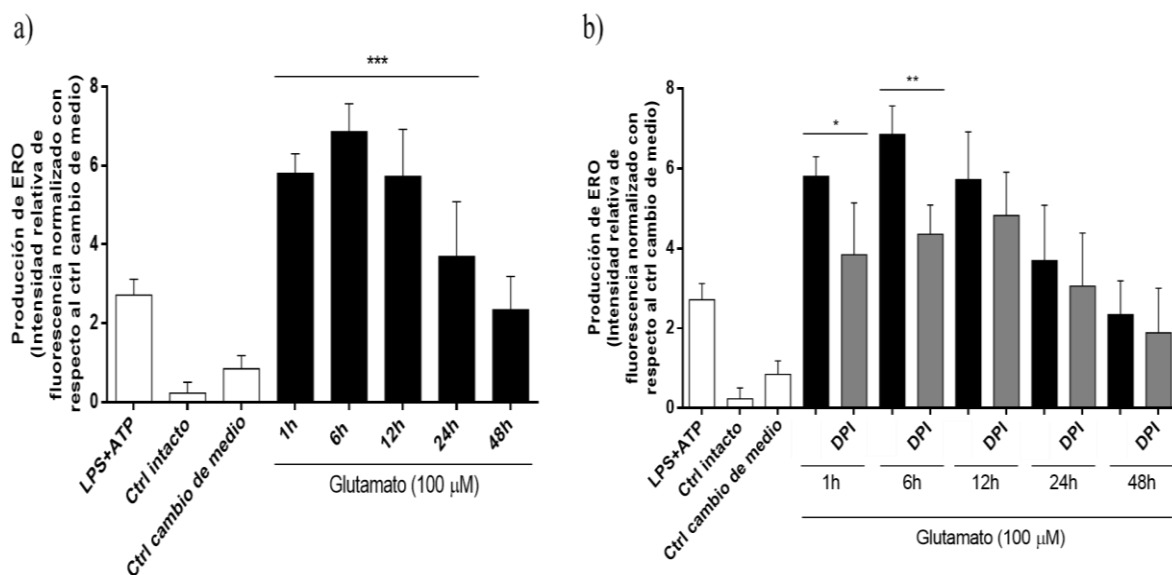


Fig. 9. Producción de ERO en respuesta a la administración de glutamato. En a) se muestra la producción de ERO a través del tiempo, posterior a la administración de glutamato. Los *** indican una diferencia significativa ($p < 0.001$) con respecto al control de cambio de medio. En b) se observa el efecto del DPI en la producción de ERO inducida por glutamato a distintos tiempos. La significancia está dada con relación al tiempo post-daño con respecto a su tratamiento con DPI, en donde * indica un valor de $p < 0.05$ y ** uno de $p < 0.01$. Los gráficos muestran la media \pm SD, resultado de 4 experimentos independientes y expresada en unidades relativas de fluorescencia.

Los cultivos tratados con DPI presentaron menor producción de ERO a 1h (1.97 ± 1.3 veces) y 6h (2.5 ± 0.73 veces) en comparación con los que solo se les administró glutamato (Figura 9.b). En los tiempos posteriores no se observan diferencias significativas.

Estos resultados, confirman que el modelo de daño excitotóxico por administración de glutamato en cultivos primarios de NGC, cursa con un incremento en la producción de ERO y que este aumento depende parcialmente de la actividad de las NOX, al menos en las primeras 6 horas subsiguientes a la administración de glutamato.

8.3 Análisis de la actividad de NADPH Oxidasa

Con la finalidad de caracterizar la participación de las NOX en el daño excitotóxico en este modelo, se evaluó su actividad posterior a la administración de glutamato a lo largo del tiempo a través de un ensayo de cinética enzimática por luminiscencia. En la Figura 10.a se observa un aumento en la actividad de las NOX a la 1h y 12h post-estímulo excitotóxico; en

cuanto a la primera hora hay un incremento de 1.61 (± 0.18) veces de la actividad registrada en el control de cambio de medio, mientras que a las 12h observamos un pico en la actividad, siendo de 8.4 (± 3.87) veces más que dicho control. A partir de este tiempo, ocurre una disminución gradual en la actividad de NOX, ya que a las 24hrs se encuentra 6.03 (± 0.59) veces por debajo de la actividad registrada a las 12h ($p < 0.001$); y a las 48h la actividad regresa al estado basal (control cambio de medio) ($p < 0.001$ con respecto a la actividad percibida a las 12h, con una disminución de 7.8 ± 1.14 veces).

También se evaluó el efecto inhibitor sobre NOX de dos fármacos, el DPI (200 nM) y el AEBSF (50 μ M) (Figura 10.b). Los cultivos pretratados con DPI muestran una reducción importante en la actividad a la primera hora (2.06 ± 0.23 veces) y las 24 horas (3.37 ± 0.29 veces) con respecto a los cultivos tratados solo con glutamato, alcanzando incluso los niveles basales mostrados en el control de cambio de medio. El AEBSF, por su parte, muestra al igual que el DPI, una disminución en los mismos tiempos, a 1h 1.69 ± 0.19 veces, y a las 24h 2.91 ± 0.11 veces); sin embargo, este pretratamiento logra reducir también la actividad a las 12hrs (8.45 ± 0.64 veces).

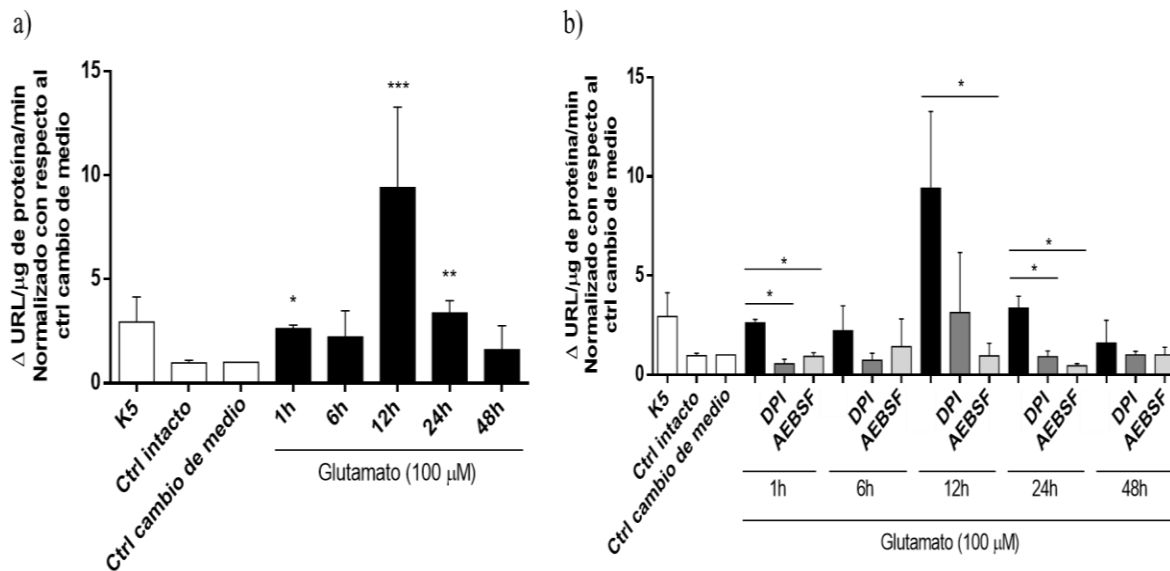


Fig. 10. Actividad de las NADPH oxidases posterior al evento excitotóxico en NGC. En a) se observa el patrón de actividad en respuesta al estímulo. La significancia está dada con relación al control cambio de medio. En b) se muestra el efecto de dos inhibidores farmacológicos de la NOX, el DPI (200 nM) y el AEBSF (50 μ M). Se muestra la media \pm SD, resultado de 4 experimentos independientes, y los asteriscos indican diferencias significativas, siendo * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$) con respecto al control de cambio de medio.

Estos resultados indican que durante el daño excitotóxico en las NGC ocurre un incremento en la actividad de las NADPH oxidasas, el cual se previene mediante el pretratamiento con inhibidores farmacológicos de las NOX; cabe destacar que el mecanismo de acción de estos fármacos es diferente, lo cual podría explicar la diferencia del comportamiento de la actividad de NOX en ciertos tiempos, hecho que será mencionado con más detalle en el apartado de Discusión.

8.4 Presencia del receptor NLRP3

Una vez caracterizado el perfil de actividad de las NOX y la producción de ERO en NGC ante un evento de excitotoxicidad, procedimos a evaluar la presencia del receptor NLRP3 como punto de partida para identificar el estado de activación del inflamasoma. Mediante un ensayo de inmunodetección se evaluó el nivel de expresión del trímero, el cual se muestra en la Figura 11. Observamos que tras la administración de glutamato hay un aumento del NLRP3 a las 12 de 2.45 (± 1.78) veces y 24h de 1.23 (± 1.04) veces con respecto al registrado para el control de cambio de medio. Para el resto de los tiempos evaluados (1, 6 y 48h) no hay un cambio en los niveles del receptor con respecto al mismo control ($p < 0.05$). Además, con la finalidad de establecer una asociación directa entre ERO y la presencia del NLRP3, se observó que al estimular a los cultivos primarios de NGC únicamente con H_2O_2 ocurre un incremento del receptor (Figura Suplementaria A).

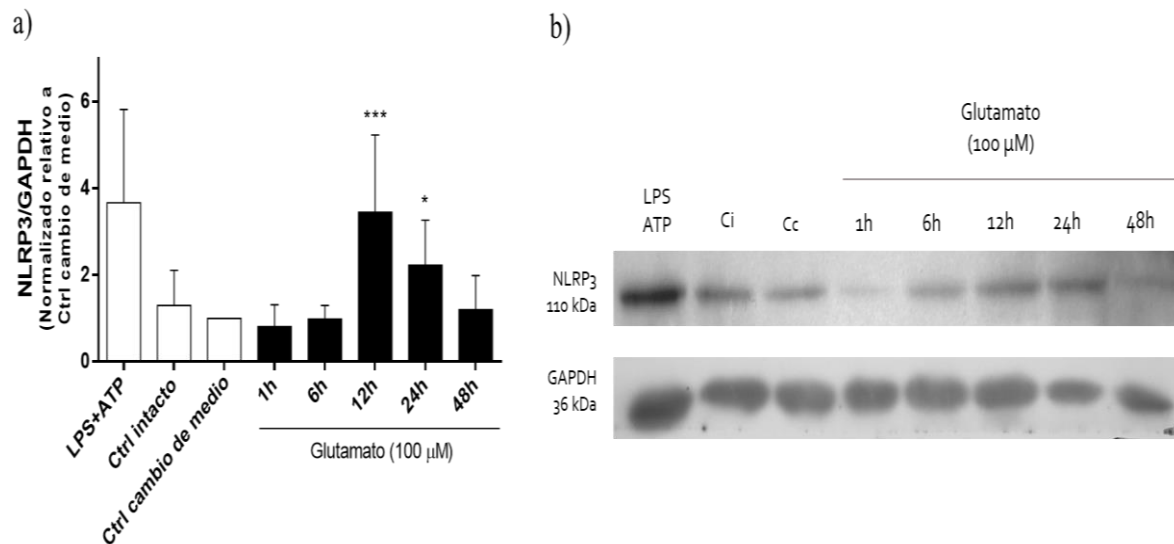


Fig. 11. Presencia del NLRP3 en NGC sometidas a daño excitotóxico. En a) las barras indican el

valor de las densitometrías de la relación NLRP3/GAPDH y los resultados se encuentran normalizados con relación al control cambio de medio. Los datos son la media estadística \pm SD de 3 experimentos independientes en donde $p < 0.05$ (*) y $p < 0.001$ (***) son significativamente diferentes al control de cambio de medio. Por otro lado, en b) se observa una imagen representativa, en la cual se muestra los niveles del receptor NLRP3 a través del tiempo (1, 6, 12, 24 y 48h) en NGC; así como el control positivo con LPS y ATP, un control intacto (Ci), cambio de medio (Cc); y la proteína GAPDH como control de carga.

Para comprobar la existencia de una relación entre las ERO, la actividad de las NOX y los niveles del receptor NLRP3, se evaluó la presencia del NLRP3 en cultivos pretratados con DPI (Figura 12). Observamos que la inhibición de NOX tiene repercusión en la cantidad proteica del receptor a las 12h disminuyendo los niveles 2.5 (± 0.31) veces, y 1.39 (± 0.21) veces a las 24h post-estímulo excitotóxico. Estos resultados sugieren que la actividad de las NOX está relacionada con la regulación del NLRP3 en respuesta al evento excitotóxico en tiempos específicos.

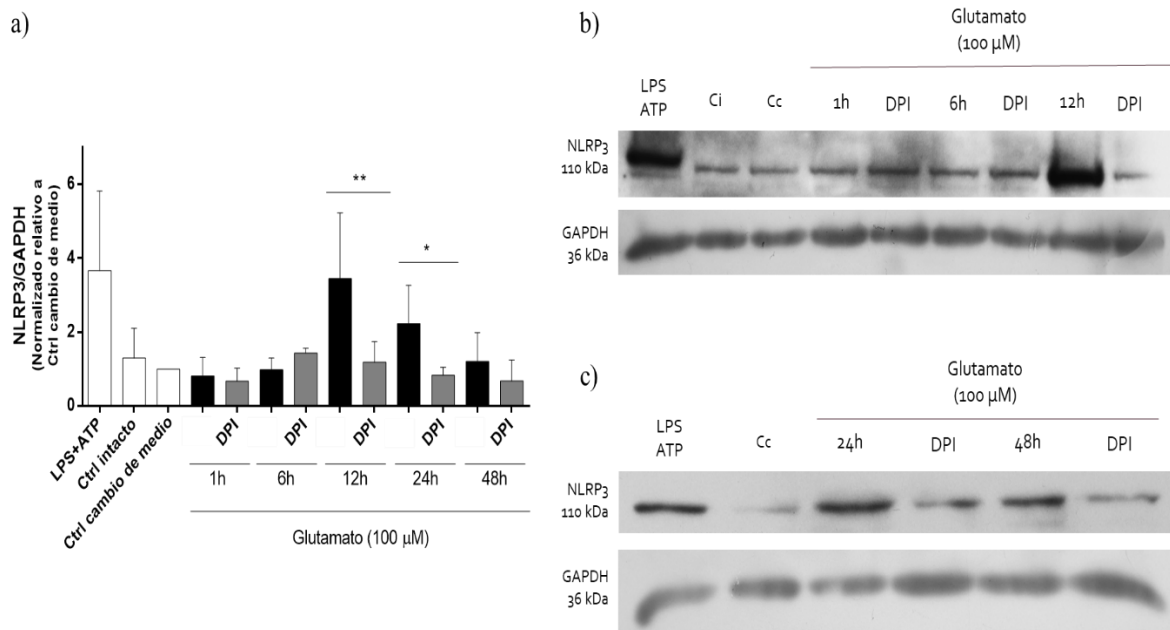


Fig. 12. Papel de las NOX en la presencia del receptor NLRP3 en NGC. a) Las barras indican el valor de las densitometrías de la relación NLRP3/GAPDH y los resultados se encuentran normalizados con relación al control cambio de medio. Los datos son la media estadística \pm SD de 3 experimentos independientes. $p < 0.05$ (*) indica significancia entre el tiempo y el tratamiento con DPI. En b) y c) se observan imágenes representativas del ensayo por Western blot, en donde se muestra el efecto del DPI sobre los niveles del NLRP3 a 1, 6 y 12h posteriores al estímulo, y a las 24 y 48h, respectivamente. En ambas, se muestra un control positivo (LPS y ATP), un control intacto (Ci) y uno de cambio de medio (Cc). Como control de carga, se muestra el bandeo de GAPDH.

8.5 Análisis de la actividad del Inflamasoma NLRP3

Con la finalidad de determinar la actividad catalítica del inflamasoma NLRP3, se evaluaron la actividad proteolítica de la caspasa-1 y la concentración en sobrenadantes de los productos directos del complejo, la IL-1 β y la IL-18.

8.5.1 Actividad de Caspasa-1

La actividad de esta proteasa se midió por un ensayo de cinética enzimática por fluorescencia. En la Figura 13.a, se observa la actividad caspasa-1 en las NGC durante el evento excitotóxico producido por la administración de glutamato. A partir de las 12h, la actividad proteolítica de la caspasa-1 se encuentra incrementada 0.73 (\pm 0.47) veces, en relación con el control de cambio de medio ($p < 0.05$). A partir de las 24h y hasta las 48h se observa un mayor incremento de 1.73 (\pm 0.82) y 1.29 (\pm 0.4) veces lo registrado en el control cambio de medio ($p < 0.001$), respectivamente. Por otro lado, la inhibición de NOX tiene efecto únicamente a las 24h y 48h, mostrando una disminución de la actividad de 1.36 (\pm 0.33) y 1.15 (\pm 0.53) veces respectivamente, siendo estos los tiempos en los que se registró mayor actividad de la caspasa-1 (Figura 13.b). Además, el H₂O₂ por sí solo es capaz de incrementar la actividad de caspasa-1 en los cultivos primarios de NGC (Fig. Suplementaria B).

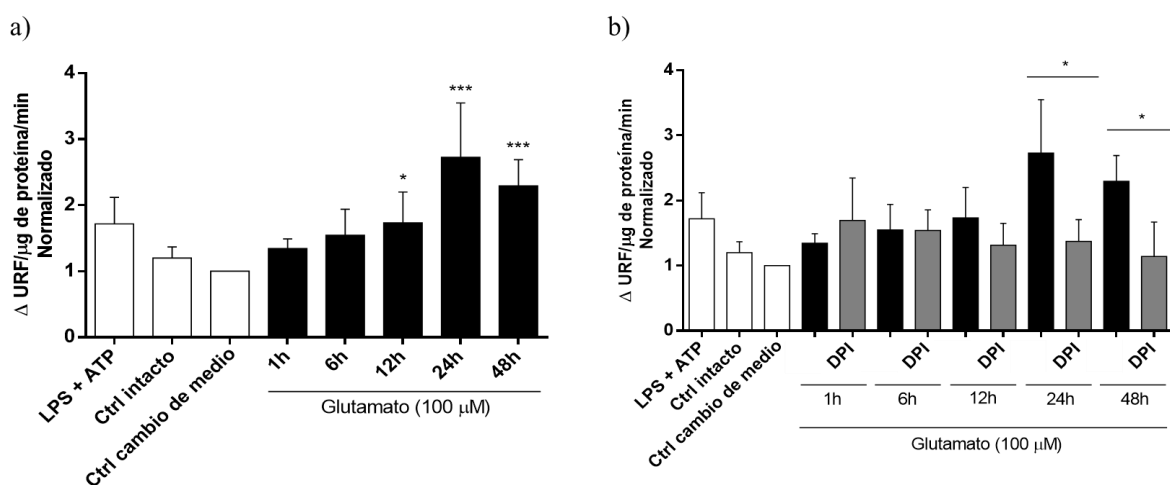


Fig. 13. El aumento de la actividad de caspasa-1 como componente importante del inflamasoma NLRP3. En a) se observa la actividad de la proteasa posterior a la administración de glutamato; los datos significativamente diferentes con respecto al control de cambio de medio son indicados con * ($p < 0.05$) y *** ($p < 0.001$). Por otro lado, en b) se muestran los valores correspondientes al tratamiento de inhibición de NOX comparados con los distintos tiempos post-daño, mostrando significancia * ($p < 0.05$). Los resultados de esta figura corresponden a 4 experimentos independientes.

8.5.2 Perfil de Citocinas

Como último acercamiento para caracterizar el estado de activación del inflamasoma NLRP3 se procedió a evaluar la presencia de las citocinas IL-1 β e IL-18 en el sobrenadante de los cultivos de NGC. En cuanto a la IL-1 β (Figura 14), las variaciones en los datos obtenidos en el ensayo no permitieron determinar diferencias entre los grupos, lo cual podría deberse a que la cantidad de IL-1 β producida en neuronas es muy baja, a tal grado que, a pesar de concentrar la muestra, el ensayo por ELISA no fue capaz de detectar con precisión la concentración de citocina, razón por la cual es importante considerar la repetición del ensayo con la utilización de una ELISA con mayor sensibilidad.

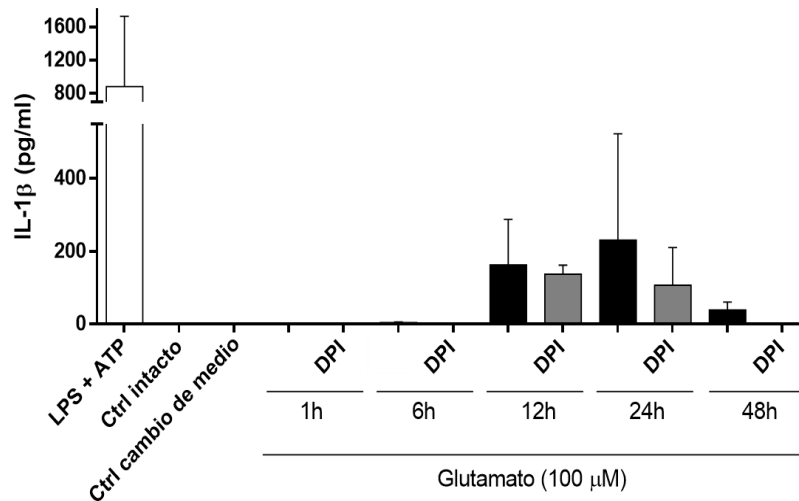


Fig. 14. Niveles de IL-1 β en sobrenadantes de cultivos de NGC. Las barras indican las medias estadísticas \pm SD de dos experimentos independientes, en los cuales se evaluó la presencia de la citocina a 1, 6, 12, 24 y 48h posteriores al daño agudo por glutamato, así como el efecto de la inhibición de NOX con DPI. Condiciones controles: control positivo (LPS y ATP), control intacto (Ci), y control cambio de medio (Cc).

Además, de manera demostrativa se muestran las fotografías de un ensayo de inmunocitoquímica, en el cual podemos constatar la marca dentro del soma de las NGC (Figura 15). Observamos una mayor intensidad en la señal fluorescente en las células a las 12 y 24h posteriores al daño excitotóxico. Sin embargo, cabe señalar que se requieren más ensayos para corroborar estos datos.

Los resultados anteriores sugieren la presencia de IL-1 β en las neuronas granulares cerebelares en respuesta a un estímulo excitotóxico por glutamato.

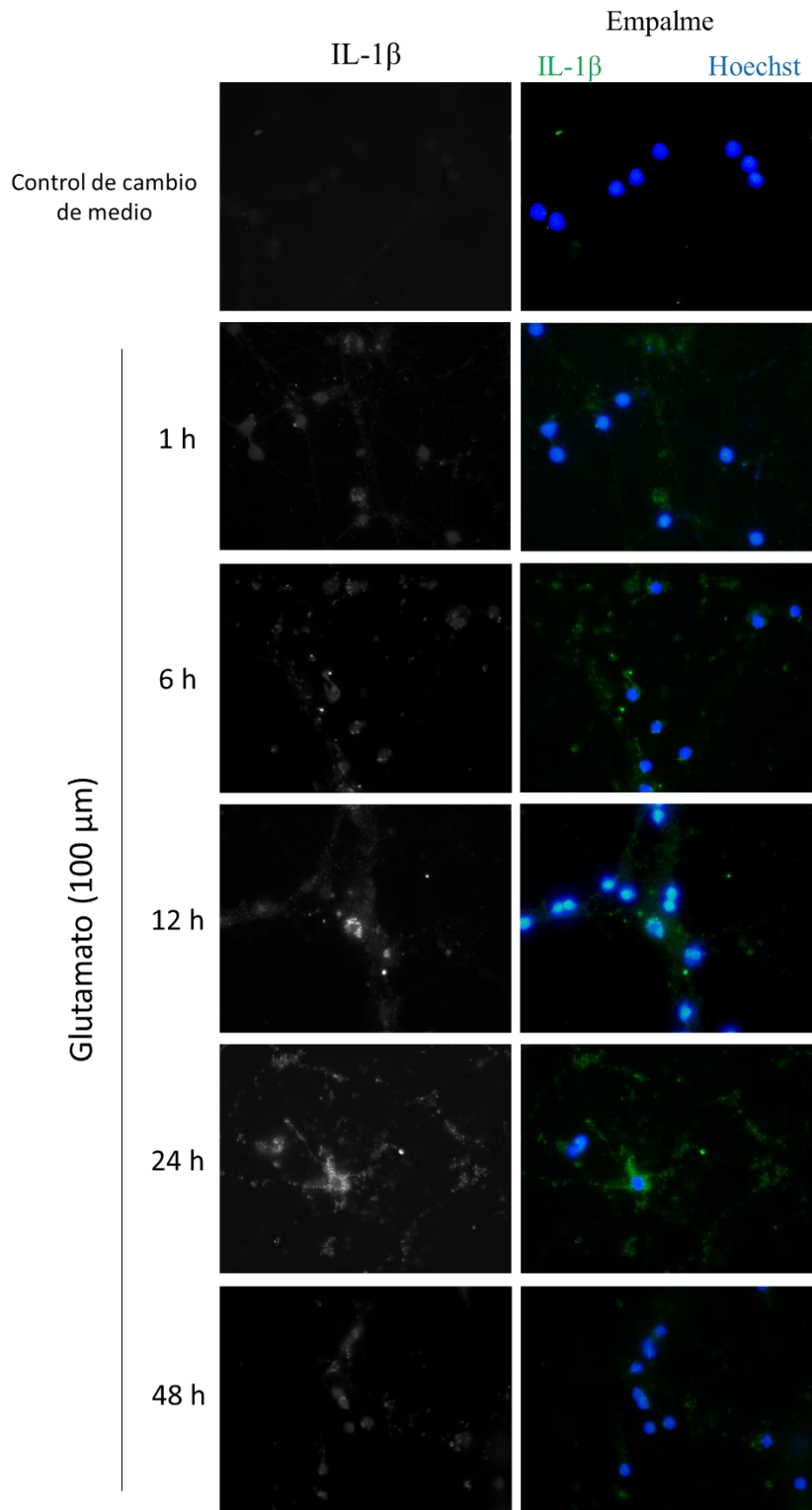


Fig. 15. Inmunocitoquímica demostrativa que constata la presencia de IL-1 β en NGC sometidas a daño excitotóxico. Se muestra la señal fluorescente correspondiente a la marca de IL-1 β , así como el empalme de imágenes, indicando tanto la marca de la citocina, como la tinción del núcleo con Hoechst. Se tratan de fotografías representativas de un experimento, a 1, 6, 12, 24 y 48h posteriores a la administración de glutamato, así como un control de cambio de medio, como referencia.

También se evaluaron los niveles de la IL-18, cuya maduración también es dependiente del inflammasoma NLRP3, por medio de la actividad de caspasa-1. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16; en el inciso *a* se observa el curso temporal de la presencia de esta citocina en los sobrenadantes de los cultivos de NGC estimulados por la administración de glutamato. Contrario a lo esperado, desde la primera hora post-administración, ocurre una disminución del 62.47% en la concentración de la citocina con respecto al control de cambio de medio (de 4328 ± 803 pg/ml del control de cambio de medio, a 1625 ± 190 pg/ml). Estos niveles se recuperan gradualmente hasta las 12h ($p < 0.05$), tiempo en el que ya no existen diferencias con el control. Sin embargo, a las 24 y 48h posteriores, ocurre nuevamente una disminución a $883 (\pm 177)$ pg/ml y $1946 (\pm 588)$ pg/ml, respectivamente en la producción de la IL-18. Por su parte, la inhibición de NOX por DPI, no muestra efecto más que en la primera hora, disminuyendo en un 70.38% (a 1282 ± 42 pg/ml) con respecto a la cantidad basal de IL-18 (Figura 16.*b*).

Estos resultados sugieren que las neuronas tienen la capacidad de producción y/o maduración de las interleucinas 1β y 18.

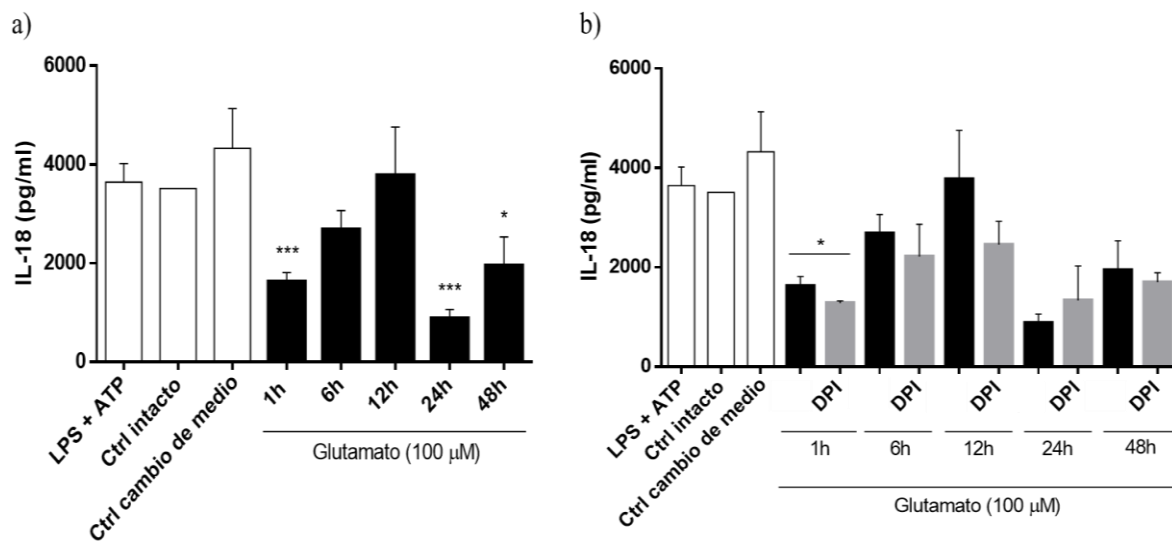


Fig. 16. Producción de IL-18 en NGC. a) La concentración de interleucina presente en los sobrenadantes neuronales a los distintos tiempos evaluados, posteriores a la lesión por glutamato. La significancia queda representada con * ($p < 0.05$) y *** ($p < 0.001$) con relación al control cambio de medio. En b) se observa el efecto del DPI sobre la producción de IL-18, observando una significancia entre tratamientos con un valor de $p < 0.05$ (*). Las barras de ambas muestran la media estadística \pm SD resultado de 3 experimentos independientes.

9. Discusión

La adición de glutamato monosódico a los cultivos primarios de NGC permite observar el comportamiento clásico del daño excitotóxico agudo en neuronas. Este modelo se caracteriza por la disminución de la viabilidad; anteriormente nuestro equipo de trabajo reportó que la administración de glutamato (100 μ M) induce aproximadamente la muerte del 50% de las neuronas tratadas a 24 horas posteriores a la estimulación (Maycotte, 2009). En el presente trabajo reportamos que la muerte neuronal observada fue de la mitad, lo cual probablemente se deba a que no se coadministró glicina, aminoácido que promueve la activación de los canales tipo NMDA, potenciando de esta manera el efecto excitotóxico. Contar con un modelo de daño excitotóxico con mayor viabilidad a las 24h nos permitió observar la respuesta de las neuronas supervivientes al daño y no sólo las características de los procesos de muerte celular. En cuanto al efecto del pretratamiento con DPI sobre la viabilidad neuronal, no observamos un efecto de neuroprotección, lo cual sugiere la existencia de mecanismos de muerte independientes de la activación de las NOX en nuestro modelo.

Como se abordó anteriormente, el incremento en la producción de ERO es considerado como un evento determinante en el daño excitotóxico. Trabajos previos de nuestro grupo reportaron en modelos *in vivo* que la administración de glutamato promueve el incremento de la producción de ERO por 12h posteriores a la estimulación del núcleo estriado en ratones (Gomez *et al*, 2011), y de 8h en el caso particular de los cultivos primarios de NGC (Maycotte, 2009). En este trabajo caracterizamos la producción de ERO en una ventana temporal más amplia, lo que permitió observar que el nivel de ERO se mantiene elevado hasta 24h posteriores a la administración de glutamato, para después descender a niveles basales a las 48h.

En relación con lo anterior, trabajos previos señalan que este incremento es resultado del aumento de la actividad de las NOX, ya que tanto en ratones deficientes de NOX2, como en los tratados con inhibidores farmacológicos de las NOX (apocinina), se ha reportado la disminución en la producción de ERO durante el evento excitotóxico (Gomez *et al*, 2011). En nuestro modelo observamos que la administración de glutamato promueve un aumento de la actividad de las NOX en tiempos específicos; el primero solo una hora después del estímulo y el segundo a las 12h. Después de la primera hora, la actividad vuelve a los niveles

basales, debido probablemente a que dicho aumento se produce por efecto directo de la unión del glutamato a sus receptores (Girouard *et al*, 2009; Brennan *et al*, 2009; Brennan *et al*, 2013), pero es regulado negativamente por mecanismos homeostáticos tales como las barreras antioxidantes. El segundo aumento observado a las 12h se mantiene hasta las 24h, debido probablemente a que, en este punto, la actividad de las NOX forma parte de una respuesta compleja al daño neuronal ocasionado por el aumento de glutamato. Un argumento a favor de esta hipótesis es que moléculas que participan en la respuesta inflamatoria, tales como la IL-1 β , mantiene una importante asa de retroalimentación positiva con la NOX2 (Chen *et al*, 2011). Esta respuesta bifásica se ha observado en modelos *in vivo* de daño excitotóxico realizados por nuestro grupo (Hernández y Morán, en publicación).

Para corroborar la participación de las NOX en el aumento de las ERO durante el daño excitotóxico, implementamos la inhibición farmacológica de la enzima por medio de DPI y AEBSF. Por una parte, el AEBSF interfiere en la formación del complejo, en la unión de p47^{phox} y p67^{phox} con el citocromo *b*₅₅₉ (Diatchunk *et al*, 1997), mientras que el DPI, acepta un electrón de la flavina de NOX, formando un aducto covalente (O'Donnel *et al*, 1993). Sin embargo, ambos son considerados como inespecíficos, dado que el DPI es un inhibidor de flavoproteínas de amplio espectro, limitando no sólo la NOX, sino también la xantina oxidasa, la óxido nítrico sintasa (NOS) y proteínas de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria (Wind *et al*, 2010; Lambert *et al*, 2008); mientras que el AEBSF actúa sobre todas las proteasas de serina (Diatchunk *et al*, 1997). Con estas consideraciones, ambos compuestos disminuyen la actividad de NOX en los puntos cruciales de actividad suscitada por daño excitotóxico. Se decidió trabajar con DPI como inhibidor de NOX por su papel en eventos inflamatorios ligados especialmente al inflamasoma NLRP3 (Dostert *et al*, 2008; Hewinson *et al*, 2008; van Bruggen *et al*, 2010).

En nuestro modelo, el tratamiento con DPI disminuyó la actividad de las NOX y la producción de ERO en tiempos cortos (hasta las 6h); sin embargo, a pesar de que observamos la disminución de la actividad de las NOX también a las 24h, esta no se acompaña de la disminución de ERO. La falta de correlación entre la disminución de la actividad de las NOX y la producción de ERO a las 24h, sugiere que en estos tiempos el aumento de ERO depende de otros sistemas enzimáticos independientes de las NOX, como fosfolipasas,

ciclooxigenasas, lipooxigenasas, xantina oxidasa y la propia mitocondria cuya actividad se ha descrito en NGC (Bobba *et al*, 2008). Es destacable que el DPI por sí solo, dada su naturaleza química de inhibición a flavoproteínas, se ha asociado a la alteración de múltiples rutas metabólicas, e incluso es capaz de inducir y/o potenciar el estrés oxidante celular y fomentar un incremento en la cantidad de ERO (Riganti *et al*, 2004; Lambert *et al*, 2008).

Debido a que la respuesta inflamatoria es determinante en la resolución de daño y la muerte neuronal excitotóxica, estudiamos el papel del inflamasoma NLRP3 en dicho evento. Por lo que evaluamos los siguientes parámetros de activación: cuantificación proteica del receptor NLRP3, actividad de caspasa-1 y perfil de las citocinas IL-1 β e IL-18.

En este trabajo observamos que 12h después de la administración de glutamato, ocurre un incremento en la proteína NLRP3 y que dicho aumento se mantiene hasta las 24h. Por su parte, la caspasa-1 se activa ligeramente a partir de las 12h y permanece aumentada hasta las 48h. Estos resultados indican que la regulación del inflamasoma se lleva a cabo por una activación limitada de la caspasa-1 seguida por un incremento de los niveles del NLRP3. La activación de caspasa-1 podría deberse a un aumento de la capacidad proteolítica existente del complejo, y después como consecuencia de un aumento a nivel transcripcional. Se ha propuesto la participación de mecanismos de activación no transcripcionales como modificaciones postraduccionales, incluyendo fosforilaciones y/o ubiquitinación ya sea del propio receptor o de la proteína ASC (Juliana *et al*, 2012; Hara *et al*, 2013; Song *et al*, 2017). No se puede descartar, además, que la actividad de caspasa-1 esté asociada a la activación de otros complejos como el inflamasoma NLRP1, como ha sido descrito en otros modelos (Gorfu *et al*, 2014).

Por otra parte, sabiendo que el incremento en la producción de ERO constituye un evento principal durante el daño excitotóxico, se evaluó directamente su efecto sobre el estado de activación del inflamasoma. Para corroborar dicha asociación, se administró H₂O₂ al cultivo de NGC. De manera interesante, esta condición produjo un incremento en la actividad de caspasa-1 y en la presencia del receptor NLRP3; esto constata la participación de las ERO en la activación del inflamasoma NLRP3 en neuronas. Además, como perspectiva a este trabajo, resultaría de interés la utilización de antioxidantes para confirmar la contribución de ERO en la regulación del inflamasoma.

Los datos obtenidos sugieren que la respuesta celular frente al daño excitotóxico en NGC cursa con dos fases. Una primera fase ocurre dentro de las primeras 6h posteriores al estímulo y se caracteriza por un aumento tanto en la actividad de NOX como en la producción de ERO, así como una disminución de IL-18. En este sentido, se ha reportado en otros modelos que un aumento en la actividad de NOX2 regula positivamente la activación de NFκB (Han *et al*, 2013). Se sabe que dicho factor de transcripción participa en la regulación de las interleucinas, lo que podría explicar la relación inversa del aumento de la actividad de las NOX y la producción de IL-18 en nuestro modelo. La segunda fase observada, sucede de las 12h a 24h, en la cual observamos de nueva cuenta un aumento en la actividad de las NOX y la permanencia de los niveles aumentados de ERO. En esta fase, estos fenómenos se encuentran estrechamente relacionados con un aumento en los niveles de proteína del NLRP3 y de la actividad de caspasa-1. Esta asociación de eventos se apoya en los resultados obtenidos con los cultivos a los que se les pretrató con DPI. Además, este hallazgo es respaldado por otros estudios en diferentes tipos celulares, en los cuales se asocia a la actividad de las NOX en la regulación del inflamasoma, tanto en modelos *in vitro* (Dostert *et al*, 2008; Hewinson *et al*, 2008; van Bruggen *et al*, 2010; Sun *et al*, 2015), como *in vivo*, definiendo la participación específica de los homólogos NOX2 y NOX4, a través de ERO y la proteína TXNIP (Chen *et al*, 2011; Dostert *et al*, 2008; Sun *et al*, 2015; Shah *et al*, 2015; Gao *et al*, 2015).

La relación que observamos entre los niveles de ERO y la activación del inflamasoma a lo largo del tiempo, indican que la activación del complejo se lleva a cabo en condiciones redox muy específicas y bajo una regulación muy fina; este argumento también ha sido sugerido por Abais y colaboradores (2015), destacando la importancia del estado redox *ergo* el papel específico de ERO en la activación del inflamasoma NLRP3.

Es importante destacar que, a pesar de que el objetivo de este trabajo fue caracterizar la participación de las NOX y ERO en la activación del inflamasoma NLRP3 ante daño excitotóxico, no podemos hacer a un lado el papel que juega el influjo de calcio en la regulación de este complejo, cuyos efectos no deben ser descartados en este modelo, ya que se ha reportado como partícipe en la activación del inflamasoma NLRP3 mediado por TXNIP

y NOX (Tseng *et al*, 2016), además de su efecto en la activación de NOX (Fann *et al*, 2013), de la caspasa-1 y el procesamiento de IL-1 β (Rada *et al*, 2014).

Los resultados preliminares de la determinación de los niveles de IL-1 β en los sobrenadantes de los cultivos de NGC correlacionan con la localización celular de la marca para la interleucina en los tiempos donde aumenta la actividad de caspasa-1. Para establecer el papel de las NOX en la regulación de la producción de IL-1 β , es preciso determinar con más detalle la ubicación intracelular de la marca de la citocina, así como del receptor NLRP3 y del componente ASC; datos que resultarían de apoyo para confirmar que el inflamasoma se encuentra activo (Misawa *et al*, 2013). Königsberg (2017) reportó que, en un modelo de senescencia, la secreción de IL-1 α en cultivos de astrocitos se encuentra en el rango de 5pg/ml que, a pesar de la baja concentración, muestra tener efecto en la progresión de la senescencia celular. Esta citocina, es de la familia de la interleucina-1, y al igual que la IL-1 β se le considera proinflamatoria. Por lo anterior, es probable que los resultados no concluyentes sobre la concentración de IL-1 β en nuestro modelo, se deban a que las neuronas secreten una cantidad de citocina que no es posible detectar adecuadamente por los métodos empleados.

Nuestros resultados indican que el aumento extracelular de glutamato promueve la disminución en la producción de IL-18 tanto en la primera (1h) como en la segunda fase (24h) de daño, lo cual podría ser parte del mecanismo de muerte neuronal, ya que dicha interleucina se asocia a la activación de vías de neuroprotección (Andoh *et al*, 2008); o bien, como parte de la regulación que ejerce sobre la liberación y captación de glutamato en la presinapsis (Kanno *et al*, 2004; Francesconi *et al*, 2016). En nuestro estudio, la disminución de IL-18 a las 24h, guarda relación con el aumento en la cantidad de NLRP3 y de la activación de caspasa-1, lo cual es concordante con reportes previos que señalan una relación inversamente proporcional entre la producción de IL-1 β y la IL-18 (Lin *et al*, 2013); aunque en este trabajo no fuimos capaces de constatar el aumento en la producción de IL-1 β , los parámetros cuantificados son sugerentes de su producción en este modelo. Otra muestra del dinamismo en cuanto a la producción de interleucinas puede observarse en un modelo de infección por *Toxoplasma gondii*, en el cual la producción de ambas citocinas (IL-1 β e IL-18) a pesar de tratarse del mismo estímulo bacteriano presenta discrepancias entre el ensayo *in vitro* como

in vivo (Gorfu *et al*, 2014), indicativo de la importancia del contexto celular y/o sistémico en la respuesta inflamatoria.

Los datos presentados contribuyen a la caracterización de la activación del inflamasoma NLRP3, particularmente en la cantidad proteica del NLRP3, actividad de caspasa-1 y de los niveles de IL-18 en condiciones basales y su modificación frente a un evento excitotóxico. Esta evidencia nos acerca al entendimiento del papel del inflamasoma como parte de la homeostasis neural, por medio de la producción de IL-18. Nuestros hallazgos sobre la presencia constitutiva del NLRP3 concuerdan con reportes previos en los cuales se describe la expresión y activación del NLRP3 en neuronas corticales de rata en condiciones fisiológicas (Lammerding *et al*, 2015). De manera similar, se ha reportado que el inflamasoma se encuentra en forma de complejo preensamblado listo para su activación ante un estímulo de daño (Compan *et al*, 2012).

Existe gran cantidad de evidencia acerca de la participación del inflamasoma NLRP3 en células del sistema inmune, sin embargo, en lo que respecta al SNC aún falta por describir los mecanismos finos de su activación en la progresión de diversas situaciones patológicas (Zhou *et al*, 2016). Hasta el momento, la presencia del inflamasoma NLRP3 en microglía es indiscutible; sin embargo, aún se encuentra en debate su presencia en astrocitos y neuronas. Nuestros resultados sugieren que las NGC de rata, poseen la maquinaria necesaria para que se lleve a cabo la activación de este complejo, al menos en condiciones de excitotoxicidad. Trabajos en rata con modelos de lesión traumática cerebral (Liu *et al*, 2013) y de médula espinal (Zendedel *et al*, 2015) respaldan nuestros resultados mostrando la presencia y activación del NLRP3 en neuronas. Además, en otras condiciones patológicas en ratón tales como la isquemia y reperfusión (Fann *et al*, 2013) y modelos de esclerosis lateral amiotrófica (Debye *et al*, 2018), se reportó la presencia del NLRP3 en el citosol de neuronas corticales y del núcleo anterodorsal del tálamo, respectivamente.

No se ha identificado un mecanismo principal de activación del inflamasoma en astrocitos y microglía, lo que podría ser reflejo de la multiplicidad de estímulos que pueden activarlo. Es probable que la diversidad de mecanismos que participan en su regulación sea la causa de la aparente ausencia del NLRP3 en neuronas reportada en otros modelos, como

de isquemia por oclusión de la arteria media cerebral (Yang *et al*, 2014) y en cultivos neuronales humanos con enfermedad de Alzheimer (Kaushal *et al*, 2015).

Finalmente, no podemos perder de vista la participación de otros inflamomas caracterizados ampliamente en neuronas, tales como el NLRP1 (Liu *et al*, 2004; Walsh *et al*, 2014). Por estos motivos, es necesario ampliar la evidencia de la presencia del inflamoma NLRP3 y su activación durante el daño excitotóxico, prestando particular atención en la ubicación específica de sus elementos y su interacción con estructuras reguladoras (Bauernfeind *et al*, 2009).

10. Conclusiones

Una condición excitotóxica en NGC incrementa los niveles celulares de ERO hasta por 24h posteriores a la estimulación. Esta condición provoca un aumento en la actividad de las NOX y promueve un incremento en los niveles proteicos del receptor NLRP3 y en la actividad de caspasa-1. Tanto el aumento del receptor NLRP3 como de la actividad de caspasa-1 son parcialmente dependientes de ERO y particularmente, de la activación de NOX. De manera general, una condición excitotóxica induce la producción de IL-1 β y una disminución en la producción de IL-18. Estos datos demuestran por primera vez la presencia y activación del inflamoma NLRP3 en neuronas granulares de cerebelo y su participación en un evento de muerte neuronal. Además, los resultados en su conjunto sugieren un papel del inflamoma NLRP3 en la homeostasis neuronal.

11. Figuras Suplementarias

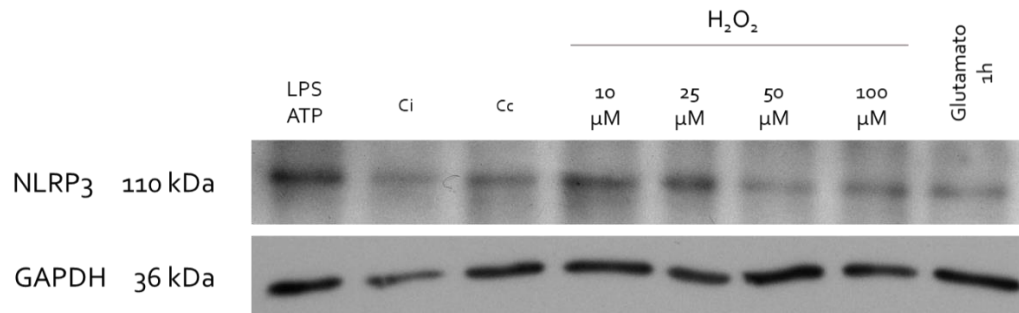


Figura A. El peróxido de hidrógeno induce un incremento del receptor NLRP3. Se muestra un experimento, en el cual es posible observar que únicamente las concentraciones más bajas evaluadas (10 y 24 μM) producen un incremento en la presencia del receptor citosólico en contraste a los controles intacto (Ci) y de cambio de medio (Cc).

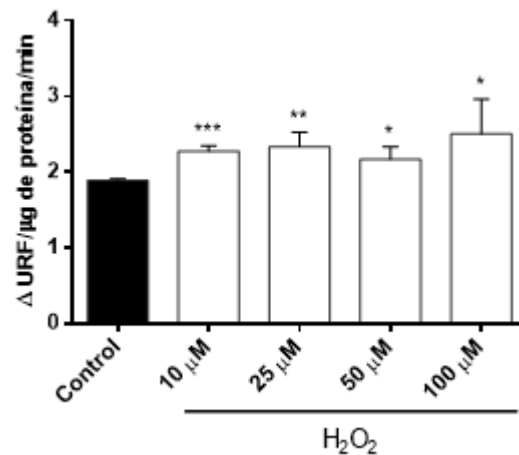


Figura B. El peróxido de hidrógeno induce un incremento en la actividad de caspasa-1. Se evaluaron distintas concentraciones de H₂O₂, sin embargo, entre ellas no hay diferencia estadística, la más baja de ellas (10μM) fue capaz de registrar un incremento de la actividad proteolítica de la enzima. Las barras indican la media estadística ±SD de 3 experimentos independientes, en donde la significancia está dada con respecto al control con un valor de p<0.05 (*), p<0.01 (**), y p<0.001 (***).

12. Bibliografía referida

- Abais J., Xia M., Zhang Y., Boini K. & Li P. (2015) "Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector" En *Antioxidants & Redox Signaling* 22(13):1111-1129.
- Abderrazak A., Syrovets T., Couchie D., Hadri K., Friguet B., Simmet T. & Rouis M. (2015) "NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases" En *Redox Biology* 4:296-307.
- Agostinho P., Duarte C. & Oliveira C. (1997) "Impairment of excitatory amino acid transporter activity by oxidative stress conditions in retinal cells: effect of antioxidants" En *FEBS J* 11:154-163.
- Aguirre J. y Lambeth D. (2010) "Nox enzymes from fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals" En *Free Radical Biology & Medicine* 49:1342-1353.
- Andoh T., Kishi H., Motoki K., Nakanishi K., Kuraishi Y. & Muraguchi A. (2008) "Protective effect of IL-18 on kainate- and IL-1 beta-induced cerebellar ataxia in mice" En *J Immunol* 180(4):2322-2328.
- Ankarcrona M., Dypbukt E., Bonfoco E., Zhivotovsky B., Orrenius S., Lipton S. & Nicotera P. (1995) "Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function" En *Neuron* 15(4):961-973.
- Atlante A., Calissano P., Bobba A., Giannattasio S., Marra E. & Passarella S. (2001) "Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria" En *FEBS Letters* 497(1):1-5.
- Babior B. (1999) "NADPH oxidase: an update" En *Blood* 93:1464-1476.
- Bae J. & Park H. (2011) "Crystal structure of NALP3 protein pyrin domain (PYD) and its implications in inflammasome assembly" En *J Biol Chem* 286:39528-39536.
- Bahuguna A., Khan I., Bajpai V. & Sun Chul (2017) "MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug" En *Bangladesh J Pharmacol* 12:115-118.
- Bauernfeind F., Horvath G., Stutz A., Alnemri E., MacDonald K., Speert D., Fernandes T., Wu J., Monks B., Fitzgerald K., Hornung V. & Latz E. (2009) "Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression" En *J Immunol* 183(2):787-791.
- Bauernfeind F., Ablasser A., Bartok E., Kim S., Schmid J., Cavlar T. & Hornung V. (2011) "Inflammasomes: current understanding and open questions" En *Cell. Mol. Life Sci.* 68:765-783.
- Bobba A., Atlante A., Petragallo V. & Marra E. (2008) "Different sources of reactive oxygen species contribute to low potassium-induced apoptosis in cerebellar granule cells" En *International Journal of Molecular Medicine* 21:737-745.
- Boldyrev A., Carpenter D., Huentelman M., Peters C. & Johnson P. (1999) "Sources of reactive oxygen species production in excitotoxin-stimulated cerebellar granule cells" En *Biochemical and Biophysical Research Communications* 256:320-3240.
- Bradford M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" En *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

- Bratosin D., Mitrofan L., Palii C., Estaquier J. & Montreuil J. (2005) "Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging" En *Journal of Quantitative Cell Science* 66A(1):78-84.
- Brennan A., Won S., Joon S., Narasimhan P., Kauppinen T., Lee H., Edling Y., Chan P. & Swanson R. (2009) "NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation" En *Nature Neuroscience* 12(7):857-864.
- Brennan A., Shen Y., Benna J. & Swanson R. (2013) "Phosphoinositide 3-kinase couples NMDA receptors to superoxide release in excitotoxic neuronal death" En *Cell Death and Disease* 4:e580.
- Brown D. & Griendling K. (2009) "Nox proteins in signal transduction" En *Free Radical Biology & Medicine* 47:1239-1253.
- Brown G. (2007) "Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase" En *Biochemical Society Transactions* 35(5):1119-1121.
- Chavarría J. & Vance R. (2015) "The NLRP1 inflammasomes" En *Immunological Reviews* 265:22-34.
- Chen H., Kim G., Okami N., Narasimhan P. & Chan P. (2011) "NADPH oxidase is involved in post-ischemic brain inflammation" En *Neurobiology of Disease* 42(3):341-348.
- Chung I., OuYang C., Yuan S., Li H., Chen J., Shieh H., Chen Y., Ojcius D., Chu C., Yu J., Chang Y. & Chen L. (2016) "Pyk2 activates the NLRP3 inflammasome by directly phosphorylating ASC and contributes to inflammasome-dependent peritonitis" En *Scientific Reports* 6:36214.
- Clements J., Lester R., Tong G., Jahr C. & Westbrook G. (1992) "The time course of glutamate in the synaptic cleft" En *Science* 258:1498-1501.
- Compan V., Baroja A., López G., Gomez A., Martínez C., Angosto D., Montero M., Herranz A., Bazán E., Reimers D., Mulero V. & Pelegrín P. (2012) "Cell volume regulation modulates NLRP3 inflammasome activation" En *Cell Immunity* 37(3):487-500.
- Covarrubias L., Hernández D., Schnabel D., Salas E. & Castro S. (2008) "Fuction of reactive oxygen species during animal development: Passive or active?" En *Developmental Biology* 320:1-11.
- Coyoy A., Olgúin M., Martínez P. & Morán J. (2013) "Role of reactive oxygen species and NADPH-Oxidase in the development of rat cerebellum" En *Neurochemistry International* 62(7):998-1011.
- Crack P., Taylor J., Ali U., Mansell A. & Hertzog P. (2006) "Potential contribution on NF-kappaB in neuronal cell death in the glutathione peroxidase-1 knockout mouse in response to ischemia-reperfusion injury" En *Stroke* 37(6):1533-1538.
- Dasuri K., Zhang L. & Keller J. (2013) "Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis" En *Free radical biology & medice* 62:170-185.
- Davis B., Wen H. & Ting J. (2011) "The inflammasome NLR's in immunity, inflammation and associated diseases" En *Annual Review of Immunology* 29:707-735.
- Debye B., Schmülling L., Zhou L., Rune G., Beyer C. & Johann S. (2018) "Neurodegeneration and NLRP3 inflammasome expression in the anterior thalamus of SOD1(G93A) ALS mice" En *Brain Pathology* 28(1):14-27.
- Deffert C., Cachat J. & Krause K. (2014) "Phagocyte NADPH oxidase chronic granulomatous disease and mycobacterial infections" En *Cellular Microbiology* 16(8):1168-1178.

- Diatchuk V., Lotan O., Koshkin V., Wikstroem P. & Pick E. (1997) "Inhibition of NADPH oxidase activation by 4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride and related compounds" En *J Biol Chem* 272:13292-13301.
- Dinarello A. (2009) "Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family" En *Annual Review of Immunology* 27:519-550.
- Doble A. (1999) "The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy" En *Pharmacol Ther* 81(3):163-221.
- Dröge W. (2002) "Free radicals in the physiological control of cell function" En *Physiol Rev* 82:47-95.
- Dostert C., Pétrilli V., Van Bruggen R., Steele C., Mossman B. & Tschopp J. (2008) "Innate immune activation through Nlrp3 inflammasome sensing of asbestos and silica" En *Science* 320(5876):674-677.
- Dykens J., Stern A. & Trenkner E. (1987) "Mechanism of kainate toxicity to cerebellar neurons *in vitro* is analogous to reperfusion tissue injury" En *J Neurochem* 49(4):1222-1228.
- Elliott E. & Sutterwala F. (2015) "Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly" En *Immunological Reviews* 265:35-52.
- Escobar M. & Pimienta H. (2003) "Sistema Nervioso" *Programa Editorial Universidad del Valle*.
- Fann D., Lee S., Manzanero S., Chunduri P., Sobey C. & Arumugam T. (2013) "Pathogenesis of acute stroke and the role of inflammasomes" En *Ageing Res Rev* 12(4):941-966.
- Fann D., Lee S., Manzanero S., Tang S., Gelderblom M., Chunduri P., Bernreuther C., Glatzel M., Cheng Y., Thundiyil J., Widiapradja A., Lok K., Foo S., Wang Y., Li Y., Drummond G., Basta M., Magnus T., Jo D., Mattson M., Sobey C. & Arumugam T. (2013) "Intravenous immunoglobulin suppresses NLRP1 and NLRP3 inflammasome-mediated neuronal death in ischemic stroke" En *Cell Death and Disease* 4:e790.
- Fann D., Lim Y., Cheng Y., Lok K., Chunduri P., Baik S., Drummond G., Dheen S., Sobey C., Jo D., Chen C. & Arumugam T. (2018) "Evidence that NF- κ B and MAPK signaling promotes NLRP inflammasome activation in neurons following ischemic strokes" En *Mol Neurobiol* 55(2):1082-1096.
- Forrester S., Kikuchi D., Hernandez M., Xu Q. & Griendling K. (2018) "Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling" En *Circulation Research* 122:877-902.
- Francesconi W., Sánchez M., Berton F., Alboni S., Benatti C., Mori S., Nguyen W., Zorrilla E., Moroncini G., Tascedda F. & Conti B. (2016) "The proinflammatory cytokine interleukin 18 regulates feeding by acting on the bed nucleus of the stria terminalis" En *The Journal of Neuroscience* 36(18):5170-5180.
- Free B., Clark J., Amara S. y Sibley D. en Brunton L., Hilal R. y Knollmann B. (2018) "Chapter 14: Neurotransmission in the Central Nervous System" En Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics, Mc Graw Hill Education 13a edición.
- Freeman L., Guo H., David C., Brickey W.J., Jha S. & Ting J. (2017) "NLR members NLRC4 and NLRP3 mediate sterile inflammasome activation in microglia and astrocytes" En *Journal of Experimental Medicine* 214(5):1351-1370.
- Furnkranz A. & Leitinger N. (2004) "Regulation of inflammatory responses by oxidized phospholipids: structure-function relationships" En *Curr Pharm Des* 10:915-921.

- Gao P., He F., Tang H., Lei C., Chen S., Meng X., Su H. & Zhang C. (2015) "NADPH Oxidase-induced NALP3 inflammasome activation is driven by thioredoxin-interacting protein which contributes to podocyte injury in hyperglycemia" En *J Diabetes Res* 2015:504761.
- Gao X., Belmadani S., Picchi A., Xu X., Potter B., Tewari N., Capobianco S., Chilian W. & Zhang C. (2007) "Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in Lepr(db) mice" En *Circulation* 115:245-254.
- García O. y Massieu L. (2004) "Interacción entre las células gliales y neuronales y su papel en la muerte y sobrevivencia neuronal" En *Arch Neurocién* 9(1):39-46.
- Girouard H., Wang G., Gallo E., Anrather J., Zhou P., Pickel V. & Iadecola C. (2009) "NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2" En *The Journal of Neuroscience* 29(8):2545-2552.
- Gorfu G., Cirelli K., Melo M., Mayer K., Crown D., Koller B., Masters S., Sher A., Leppla S., Moayeri M., Saeig J. & Grigg M. (2014) "Dual role of inflammasome sensors NLRP1 and NLRP3 in murine resistance to *Toxoplasma gondii*" En *mBio* 5(1):e01117-13-.
- Gu N., Kim J., Han I., Im S., Seo M., Chung Y. & Ryu J. (2016) "Trichomonas vaginalis induces IL-1 β production in a human prostate epithelial cell line by activating the NLRP3 inflammasome via reactive oxygen species and potassium ion efflux" En *The Prostate* 76:885-896.
- Gu Y., de C. & Shen J. (2011) "Interaction of free radicals, matrix metalloproteinases and caveolin-1 impacts blood-brain barrier permeability" En *Front Biosci (Schol Ed)* 3:1216-1231.
- Guo H., Callaway J. & Ting J. (2015) "Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics" En *Nature Medicine* 21(7):677-687.
- Guemez A. & Morán J. (2009) "NOX2 mediates apoptotic death induced by staurosporin but not by potassium deprivation in cerebellar granule neurons" En *Journal of Neuroscience Research* 87:2531-2540.
- Guemez A., Estrada A., Montiel T., Páramo B., Massieu L. & Morán J. (2011) "Activation of NOX2 by the stimulation of ionotropic and metabotropic glutamate receptors contributes to glutamate excitotoxicity *in vivo* through the production of reactive oxygen species and calpain activation" En *J Neuropathol Exp Neurol* 70(11):1020-1035.
- Halliwell B. (2001) "Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: Therapeutic implications for antioxidant treatment" En *Drugs & Aging* 18:685-716.
- Halliwell B. & Gutteridge J. (2015) "Chapter 6: Measurement of reactive species" En *Free Radicals in Biology and Medicine*, OUP Oxford 5a Edición.
- Han W., Li H., Cai J., Gleaves L., Polosukhin V., Segal B., Yull F. & Blackwell T. (2013) "NADPH oxidase limits lipopolysaccharide-induced lung inflammation and injury in mice through reduction-oxidation regulation of NF κ B activity" En *J Immunol* 190(9):4786-4794.
- Hara H., Tsuchiya K., Kawamura I., Fang R., Hernandez E., Shen Y., Mizuguchi J., Schweighoffer E., Tybulewicz V. & Mitsuyama M. (2013) "Phosphorylation of the adaptor ASC acts as a molecular switch that controls the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity" En *Nature Immunology* 14(12):1247-1255.

- Hassel B. y Dingleding R. en Brady S., Siegel G., Albers W. y Price D. (2012) "Chapter 17: Glutamate and glutamate receptors" En *Basic Neurochemistry. Principles of molecular, cellular, and medical neurobiology*, Academic Press-ELSEVIER 8a Edición.
- Hewinson J., Moore S., Glover C., Watts A. & MacKenzie A. (2008) "A key role for redox signaling in rapid P2X7 receptor-induced IL-1 beta processing in human monocytes" En *J Immunol* 180:8410-8420.
- Ives A., Nomura J., Martinon F., Roger T., LeRoy D., Miner J., Simon G., Busso N. & So A. (2008) "Xanthine oxidoreductase regulates macrophage IL-1 β secretion upon NLRP3 inflammasome activation" En *Nature Communications* 6:6555.
- Jander S., Schroeter M. & Stoll G. (2000) "Role of NMDA receptor signaling in the regulation of inflammatory gene expression after focal brain ischemia" En *Journal of Neuroimmunology* 109:181-187.
- Juliana C., Fernandes T., Kang S., Farias A., Qin F. & Alnemri E. (2012) "Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation" En *J. Biol. Quem.* 287:36617-36622.
- Kacimi R., Giffard R. & Yenari M. (2011) "Endotoxin-activated microglía injure brain derived endothelial cells via NF- κ B, JAK-STAT and JNK stress kinase pathways" En *J Inflamm (Lond)* 8:7.
- Kanno T., Nagata T., Yamamoto S., Okamura H. & Nishizaki T. (2004) "Interleukin-18 stimulates synaptically released glutamate and enhances postsynaptic AMPA receptor responses in the CA1 region of mouse hippocampal slices" En *Brain Res* 1012:190-193.
- Kang J., Park E., Jou I., Kim J. & Joe E. (2001) "Reactive oxygen species mediate A beta(25-35)-induced activation of BV2 microglia" En *Neuroreport* 12:1449-1452.
- Kaushal V., Dye R., Pakavathkumar P., Foveau B., Flores J., Hyman B., Ghetti B., Koller B. & LeBlanc A. (2015) "Neuronal NLRP1 inflammasome activation of caspase-1 coordinately regulates inflammatory interleukin-1-beta production and axonal degeneration-associated Caspase-6 activation" En *Cell Death and Differentiation* 22:1676-1686.
- Königsberg M. (2017) "Redox state's role in the mechanisms and signaling pathways of senescence induction" En Miranda R., Pérez L., Salas E., Gutiérrez G., De Las Peñas A. (Comité). *VI Congreso de Especies Reactivas de Oxígeno en Biología y Medicina*. Congreso llevado a cabo por la Sociedad Mexicana de Bioquímica en Puebla, México.
- Kumagai T., Matsukawa N., Kaneko Y., Kusumi Y., Mitsumata M. & Uchida K. (2004) "A lipid peroxidation-derived inflammatory mediator: identification of 4-hydroxy-2-nonenal as a potential inducer of cyclooxygenase-2 in macrophages" En *J Biol Chem* 279:48389-48396.
- Lafon M., Culcasi M., Gaven F., Pietri S. & Bockaert J. (1993) "Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: putative mediators of NMDA-induced cell death in cerebellar granule cells" En *Neuropharmacology* 32:1259-1266.
- Lai T., Zhang S. & Wang Y. (2014) "Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection" En *Progress in Neurobiology* 115:157-188.
- Lambert A., Buckingham J., Boysen H. & Brand M. (2008) "Diphenyliodonium acutely inhibits reactive oxygen species production by mitochondrial complex I during reverse, but not forward electron transport" En *J Biol Chem* 1777:397-403.
- Lambeth D. (2004) "NOX enzymes and the biology of reactive oxygen" En *Nature Reviews Immunology* 4:181-189.

- Lamkanfi M. & Dixit V. (2014) “Mechanisms and functions of inflammasomes” En *Cell* 157:1013-1022.
- Lammerding L., Slowik A., Johann S., Beyer C. & Zendedel A. (2015) “Pststroke inflammasome expression and regulation in the peri-infarct area by gonadal steroids after transient focal ischemia in the rat brain” En *Neuroendocrinology* 103(5):460-475.
- Latz E., Xiao T. & Stutz A. (2016) “Activation and regulation of the inflammasomes” En *Nature Reviews Immunology* 13:397-411
- Le Belle J., Orozco N., Paucar A., Saxe J., Mottahedeh J., Pyle A., Wu H. & Kornblum H. (2011) “Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner” En *Cell Stem Cell* 8(1):59-71.
- Lechtenberg B., Mace P. & Riedi S. (2014) “Structural mechanisms in NLR inflammasome signaling” En *Current Opinion in Structural Biology* 29:17-25.
- Lipton S., Choi Y., Pan Z., Lei S., Chen H., Sucher N., Loscalzo J., Singel D. & Stamler J. (1991) “Synergistic effects of HIV coat protein and NMDA receptor-mediated neurotoxicity” En *Neuron* 7:111-118.
- Liu F., Lo C., Ning X., Kajkowski E., Jin M., Chiriac C., Naureckiene S., Lock Y., Pong K., Zaleska M., Jacobsen J., Silverman S. & Ozenberger B. (2004) “Expression of NALP1 in cerebellar granule neurons stimulates apoptosis” En *Cellular Signalling* 16(9):1013-1021.
- Liu H., Li W., Chen Z., Hu Y., Zhang D., Shen W., Zhou M., Zhu L. & Hang C. (2013) “Expression of the NLRP3 inflammasome in cerebral cortex after traumatic brain injury in a rat model” En *Neurochem Res* 38:2072-2083.
- Lu A. & Wu H. (2014) “Structural mechanisms of inflammasome assembly” En *FEBS Journal* 282:435-444.
- Lu A., Magupalli V., Ruan J., Yin Q., Atianand M., Vos M., Schrder G., Fitzgerald K., Wu H. & Egelman E. (2014) “Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes” En *Cell* 156(6):1193-1206.
- Man S. & Kanneganti T. (2016) “Converting roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity” En *Nat Rev Immunol* 16(1):7-21.
- Mark L., Prost R., Ulmer J., Smith M., Daniels D., Strottmann J., Brown D. & Hacein-Bey L. (2001) “Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging” En *Am J Neuroradiol* 22:1813-1824.
- Martinon F., Burns K. & Tschopp J. (2002) “The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta” En *Mol Cell* 10:417-426.
- Maycotte P. (2009) Tesis Doctoral “Papel del metabolismo energético y el estrés oxidativo sobre el tipo de muerte de neuronas granulares de cerebelo en cultivo” Programa de maestría y doctorado en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mezzasoma L., Antognelli C. & Talesa V. (2017) “A novel role for brain natriuretic peptide: inhibition of IL-1 β secretion via downregulation of NF κ B/Erk 1/2 and NALP3/ASC/Caspase-1 activation in human THP-1 monocyte” En *Mediators Inflamm* 2017:5858315.
- Michaelis E. (1998) “Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging” En *Progress in Neurobiology* 54:369-415.

- Minkenberg I. y Ferber E. (1984) “Lucigenin dependent chemiluminescence as a new assay for NAD(P)H-Oxidase activity in particulate fractions of human polymorphonuclear leukocytes” En *Journal of Immunological Methods* 71:61-67.
- Misawa T., Takahama M., Kozaki T., Lee H., Zou J., Saitoh T. & Akira S. (2013) “Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome” En *Nature Immunology* 14(5):454-461.
- Morán J. & Patel A. (1989) “Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development” En *Developmental Brain Research* 46:97-105.
- Morgan M. & Liu Z. (2010) “Crosstalk of reactive oxygen species and NK-κB signaling” En *Cell Res* 21(1):103-115.
- Munnamalai V. & Suter D. (2009) “Reactive oxygen species regulate F-actin dynamics in neuronal growth cones and neurite outgrowth” En *Journal of Neurochemistry* 108:644-661.
- Murakami T., Ockinger J., Yu J., Byles V., McColl A., Hofer A. & Horng T. (2012) “Critical role of calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome” En *PNAS* 109(28):11282-11287.
- Murphy M. (2009) “How mitochondria produce reactive oxygen species” En *Biochem J* 417:1-13.
- Nauseef W. (2013) “Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases” En *Biochimica et Biophysica Acta* 1840:757-767.
- Nayernia Z., Jaquet V. & Krause H. (2014) “New Insights on NOX Enzymes in the Central Nervous System” En *Antioxidants & Redox Signaling* 20(17):2815-2837.
- Negishi T., Ishii Y., Kyuwa S., Kuroda Y. & Yoshikawa Y. (2003) “Primary culture of cortical neurons, type-1 astrocytes, and microglial cells from cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) fetuses” En *Journal of Neuroscience Methods* 131:133-140.
- Ng F., Berk M., Dean O. & Bush A. (2008) “Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications” En *International Journal of Neuropsychopharmacology* 11:851-876.
- Nicholls D., Budd S., Castilho R. & Ward M. (2006) “Glutamate excitotoxicity and neuronal energy metabolism” En *Annals of the New York Academy of Sciences* 893(1):1-12.
- O'Donnell V., Tew D., Jones O. & England P. (1993) “Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase” En *Biochem J* 290:41-49.
- Olguín M. & Morán J. (2017) “Redox signaling mechanisms in nervous system development” En *Antioxidants and Redox Signaling* DOI:10.1089/ars.2017.7284.
- Park H., Jung H., Park E., Kim J., Lee W. & Bae Y. (2004) “Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-κB” En *J Immunol* 173:3589-3593.
- Paulsen C. & Carroll K. (2013) “Cystidine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery” En *Chemical Reviews* 113:4633-4679.
- Purves D., Augustin G., Fitzpatrick D., Hall W., LaMantia A. & White L. (2012) “Neuroscience” 5th Edition. *Sinauer Associates*.

- Py B., Kim M., Vakifahmetoglu H. & Yuan J. (2013) “Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity” En *Mol. Cell* 49:331-338.
- Rada B., Park J., Sil P., Geiszt M. & Leto T. (2014) “NLRP3 inflammasome activation and interleukin-1 β release in macrophages require calcium but are independent of calcium-activated NADPH oxidases” En *Inflamm Res* 63:821-830.
- Rieger A., Nelson K., Konowalchuk J. & Barreda D. (2011) “Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death” En *J Vis Exp* 50:2597.
- Riganti C., Gazzano E., Polimeni N., Costamagna C., Bosia A. & Ghigo D. (2004) “Diphenyleiiodonium inhibits the cell redox metabolism and induces oxidative stress” En *The Journal of Biological Chemistry* 279(46):47726-47731.
- Rojas D. (2013) Tesis Doctoral “Estudio de la modulación de la función biológica y actividad de la NADPH Oxidasa en macrófagos por la molécula de la familia de las moléculas de activación de señalización de linfocitos (SLAMF8)” Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología, Universidad de Granada.
- Rueda C., Llorente I., Traba J., Amigo I., Gonzalez P., Contreras L., Juaristi I., Martínez P., Pardo B., del Arco A. & Satrustegui J. (2016) “Glutamate excitotoxicity and Ca²⁺ regulation of respiration: Role of the Ca²⁺ activated mitochondrial transporters” En *BBA Bioenergetics* 1857(8):1158-1166.
- Salim S. (2016) “Oxidative stress and the Central Nervous System” En *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 360:201-205.
- Schieber M. y Chandel N. (2014) “ROS function in redox signaling and oxidative stress” En *Curr Biol* 24(10):R453-R462.
- Schroder K. & Tschopp J. (2010) “The Inflammasomes” En *Cell* 140:821-832.
- Schroder K., Zhou R. & Tschopp J. (2010) “The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger?” En *Science* 327:296-300.
- Segal A. (2016) “NADPH oxidases as electrochemical generators to produce ion fluxes and turgor in fungi, plants and humans” En *Open Biology* 6:1-15.
- Shah A., Xia L., Masson E., Gui C., Momen A., Shikatani E., Husain M., Quaggin S., John R. & Fantus I. (2015) “Thioredoxin-interacting protein deficiency protects against diabetic nephropathy” En *J Am Soc Nephrol* 26(12):2963-2977.
- Siegel G., Albers W., Brady S. & Price D. (2006) “Basic Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects” 7th Edition. *Elsevier Academic Press*.
- Singel K. & Segal A. (2016) “NOX2-dependent regulation of inflammation” En *Clinical Science* 130:479-490.
- Song N., Liu Z., Xue W., Bai Z., Wang Q., Dai J., Liu X., Huang Y., Cai H., Zhan X., Han Q., Wang H., Chen Y., Li H., Li A., Zhang X., Zhou T. & Li T. (2017) “NLRP3 phosphorylation is an essential priming event for inflammasome activation” En *Mol Cell* 68(1):185-197.
- Sorce S. & Krause K. (2009) “NOX enzymes in central nervous system: from signaling to disease” En *Antioxidants and Redox Signaling* 11(10):2481-2504.
- Sorce S., Krause K. & Jaquet V. (2012) “Targeting NOX enzymes in the central nervous system: therapeutic opportunities” En *Cellular and Molecular Life Sciences* 69:2387-2407.

- Stutz A., Kolbe C., Stahl R., Horvath G., Franklin B., van Ray O., Brinkschulte R. Geyer M., Meissner F. & Latz E. (2017) "NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain" En *J Exp Med* 214(6):1725-1736.
- Sun B., Wang X., Wang M., Liao Y., Li R., Nel A. & Xia T. (2015) "NADPH oxidase-dependent NLRP3 inflammasome activation and its important role in lung fibrosis by multiwalled carbon nanotubes" En *Small* 11(17):2087-2097.
- Sun X., Jiao X., Ma Y., Liu Y., Zhang L., He Y. & Chen Y. (2016) "Trimethylamine N-oxide induces inflammation and endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells via activating ROS-TNIP-NLRP3 inflammasome" En *Biochemical and Biophysical Research Communications* 481(1-2):63-70.
- Tschopp J. & Schroder K. (2010) "NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production?" En *Nature Perspectives* 10:210-215.
- Tseng H., Vong C., Kwan Y., Lee S. & Hoi M. (2016) "TRPM2 regulates TXNIP-mediated NLRP3 inflammasome activation via interaction with p47 phox under high glucose in human monocytic cells" En *Scientific Reports* 6:35016.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M., Mazur M. & Telser J. (2007) "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease" En *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39:44-84.
- van Bruggen R., Köker M., Jansen M., van Houdt M., Roos D., Kuijpers T. & van den Berg T. (2010) "Human NLRP3 inflammasome activation is Nox1-4 independent" En *Blood* 115(26):5398-5400.
- Vaquero E. y Molero X. (2005) "Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias de páncreas: ¿una posible diana terapéutica?" En *Gastroenterol Hepatol* 58(8):473-484.
- Viviani B., Bartesaghi S., Gardoni F., Vezzani A., Behrens M., Bartfai T., Binaglia M., Corsini E., Di Luca M., Galli C. & Marinovich M. (2003) "Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases" En *J Neurosci* 23(25):8692-8700.
- Vladimirov Y. y Proskurnina E. (2009) "Free radicals and cell chemiluminescence" En *Biochemistry (Moscow)* 74(13):1545-1566.
- Walsh J., Muruve D. & Power W. (2014) "Inflammasomes in the CNS" En *Nature Reviews Neuroscience* 15:84-97.
- Wang Z., Wei X., Liu K., Zhang X., Yang F., Zhang H., He Y., Zhu T., Li F., Shi W., Zhang Y., Xu H., Liu J. & Yi F. (2013) "NOX2 deficiency ameliorates cerebral injury through reduction of complexin II-mediated glutamate excitotoxicity in experimental stroke" En *Free Radic Biol Med* 65:942-951.
- Wheeler M. & Defranco A. (2012) "Prolonged production of reactive oxygen species in response to B cell receptor stimulation promotes B cell activation and proliferation" En *J Immunol* 189:4405-4416.
- Wilson C., Muñoz E. & González C. (2017) "From birth to death: a role for reactive oxygen species in neuronal development" En *Seminars in Cell and Developmental Biology* In press, Corrected proof.
- Wind S., Beuerlein K., Eucker T., Müller H., Scheurer P., Armitage M., Ho H., Schmidt H. & Wingler K. (2010) "Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors" En *British Journal of Pharmacology* 161:885-898.

- Yang F., Wang Z., Wei X., Han H., Meng X., Zhang Y., Shi W., Li F., Xin T., Pang Q. & Yi F. (2014) "NLRP3 deficiency ameliorates neurovascular damage in experimental ischemic strokes" En *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 34:660-667.
- Yang J., Liu Z. & Xiao T. (2016) "Post-translational regulation of inflammasomes" En *Cellular and Molecular Immunology* 13:1-15.
- Yuan H., Perry C., Huang C., Iwai E., Carreira R., Glembotski C. & Gottlieb R. (2008) "LPS-induced autophagy is mediated by oxidative signaling in cardiomyocytes and is associated with cytoprotection" En *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296:H470-H479.
- Zaragoza M. & Morán J. (2017) "Reactive Oxygen Species evoked by potassium deprivation and staurosporin inactivate Akt and induce the expression of TXNIP in cerebellar granule neurons" En *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Zendedel A., Johann S., Mehrabi S., Joghataei M., Hassanzadeh G., Kipp M. & Beyer C. (2016) "Activation and regulation of NLRP3 inflammasome by intrathecal application of SDF-1a in a spinal cord injury model" En *Mol Neurobiol* 53(5):3063-3075.
- Zhou K., Shi L., Wang Y., Chen S. & Zhang J. (2016) "Recent advances of the NLRP3 inflammasome in central nervous system disorders" En *Journal of Immunology Research* 2016(2):1-9.
- Zhou R., Tardivel A., Thorens B., Choi I. & Tschopp J. (2010) "Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation" En *Nature Immunology* 2:136-140.
- Zhou R., Yazdi A., Menu P. & Tschopp J. (2011) "A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation" En *Nature* 469(7329):221-225.
- Zhou Y. & Danbolt N. (2014) "Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain" En *J Neural Transm* 121:799-817.