



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA.

**INDUCCIÓN DE REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILO (NETs)
ESTIMULANDO RECEPTORES Fc.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO.**

**PRESENTA
ALEMÁN MUÑOZ OMAR RAFAEL.**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA.**

**ASESOR DE TESIS
DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN.**



MÉXICO D.F., NOVIEMBRE 2014.



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.

Reconocimientos.

Este trabajo de tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Carlos Rosales Ledezma, en el departamento de inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México con apoyo del proyecto 168098 otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, y del proyecto IN207514 otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos.

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la maravillosa oportunidad de formarme profesionalmente a través de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Al Dr. Carlos Rosales Ledezma por aceptarme en su laboratorio y por la dirección académica.
- A la M. en IBB. Nancy Yorley Mora Pérez por todo su apoyo técnico durante la realización de esta tesis.
- Al Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón por toda la enseñanza y ayuda durante la carrera.
- A todos los donadores de sangre ya que sin su contribución todos los experimentos aquí realizados no hubiesen sido posibles.

Dedicatoria.

- A mis padres Rafael Antonio Alemán Reyna y Mercedes Muñoz Miranda por brindarme todo su apoyo, también por darme la valiosa oportunidad de estudiar y desarrollarme profesionalmente los quiero mucho.
- A mi hermana Miriam Alemán por ser mi amiga y mi cómplice de travesuras.
- A mis familiares que de alguna u otra forma siempre han estado ahí para brindarme su apoyo y consejo.
- A Pamela Meza por ser mi compañera y darme una razón más para ser mejor cada día.

Abreviaturas.

°C	Grados Celsius.
μL	Microlitro.
BPI	Bactericidal permeability-increasing protein.
BSA	Bovine serum albumin.
CGD	Chronic granulomatous disease.
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Deoxyribonucleic acid.
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases
Fc	Fragmento constante.
FcR	Receptor Fragmento constante.
GPI	Glycophosphatidylinositol.
IgG	Immunoglobulin G.
IL-8	Interleukin 8.
INF-γ	Interferon gamma.
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
LPS	Lipopolysaccharide
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase.
min	Minuto.
mL	Mililitro.
mm	Milímetro.
MPO	Myeloperoxidase.
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.
NE	Neutrophil Elastase
NETs	Neutrophil Extracellular Traps.
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells.
PBS	Phosphate Buffered Saline.
PI3-K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	Protein Kinase C.
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate.
PMN	Leucocitos polimorfonucleares.
Rac2	Ras related c3 botulinum toxin substrate.
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma.
ROS	Reactive Oxygen Species.
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium.
Syk	Spleen tyrosine kinase.
μM	Micromolar.

Índice.

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Fagocitosis.....	4
Redes extracelulares de neutrófilo.....	4
Morfología.....	4
Cambios Morfológicos en el neutrófilo al formar NETs.....	7
Señales iniciales.....	8
Descondensación de la cromatina.....	9
Receptores Fc presentes en el neutrófilo.....	9
Planteamiento del problema.....	11
Hipótesis.....	12
Objetivo General.....	13
Objetivos particulares.....	13
Materiales y métodos.....	14
Purificación de neutrófilos.....	14
Estimulación de neutrófilos con PMA.....	15
Estimulación de neutrófilos con anticuerpos monoclonales.....	16
Inhibidores farmacológicos.....	17
Visualización de NETs por inmunohistoquímica.....	18
Análisis estadístico de los resultados.....	20
Resultados.....	22
Purificación de neutrófilos.....	22
Estimulación de neutrófilos.....	23
Las integrinas $\beta 1$ no inducen la formación de NETs.....	32
Inhibidores farmacológicos.....	34
Discusión.....	49
Conclusiones.....	53
Perspectivas.....	54
Referencias.....	55

Índice de Figuras.

Figura 1. Microscopia electrónica de transmisión.....	3
Figura 2. Microscopia Electrónica de barrido.	5
Figura 3. Representación esquemática de la formación de NETs.....	7
Figura 4. Receptores Fc en neutrófilos humanos.....	10
Figura 5. Gradilla con Parafilm.	18
Figura 6. Purificación de neutrófilos.....	22
Figura 7. Activación de PMN con PMA.	24
Figura 8. Neutrófilos estimulados con PMA.....	25
Figura 9. Activación de neutrófilos al estimular selectivamente cada receptor Fc con anticuerpos monoclonales específicos.	27
Figura 10. Estimulación de receptores Fc.....	28
Figura 11. Detección de elastasa en PMN tratados con PMA.....	30
Figura 12. Detección de elastasa en PMN estimulados a través de los receptores Fc.....	31
Figura 13. Estimulación de neutrófilos a través de las integrinas $\beta 1$	32
Figura 14. La ubicación de histonas y elastasa no cambia en los PMN estimulados por integrinas $\beta 1$	33
Figura 15. Tratamiento con los inhibidores específicos para PKC.	36
Figura 16. Tratamiento con el inhibidor específico para MEK.....	38
Figura 17. Tratamiento con los inhibidores específicos para Syk.....	41
Figura 18. Tratamiento con el inhibidor específico para PI-3K.....	43
Figura 19. Tratamiento con el inhibidor específico para NADPH oxidasa.....	45
Figura 20. Tratamiento con el inhibidor específico para NF- κ B.	48

Índice de Tablas.

Tabla 1. Microorganismos capaces de inducir la formación de NETs.	¡Error!
Marcador no definido.	
Tabla 2. Anticuerpos.....	16
Tabla 3. Inhibidores.	17
Tabla 4. Canales de excitación y filtros de emisión.	20

Índice de Gráficos.

Gráfico 1. Promedio del área relativa de DNA por condición experimental.	34
Gráfico 2. Promedio del área relativa de DNA al utilizar los inhibidores específicos para PKC.....	37
Gráfico 3. Promedio del área relativa de DNA al utilizar el inhibidor específico para MEK.....	39
Gráfico 4. Promedio del área relativa de DNA inhibiendo la molécula Syk con dos diferentes inhibidores.	42
Gráfico 5. Promedio del área relativa de DNA inhibiendo la molécula PI-3K.	44
Gráfico 6. Promedio del área relativa de DNA al inhibir la molécula NADPH oxidasa.....	46
Gráfico 7. Promedio del área relativa de DNA al inhibir la molécula NF- κ B.	49

Resumen.

Los neutrófilos además de ser células de origen hematopoyético pertenecientes al sistema inmune innato son los leucocitos más abundantes en el torrente sanguíneo. Éstos migran a los sitios de infección donde montan diferentes estrategias para combatir a los microorganismos invasores. Estas estrategias son la fagocitosis, la degranulación que libera agentes microbicidas y la secreción de citocinas. En 2004 otra estrategia de los neutrófilos para enfrentar a los microorganismos fue descrita, ésta consiste en la formación de redes extracelulares denominadas NETs (del inglés Neutrophil Extracellular Traps); las cuales están formadas por cromatina asociada con proteínas de los gránulos. En ellas, los microorganismos son atrapados y comienzan a ser degradados. La mayoría de los datos obtenidos sobre la formación de NETs son resultado de estimular al neutrófilo con microorganismos completos o con PMA (del inglés phorbol myristate acetate). No hay reportes de que algún receptor del neutrófilo pueda inducir la formación de NETs. Con el fin de determinar si los receptores Fc son capaces de inducir la formación de NETs, se estimularon selectivamente cada uno de los dos receptores Fc presentes en PMN humanos con anticuerpos monoclonales específicos. El entrecruzamiento del receptor FcγRIIA no promovió la formación de NETs. En contraste el entrecruzamiento del receptor FcγRIIIB induce la formación de NETs de manera similar a la estimulación con PMA. Sin embargo la producción de NETs inducida por el receptor FcγRIIIB es independientemente de ERK. Estos datos apoyan la idea de que diferentes receptores Fc inducen funciones celulares distintas.

Introducción.

Los neutrófilos son células de origen hematopoyético, que al estar completamente diferenciados entran al torrente sanguíneo, donde cuentan con una vida media de entre 6 a 8 horas. En humanos, son los leucocitos más abundantes en la circulación sanguínea (Summers *et al.*, 2010). Estas células cuentan con dos características distintivas: 1) su núcleo segmentado en lóbulos, por lo que se les conoce también como leucocitos polimorfonucleares (PMN) y 2) la presencia de múltiples gránulos en su citoplasma (Figura 1). Por esta última característica en conjunto con los eosinófilos, basófilos y células cebadas forman el grupo de los granulocitos (Brinkmann y Zychlinsky, 2012). Dichos gránulos son lisosomas especializados que contienen proteínas capaces de destruir microorganismos y digerir tejidos (Brinkmann y Zychlinsky, 2007). En general estos pueden clasificarse en primarios, secundarios y terciarios. Los primarios o azurófilos contienen defensinas, mieloperoxidasa, serin proteasa, elastasa, catepsina G y BPI, por sus siglas en inglés bactericidal permeability-increasing protein. Los secundarios o específicos contienen lactoferrina, muramidasa, fosfatasa alcalina, NADPH oxidasa, colagenasa y catelicidina. Los terciarios contienen catepsina y gelatinasa (Borregaard y Cowland, 1997; Pruchniak *et al.*, 2013).

Durante una infección los PMN son reclutados a los sitios de infección, guiados por señales inflamatorias como la interleucina (IL)-8, el interferón gama (INF- γ) y, la proteína de complemento C5a. Para llegar a los microorganismos invasores los PMN deben atravesar primero el endotelio vascular (Pruchniak *et al.*, 2013) y posteriormente migrar a los sitios de infección. Una vez ahí, los PMN usan diferentes estrategias para combatir a los microorganismos, las cuales incluyen la fagocitosis, la degranulación de agentes microbicidas y la secreción de citocinas (Borregaard, 2010). En 2004 una nueva táctica que utiliza el neutrófilo para enfrentar a los microorganismos fue descrita, ésta consiste en la formación de Redes Extracelulares o NETs del inglés Neutrophil Extracellular Traps (Brinkmann *et al.*, 2004).

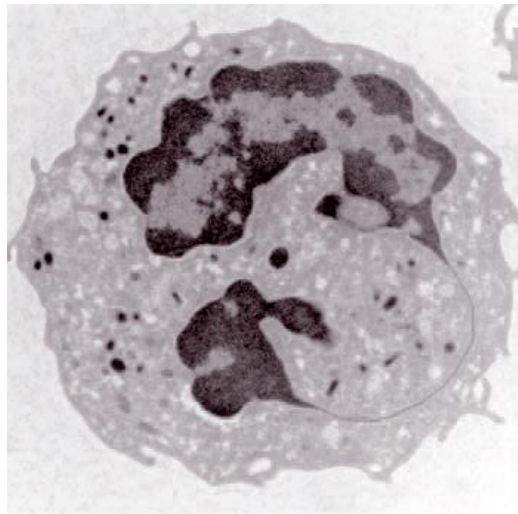


Figura 1. Microscopía electrónica de transmisión. Se observa la morfología característica del neutrófilo, con sus múltiples gránulos y su núcleo lobulado. Imagen modificada de Brinkmann y Zychlinsky, 2007.

Fagocitosis.

La fagocitosis es el mecanismo por el cual los neutrófilos ingieren microorganismos patógenos para su posterior eliminación intracelular. Los neutrófilos engullen a los patógenos dentro de una vacuola denominada fagosoma. Posteriormente subunidades preformadas de la proteína NADPH oxidasa se unen a la membrana del fagosoma y comienzan a transferir electrones al oxígeno para formar especies reactivas de oxígeno (ROS; del inglés reactive oxygen species). Más tarde, los gránulos del neutrófilo se fusionan con el fagosoma y vierten en su interior a los agentes microbicidas que contienen. En consecuencia los patógenos son expuestos a altas concentraciones de ROS y otros agentes microbicidas, lo cual lleva a su eliminación (Fuchs *et al.*, 2007).

Redes extracelulares de neutrófilo.

Morfología.

El componente estructural más importante de las NETs es el ADN, esto se ha puesto de evidencia por la fuerte interacción entre las NETs y colorantes como DAPI y SYTOX Green los cuales son marcadores fluorescentes que se intercalan en el ADN. Adicionalmente se ha reportado que la degradación de las NETs se logra con el tratamiento con ADNsas. Las redes extracelulares también contienen histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4, lo mismo que proteínas provenientes de los gránulos. Algunas de estas con actividad antimicrobiana son

la proteína BPI, la elastasa y la mieloperoxidasa (Brinkmann *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2007; Urban *et al.*, 2006). Las NETs se han encontrado en sitios de infección donde pueden controlar a los microorganismos atrapándolos para impedir su diseminación (Figura 2) y mediante las acciones antimicrobianas de las proteínas que recubren al ADN (Brinkmann *et al.*, 2004).

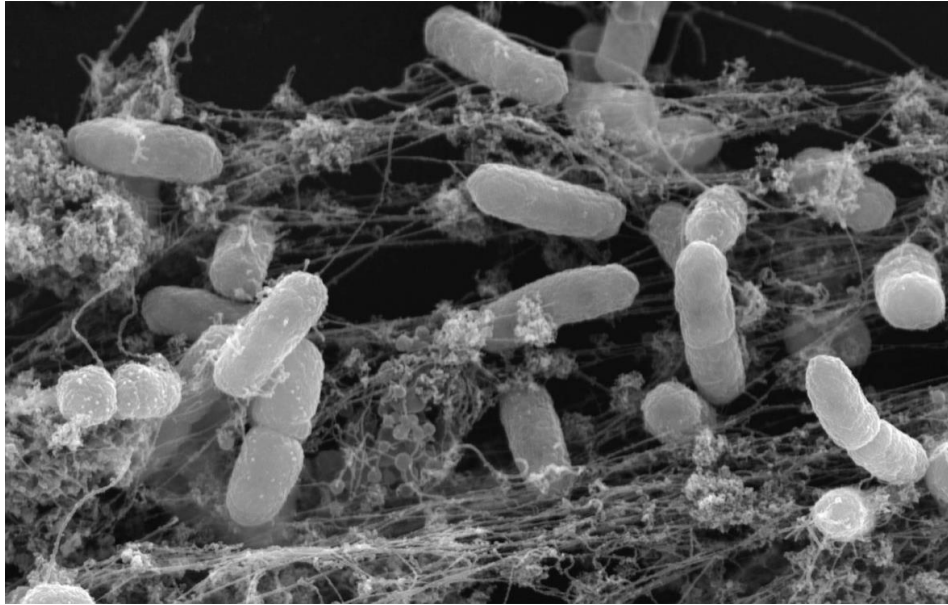


Figura 2. Microscopia Electrónica de barrido. Bacteria *Salmonella* atrapada en NETs. Imagen modificada de Brinkmann *et al.*, 2004.

Estímulos que inician la formación de NETs.

La formación de NETs puede ser inducida por una gran variedad de estímulos pro-inflamatorios, tales como lipopolisacárido (LPS), IL-8 y factor de necrosis tumoral (TNF). Otro potente estímulo formador de NETs es el éster de forbol PMA (del inglés phorbol-12-myristate-13-acetate), que es un activador de proteínas cinasas C, PKC por sus siglas en inglés (Brinkmann *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2010). Las NETs también pueden ser inducidas por una gran variedad de microorganismos incluyendo hongos, bacterias, protozoarios y virus (Tabla 1).

Tabla 1. Microorganismos capaces de inducir la formación de NETs.

MICROORGANISMO.	REFERENCIA.
<i>Myxoma virus.</i>	(Jenne <i>et al.</i> , 2013)
HIV-1	(Saitoh <i>et al.</i> , 2012)
<i>Influenza virus A.</i>	(Hemmers <i>et al.</i> , 2011)
	(Narasaraju <i>et al.</i> , 2011)
<i>Staphylococcus aureus</i>	(Fuchs <i>et al.</i> , 2007)
	(Pilszczek <i>et al.</i> , 2010)
	(Berends <i>et al.</i> , 2010)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	(Buchanan <i>et al.</i> , 2006)
	(Lauth <i>et al.</i> , 2009)
<i>Escherichia coli</i>	(Grinberg <i>et al.</i> , 2008)
<i>Candida albicans</i>	(Urban <i>et al.</i> , 2006)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(Ramos-Kichik <i>et al.</i> , 2009)
<i>Schistosoma japonicum</i>	(Chuah <i>et al.</i> , 2013)
<i>Shigella flexneri</i>	(Brinkmann <i>et al.</i> , 2004)
<i>Haemophilus influenzae</i>	(Hong <i>et al.</i> , 2009)
<i>Yersinia enterocolitica</i> y <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	(Casutt-Meyer <i>et al.</i> , 2010)
<i>Mannheimia haemolytica</i>	(Aulik <i>et al.</i> , 2010)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	(Bruns <i>et al.</i> , 2010)
<i>Aspergillus nidulans</i>	(Bianchi <i>et al.</i> , 2009)
<i>Leishmania amazonensis</i>	(Guimarães-Costa <i>et al.</i> , 2009)
<i>Toxoplasma gondii</i>	(Abi Abdallah <i>et al.</i> , 2012)

Cambios Morfológicos en el neutrófilo al formar NETs.

Posterior a la estimulación, los neutrófilos se adhieren fuertemente al sustrato al parecer utilizando integrinas $\beta 2$. Mientras están en suspensión, los PMN forman NETs con poca eficiencia (Neeli *et al.*, 2009). En esta etapa inicial también se observa la formación de ROS. Sesenta minutos después de la estimulación, el núcleo comienza a perder su forma lobulada característica y la cromatina comienza a descondensarse, pero la membrana nuclear sigue intacta. Después de 180 minutos la membrana nuclear se desintegra en pequeñas vesículas y la cromatina se descondensa. Los gránulos desaparecen, por lo que el nucleoplasma y el citoplasma se mezclan. Finalmente la membrana celular se rompe y la célula se contrae expulsando su contenido al medio extracelular, Figura 3 (Fuchs *et al.*, 2007).

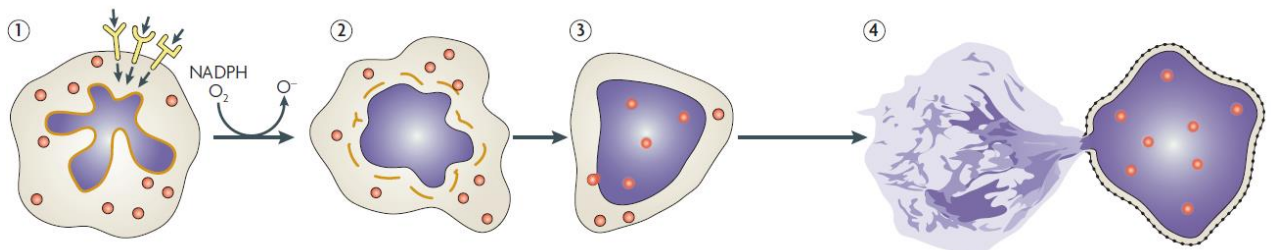


Figura 3. Representación esquemática de la formación de NETs. 1) La estimulación lleva a la formación de ROS. 2) La membrana nuclear comienza a desintegrarse y los gránulos pierden integridad. 3) El núcleo y los gránulos pierden por completo la integridad y se mezclan. 4) Por último la célula se contrae y expulsa su material al medio extracelular formando NETs. Modificado de Brinkmann y Zychlinsky, 2007.

Señales iniciales.

Utilizando inhibidores farmacológicos, se ha demostrado que al estimular a los neutrófilos con PMA la formación de NETs es dependiente de la enzima NADPH-oxidasa, responsable de la formación de ROS (Fuchs *et al.*, 2007). Primero se observó que neutrófilos provenientes de donadores con enfermedad granulomatosa crónica (CGD; del inglés Chronic granulomatous disease) son incapaces de formar NETs ya que no logran generar ROS debido a que el complejo NADPH-oxidasa se encuentra dañado (Bianchi *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2007). Asimismo al utilizar DPI (del inglés diphenylene iodonium) que es un inhibidor farmacológico del complejo NADPH-oxidasa, se detiene la formación de NETs (Fuchs *et al.*, 2007).

También se ha reportado que la formación de NETs por neutrófilos estimulados con PMA es dependiente de PKC los PMN utilizan la isoforma PKC β para activar el complejo NADPH-oxidasa y comenzar la formación de ROS las cuales son cruciales para la formación de NETs (Gray *et al.*, 2013).

Otras moléculas que parecen participar en la formación de las NETs son Rac2 del inglés Ras related c3 botulinum toxin substrate (Lim *et al.*, 2011) y las de la vía Raf-MEK-ERK (Hakkim *et al.*, 2010).

Descondensación de la cromatina.

Otro de los eventos moleculares que ocurre durante la formación de NETs es la descondensación de la cromatina. Este evento es regulado por la elastasa presente en el neutrófilo (NE; del inglés neutrophil elastase) y por la mieloperoxidasa (MPO). La NE sale de los gránulos, por mecanismos aún desconocidos y entra en el núcleo donde degrada las histonas H1 y H4 lo que provoca la descondensación parcial del núcleo. Posteriormente la enzima MPO entra al núcleo, provocando un incremento en la descondensación de la cromatina (Papayannopoulos *et al.*, 2010).

Receptores Fc presentes en el neutrófilo.

La capacidad antimicrobiana de los PMN depende de la efectividad con la que estas células reconocen a los agentes patógenos. La unión entre los receptores para la región Fc de los anticuerpos (FcR) y los microorganismos opsonizados con inmunoglobulinas es una de las principales vías utilizadas por el neutrófilo para el reconocimiento de microorganismos invasores. Dicho reconocimiento activa mecanismos de eliminación microbiana como la producción de ROS o la degranulación, entre otros (Jakus *et al.*, 2008; Rosales y Uribe-Querol, 2013).

Los neutrófilos humanos expresan principalmente dos tipos de FcR en su superficie, los receptores Fc γ RIIA y Fc γ RIIIB. Estos cuentan con baja afinidad por monómeros de inmunoglobulinas tipo G (IgG) pero son capaces de reconocer complejos inmunes con mayor afinidad. El Fc γ RIIA está compuesto por una cadena α , que atraviesa la membrana plasmática. Su porción extracelular consta de dos regiones tipo Ig y la región intracelular contiene una secuencia que incluye tirosinas que son fosforiladas al activarse el receptor, conocida como ITAM (del inglés: immunorreceptor tyrosine-based activation motif). El Fc γ RIIIB es exclusivo de neutrófilos humanos, éste receptor en su porción extracelular está compuesto de dos regiones tipo inmunoglobulina y no cuenta con región intracelular, está unido a la membrana por un enlace glicosilfosfatidilinositol o GPI (Figura 4). Sin embargo no se conocen subunidades asociadas a este receptor, y hasta el momento sus mecanismos de señalización son desconocidos (Rosales y Uribe-Querol, 2013).

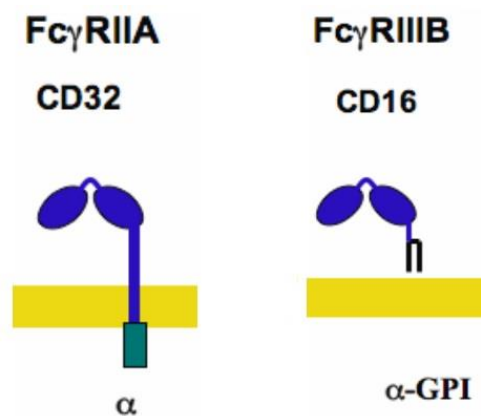


Figura 4. Receptores Fc en neutrófilos humanos. Los neutrófilos humanos expresan los receptores Fc γ RIIA (CD32) y Fc γ RIIIB (CD16). Ambos presentan en su región extracelular dos regiones tipo IgG. El Fc γ RIIA atraviesa la membrana y en su región citoplasmática cuenta con una región ITAM (verde) en cambio el Fc γ RIIIB está unido a la membrana por un enlace GPI. Modificado de Rosales y Uribe-Querol 2013.

Planteamiento del problema.

La mayor parte de los datos obtenidos hasta el momento, relacionados con la formación de NETs, se han logrado utilizando estímulos artificiales como el PMA o inespecíficos utilizando microorganismos completos. Adicionalmente existen reportes en los que la formación de NETs se logra o se ve incrementada al utilizar microorganismos que fueron previamente opsonizados con suero autólogo (Grinberg *et al.*, 2008; Lauth *et al.*, 2009; Metzler *et al.*, 2011; Parker *et al.*, 2012; Pilszczek *et al.*, 2010; Urban *et al.*, 2006; Yipp *et al.*, 2012).

Por lo que se plantea la posibilidad de que al estimular los receptores para la región Fc de los anticuerpos presentes en el neutrófilo desencadenen la formación de NETs.

Hipótesis.

Si se estimula selectivamente cada uno alguno de los receptores Fc del neutrófilo, entonces éstos inducen la formación de NETs.

Con esto se podrá afirmar, al aceptar la hipótesis, cuál de los receptores Fc es capaz de inducir la formación de NETs, o bien al rechazar la hipótesis se podrá concluir que estos receptores no pueden inducir la formación de NETs.

Objetivo General.

Determinar si al estimular los receptores Fc presentes en el neutrófilo son capaces de iniciar la formación de NETs.

Objetivos particulares.

- Obtener una población homogénea y pura de neutrófilos humanos.
- Determinar cuál de los receptores Fc de neutrófilos humanos induce la formación de NETs.
- Dilucidar la vía de señalización que el receptor Fc utiliza para inducir la formación de NETs.

Materiales y métodos.

Purificación de neutrófilos.

Los neutrófilos fueron purificados de sangre periférica humana proveniente de donadores adultos voluntarios. Primero 10 mL de sangre fresca se añadieron a un tubo cónico de 15 mL, el cual contiene 0.25 ml de heparina (10 U/mL) y 2 mL de una disolución 6% de dextrans T500 (Pharmacia Cat # 170320-01) en solución amortiguadora PBS (del inglés phosphate buffered saline). La sangre se mezcla por inversión y se dejó reposar durante 45 min a temperatura ambiente, para sedimentar las células rojas. El plasma rico en leucocitos, que queda en la parte superior de los eritrocitos, se colocaron dentro de un tubo cónico de centrifuga de 15 ml que contiene un colchón de 5 mL de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB Uppsala Sweden Cod # 17-1440-03). Es muy importante que el plasma no se mezcle con el Ficoll. El tubo se centrifugo a 516 x g durante 20 min a 4°C. A continuación se eliminó el sobrenadante, y el botón celular que contiene a los PMN se resuspendió en 10 ml de PBS frío (4°C). La suspensión celular se transfirió a un tubo cónico de 50 ml y se centrifugo a 290 x g durante 5 min a 4°C. Después se eliminara el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en PBS. Para eliminar los eritrocitos restantes se realizó un choque hipotónico como se describe a continuación. Los PMN se concentraron por centrifugación y se les añadió 10 mL de disolución hipotónica fría 4°C (0.2% de NaCl, 1% de BSA (del inglés bovine serum albumin), 20 mM de

Hepes, pH= 7.4) agitando gentilmente con la mano durante 1 min. Se añadió enseguida 10 mL de disolución hipertónica fría 4°C (1.6% de NaCl, 1% de BSA, 20 mM de Hepes, pH= 7.4) y se mezcla. Las células se centrifugaron a 290 x g durante 5 min a 4°C y finalmente se resuspendió en PBS frío (4°C). La suspensión celular se mantiene en hielo. Se realizó un conteo de las células utilizando un hemocitómetro. Con este método aproximadamente el 95 % de las células fueron neutrófilos.

Estimulación de neutrófilos con PMA.

Un cubreobjetos redondo de 12 mm de diámetro se colocó en placas de 24 pozos. Un millón de PMN en 500 µL se colocó por pozo y se incubo por 30 min a 37°C y 5% CO₂. Inmediatamente se adiciono 100 µL de una disolución 60 µM de PMA en PBS, se incuba por 4 horas a 37°C y 5% CO₂.

Posteriormente, 600 µL de una disolución 2% de paraformaldehido en PBS (concentración final 1%), se añadió por pozo para fijar las células. La placa se incubaron durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂.

Estimulación de neutrófilos con anticuerpos monoclonales.

Un millón de PMN en 500 μ L se colocaron en un tubo cónico de plástico de 1.5 ml (Axygen, Union City CA USA) y se añadió 10 μ g/ml del anticuerpo anti-receptor correspondiente (Tabla 2). La mezcla se incubó durante 20 min a 4°C. Después, para lavar los PMN, se añadió 1 mL de PBS frío (4°C) y los tubos se centrifugaron a 1,743 x g durante 1 min. Se eliminó el sobrenadante y el botón celular se disgregaron raspando el fondo del tubo contra una gradilla. Se repitió este lavado dos veces más. Enseguida se resuspenden los PMN en 500 μ L de medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, Grand Island NY USA) suplementado con 5 % de SFB (suero fetal bovino) y se colocaron en un pozo de una placa de 24 pozos previamente preparada con un cubreobjetos redondo de 12 mm. La placa se incubó por 30 min a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente se adicionaron 100 μ L de 450 μ g/ml del anticuerpo F(ab')₂ de cabra antiIgG de ratón, concentración final 75 μ g/ml (MP Biomedicals, LLC, Fountain Pkwl, Solon, OH, USA) y la mezcla se incubó durante 4 horas a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, 600 μ L de una disolución 2 % de paraformaldehído en PBS (concentración final 1%), se añadió por pozo para fijar las células. La placa se incubó durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂.

Tabla 2. Anticuerpos.

Anticuerpos	Receptor.	Marca.
3G8.	Fc γ RIIIB.	025-1 Medarex.
IV.3.	Fc γ RIIA.	028-1 Medarex.
Ts2/16.	Integrina β 1.	Sc-53711 Santa Cruz Biotechnology.

Inhibidores farmacológicos.

Todos los inhibidores se colocaron 30 min antes de realizar la estimulación. Los inhibidores farmacológicos y las concentraciones utilizadas se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Inhibidores.

Inhibidor.	Marca	Concentración final.	Molécula que inhibe.
Piceatannol.	Acros Organics.	50 μ M.	Syk.
iSyk	Calbiochem.	40 nM	Syk
Wortmannin C.	Calbiochem.	50 nM.	PI3-K.
U0126.	Promega.	50 μ M.	MEK.
Gö6976.	Calbiochem.	1 μ M.	PKC.
Gö6983.	Calbiochem.	1 μ M.	PKC.
DPI.	Sigma.	10 μ M.	NADPH oxidasa.
BAY 117082.	Sigma.	2.5 μ M.	NF- κ B.

Visualización de NETs por inmunohistoquímica.

Los lavados y el proceso de inmunohistoquímica se realizaron en una gradilla previamente preparada con Parafilm. Una película de Parafilm se colocó sobre los hoyos de la gradilla de 12 mm de diámetro, de modo que se formen cavidades cóncavas. En cada cavidad se colocaron 250 μ L de agua, o de la disolución correspondiente, para que formen una pequeña gota convexa sobre la cual se coloca el cubreobjetos (Figura 5).

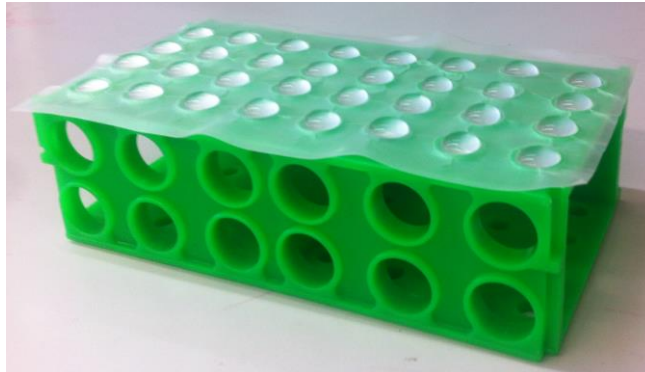


Figura 5. Gradilla con Parafilm. Se observa la formación de pequeñas gotas sobre las cuales se colocan los cubreobjetos para realizar los lavados.

Posterior a la fijación con paraformaldehído, los cubreobjetos se sacan uno a uno de la placa de cultivo y se colocan con la muestra hacia la gota de agua en la gradilla con parafilm. Los cubreobjetos se dejan sobre el agua durante 5 min a temperatura ambiente y se cambian de gota de agua tres veces más durante 5 min cada vez. Posteriormente, los cubreobjetos se colocan sobre una disolución 0.1% de Tritón X-100 disuelto en paraformaldehído al 4% durante 10 min a temperatura ambiente y luego se colocan sobre PBS durante 5 min temperatura ambiente. Enseguida los cubreobjetos se colocan sobre disoluciones de los anticuerpos primarios: antielastasa de neutrófilo (D-7, cat. # sc-365950 Santa Cruz Biotechnology) o antihistona H2B (FL-126, cat. # sc-10808 Santa Cruz Biotechnology) a 10 µg/mL en 5% de BSA en PBS y se incuban por 60 min a temperatura ambiente. Después, se realizan 4 lavados colocando los cubreobjetos sobre PBS durante 5 min en cada lavado. En seguida, los cubreobjetos se colocan sobre las disoluciones de los anticuerpos secundarios: Alexa Flour 555 Donky antirabbit (cat. # A-31572, Invitrogen) o Alexa Flour 488 Donky antimouse (cat. # A-21202, Invitrogen) a 8 µg/mL en 5% de BSA en PBS, que además contiene 300 nM DAPI. Los cubreobjetos se incuban en oscuridad durante 60 min a temperatura ambiente. Finalmente cada cubreobjetos se monta sobre un portaobjetos con una gota de agente antiblanqueo Flourosave (cat. # 345789, Calbiochem).

Las preparaciones se observaron en un microscopio invertido Olympus IX70 acoplado a una unidad de fluorescencia y a un sistema de captura de imágenes (Evolution VF Color Cooled MediaCybernetics). Las imágenes fueron capturadas con el programa Q capture pro 6.0 (QImaging Surrey, BC Canadá) y se procesaron con el programa ImageJ 1.47v (National Institutes of Health Bethesda, MD; <http://imagej.nih.gov/ij/>). Las longitudes de onda de excitación y de emisión de los fluorocromos utilizados, se muestran en la Tabla 4:

Tabla 4. Excitación y emisión de fluorocromos utilizados.

Fluorocromo.	Excitación.	Emisión	Color.
Alexa Flour 555.	555 nm.	565 nm.	Naranja.
Alexa Flour 488.	495 nm.	519 nm.	Verde.
DAPI.	345 nm.	455 nm.	Azul.

Cuantificación de la formación de NETs.

La cantidad relativa de NETs formadas se estimó analizando las imágenes de la tinción de ADN con el programa ImageJ 1.47v. Las fotografías de la tinción con DAPI fueron capturadas a un aumento de 200 veces. Posteriormente se transformaron a imágenes de 8-bits a blanco y negro. Se ajustó el brillo y contraste con el fin de distinguir claramente las fibras de ADN del fondo oscuro. Después se ajustó la imagen a umbral para un fondo oscuro y finalmente las imágenes fueron analizadas para obtener el área relativa de los píxeles correspondientes al área en color blanco (tinción de ADN). Cinco imágenes fueron analizadas por cada condición experimental (Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2014).

Las posibles diferencias entre los distintos grupos experimentales se analizaron estadísticamente con una prueba t de Student para datos no pareados utilizando el programa Microsoft Excel 2013 (Bremer y Doerge, 2010). Las diferencias se consideran estadísticamente significativas cuando el valor de p sea ≤ 0.05 .

Resultados.

Purificación de neutrófilos.

Al purificar los neutrófilos (PMN) de sangre periférica utilizando el método de dextran-ficoll, el 95% de células son neutrófilos. En la figura 6 A, se observa un frotis de sangre completa, donde únicamente se distinguen 2 neutrófilos (flechas) rodeados de una gran cantidad de eritrocitos. En la figura 6 B se muestra una preparación de neutrófilos purificados con el método de dextran-ficoll, se aprecia una gran cantidad de neutrófilos y algunos eritrocitos.

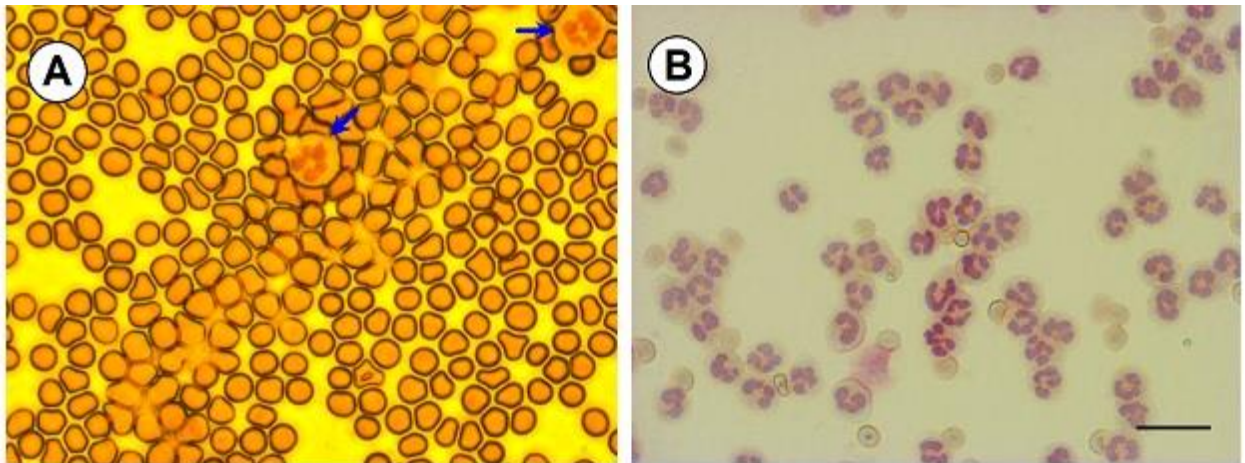


Figura 6. Purificación de neutrófilos. (A) Frotis de sangre completa, se observan únicamente 2 neutrófilos (flechas). (B) Neutrófilos purificados de sangre periférica por el método de Dextran-Ficoll. Se observa una gran cantidad de neutrófilos y escasos eritrocitos. Tinción Giemsa-Wright. La barra representa 20 μm .

Estimulación de neutrófilos.

Al teñir los PMN con el colorante DAPI, es posible observar la forma lobulada de su núcleo. Adicionalmente al marcar histonas por inmunohistoquímica, se observa la regionalización en el núcleo de estas proteínas. Sin embargo cuando los neutrófilos son estimulados con PMA se pierde la forma lobulada del núcleo, se forman NETs y las proteínas histonas se encuentran asociadas a lo largo de las fibras de ADN (Figura 7).

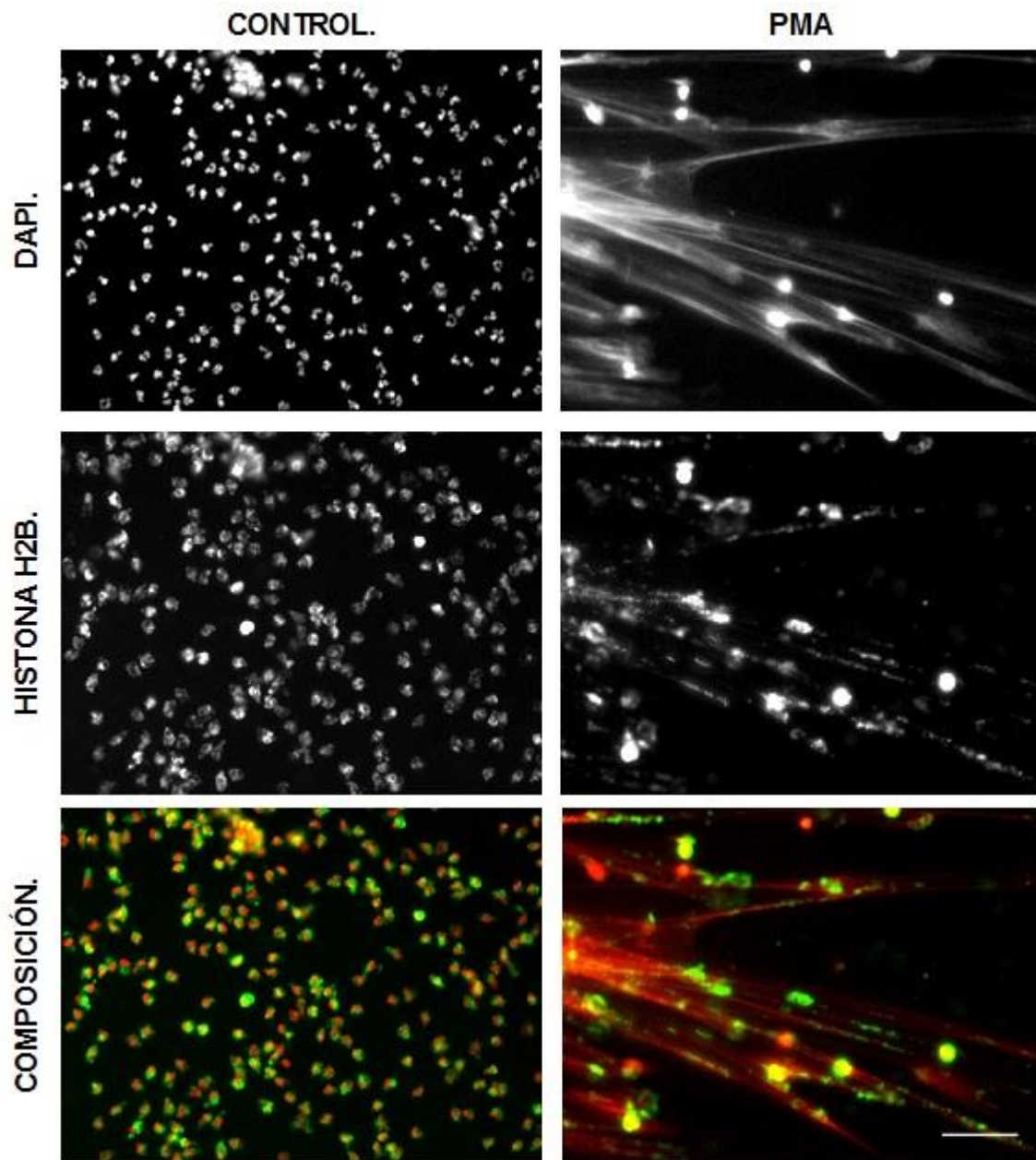


Figura 7. Activación de PMN con PMA. Al estimular los neutrófilos con PMA (derecha) se forman NETs. Se observan las fibras compuestas por DNA (rojo), asociado a proteínas histonas (H2B en verde). Los PMN sin estímulo (izquierda) muestra la forma lobulada del núcleo (rojo) y regionalización de proteínas histonas dentro del mismo (verde). La barra representa 50 μm .

Por otra parte cuando los PMN son estimulados con PMA la membrana plasmática pierde su integridad y el material genético puede ser expulsado al medio extracelular. Los neutrófilos sin tratamiento alguno mantienen la integridad de la membrana plasmática y el núcleo mantiene su conformación lobulada (Figura 8).

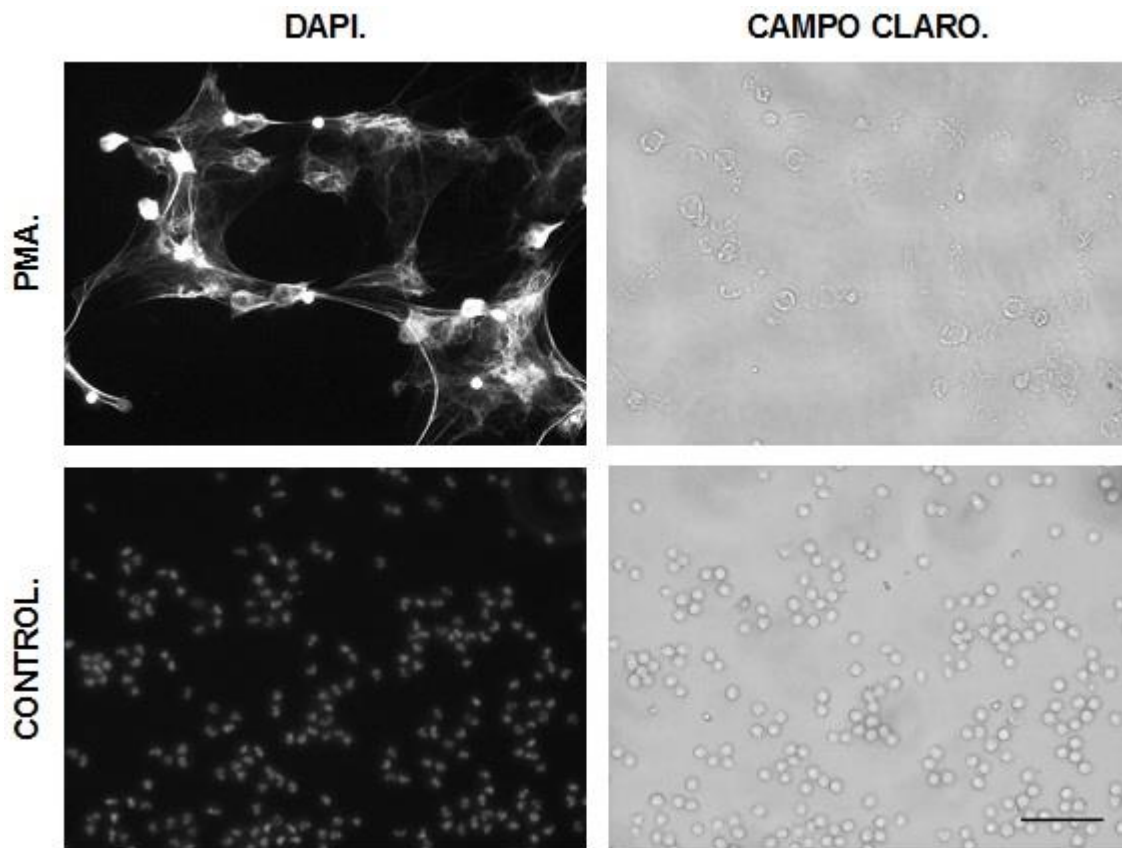


Figura 8. Neutrófilos estimulados con PMA. Al estimular los PMN con PMA (arriba) la membrana plasmática pierde su integridad y se observa la expulsión de ADN componente estructural de las NETs. Los neutrófilos sin tratamiento (control) muestran la membrana plasmática intacta y puede observarse la forma lobulada del núcleo. La barra representa 50 μm .

Al estimular el receptor FcγRIIA con el anticuerpo monoclonal IV.3, que es específico para dicho receptor, no se forman NETs y se mantiene la forma lobulada del núcleo, típica en neutrófilos (Figura 9). En contraste al estimular el receptor FcγRIIB con el anticuerpo monoclonal 3G8, que es específico para este receptor, los PMN forman NETs y las fibras de ADN se encuentran asociadas a proteínas histonas (Figura 9) de forma similar a cuando son estimulados con PMA.

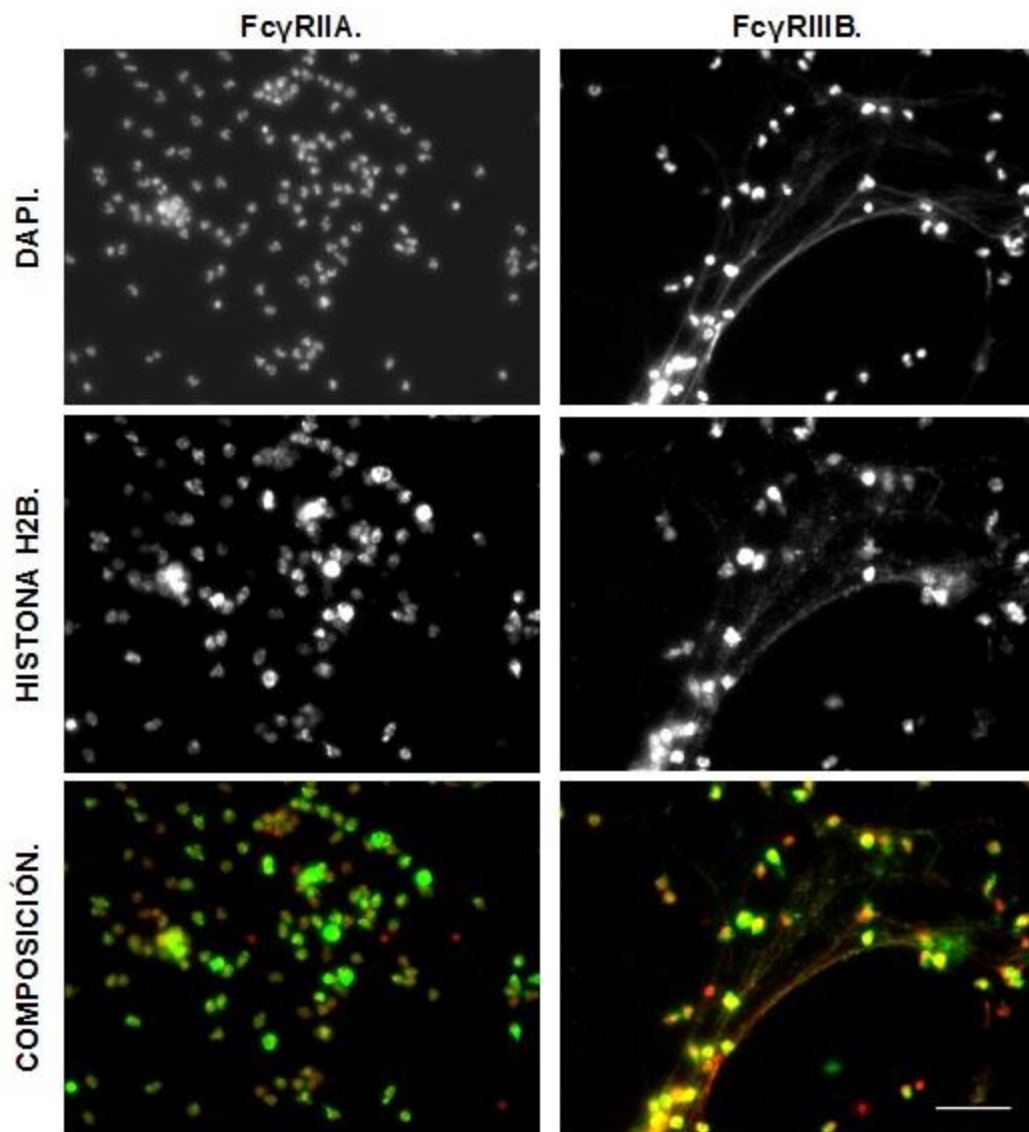


Figura 9. Activación de neutrófilos al estimular selectivamente cada receptor Fc con anticuerpos monoclonales específicos. El receptor FcγRIIIB inicia la formación de NETs (derecha). Se observa el componente estructural de las NETs ADN (rojo) así como la proteína histona H2B (verde). Al estimular el receptor FcγRIIA (izquierda) los PMN mantiene la conformación lobulada del núcleo. La barra representa 50 μm.

Al entrecruzar el receptor FcγRIIA los neutrófilos mantienen la integridad de la membrana plasmática y puede observarse la forma lobulada del núcleo, característica de PMN. En contraste al estimular el receptor FcγRIIB los PMN pierden la integridad de la membrana plasmática y pueden expulsar ADN al medio extracelular. (Figura 10).

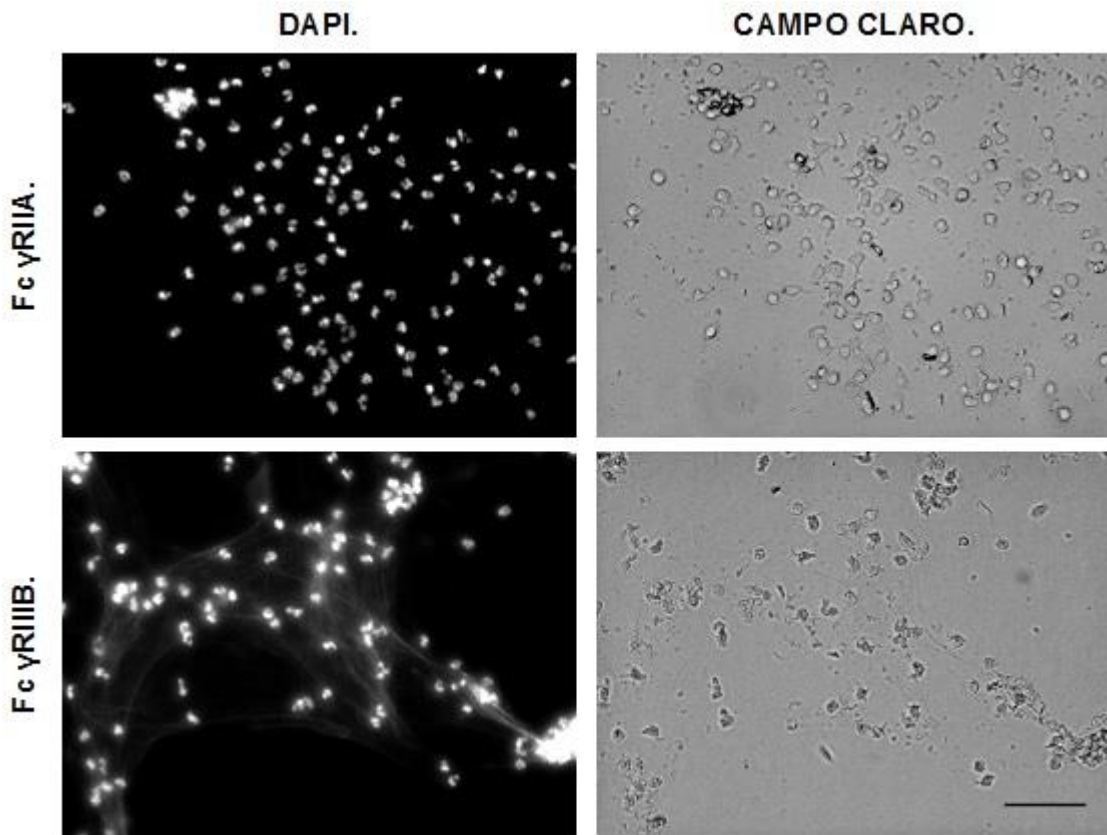


Figura 10. Estimulación de receptores Fc. Al estimular el receptor FcγRIIA (arriba) el núcleo mantiene la forma lobulada y la membrana plasmática se encuentra intacta. El receptor FcγRIIB (abajo) promueve la formación de NETs. La membrana plasmática pierde integridad y el ADN se encuentra en el medio extracelular. La barra representa 50 μm.

La presencia de proteínas microbidas provenientes de los gránulos de los PMN es una característica distintiva de las NETs. Al inducir la formación de NETs utilizando PMA, la presencia de elastasa asociada a las fibras, fue confirmada por inmunodetección (Figura 11). De igual manera, cuando se indujo la formación de NETs estimulando el receptor FcγRIIIB, la elastasa se encontró asociada a las fibras de ADN expulsadas por la célula (Figura 12). De forma contraria la estimulación del receptor FcγRIIA no indujo la formación de NETs. En este caso la elastasa se detecta en el interior de los PMN y no se asocia al ADN (Figura 12).

Estos datos indican que el entrecruzamiento del receptor FcγRIIIB es un estímulo eficiente para la formación de NETs.

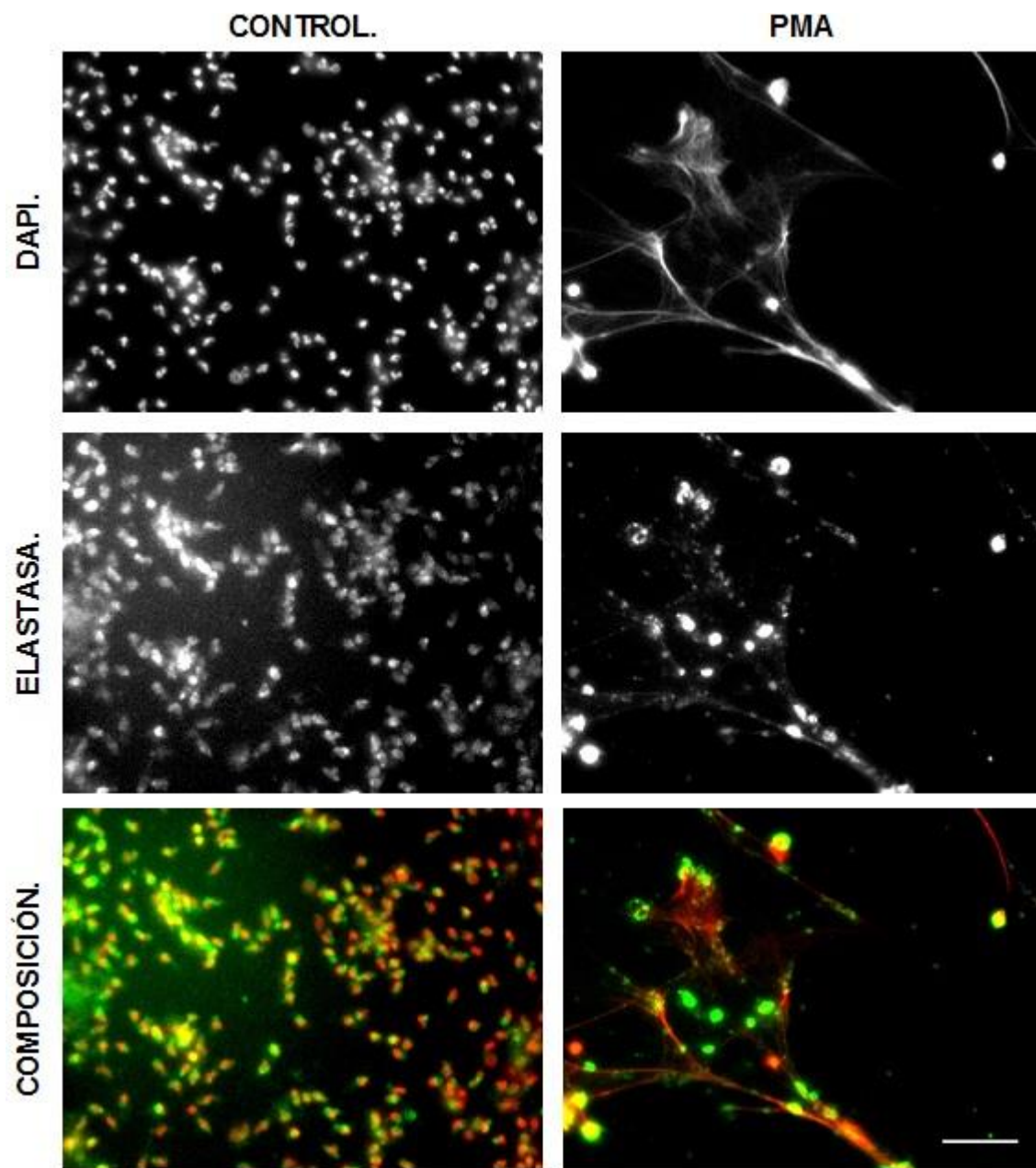


Figura 11. Detección de elastasa en PMN tratados con PMA. Al estimular los PMN con PMA (derecha) las fibras de ADN (rojo) expulsadas al medio extracelular se encuentran asociadas a la proteína microbicida elastasa (verde). La barra representa 50 μ m.

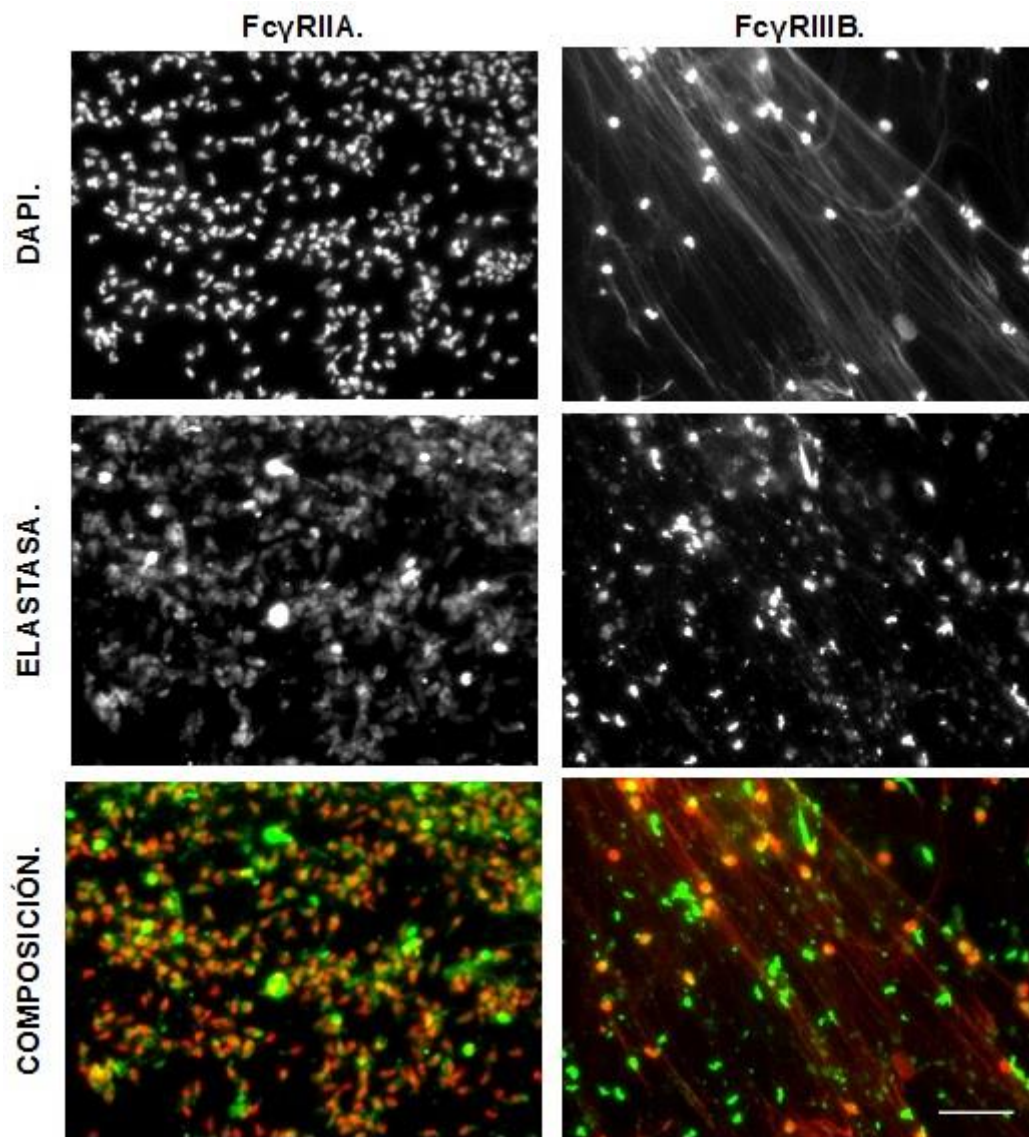


Figura 12. Detección de elastasa en PMN estimulados a través de los receptores Fc. El ADN expulsado al exterior de la célula (rojo) al estimular el receptor FcγRIIIB (derecha) se encuentra asociado a la proteína microbicida elastasa (verde). La barra representa 50 μ m.

Las integrinas $\beta 1$ no inducen la formación de NETs.

Al estimular a los PMN a través de entrecruzar a las integrinas $\beta 1$, con el anticuerpo monoclonal específico TS2/16, no se forman NETs. El núcleo de los PMN mantiene su forma lobulada típica en neutrófilos. De igual forma se conserva la integridad de la membrana plasmática (Figura 13).

En los PMN estimulados por integrinas $\beta 1$, las histonas H2B se localizaron, por inmunohistoquímica, solamente en el núcleo. De igual forma la elastasa se observó regionalizada en los gránulos, al interior de la célula (Figura 14). No hay colocalización de histonas y elastasa lo cual indica que los núcleos y gránulos permaneces intactos en estas células.

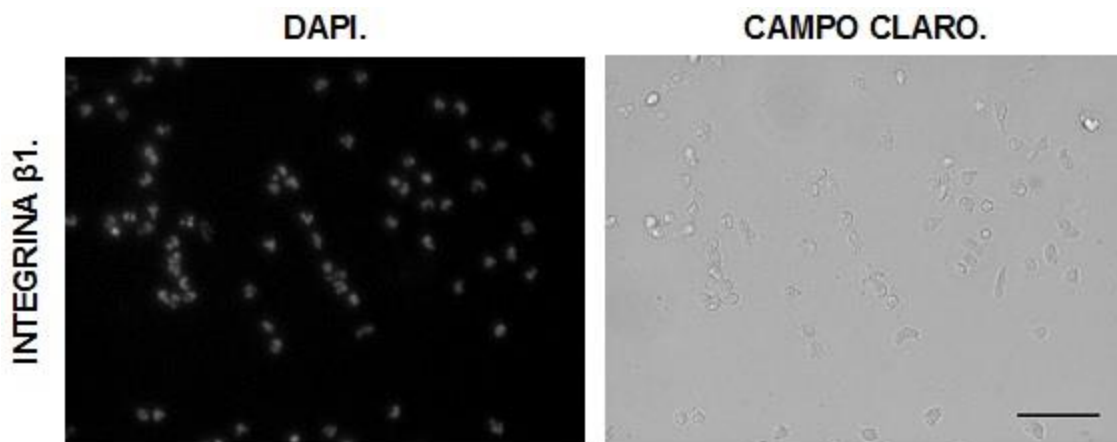


Figura 13. Estimulación de neutrófilos a través de las integrinas $\beta 1$. Al entrecruzar las integrinas $\beta 1$ no se inicia la formación de NETs. La membrana plasmática mantiene su integridad y el núcleo conserva su conformación lobulada. La barra representa 50 μm .

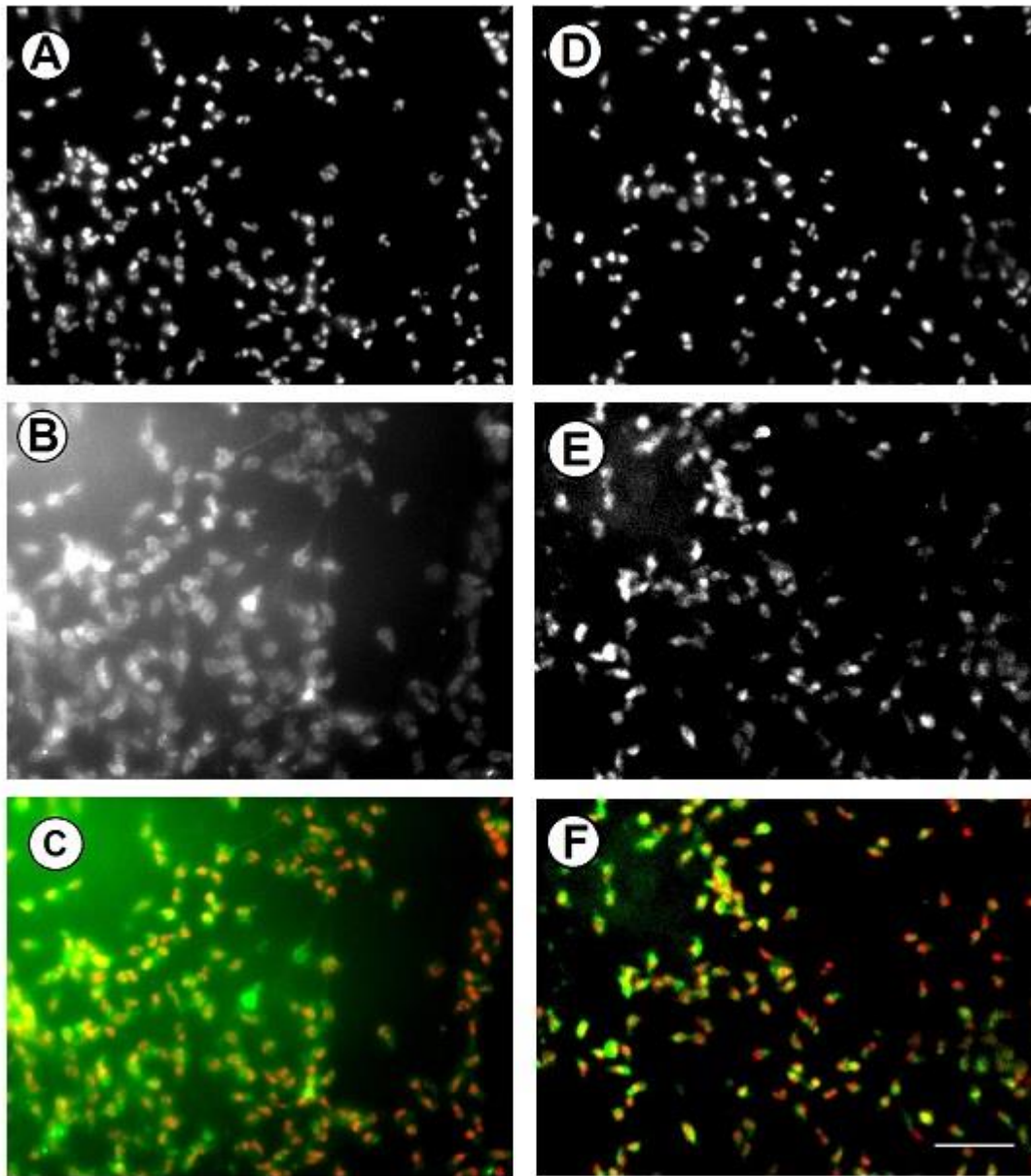


Figura 14. La ubicación de histonas y elastasa no cambia en los PMN estimulados por integrinas $\beta 1$. Al entrecruzar el receptor de integrina $\beta 1$ la elastasa (verde) se observa en el interior de la célula y el núcleo conserva su forma lobulada (rojo) (A-C) y las proteínas histonas (verde) en el núcleo (rojo) (D-F). La barra representa 50 μm .

Al realizar el análisis estadístico del área relativa de ADN se observó un incremento significativo entre los PMN estimulados con PMA y los estimulados con el anticuerpo 3G8 específico para el receptor FcγRIIIB respecto a los demás estímulos (Gráfico 1).

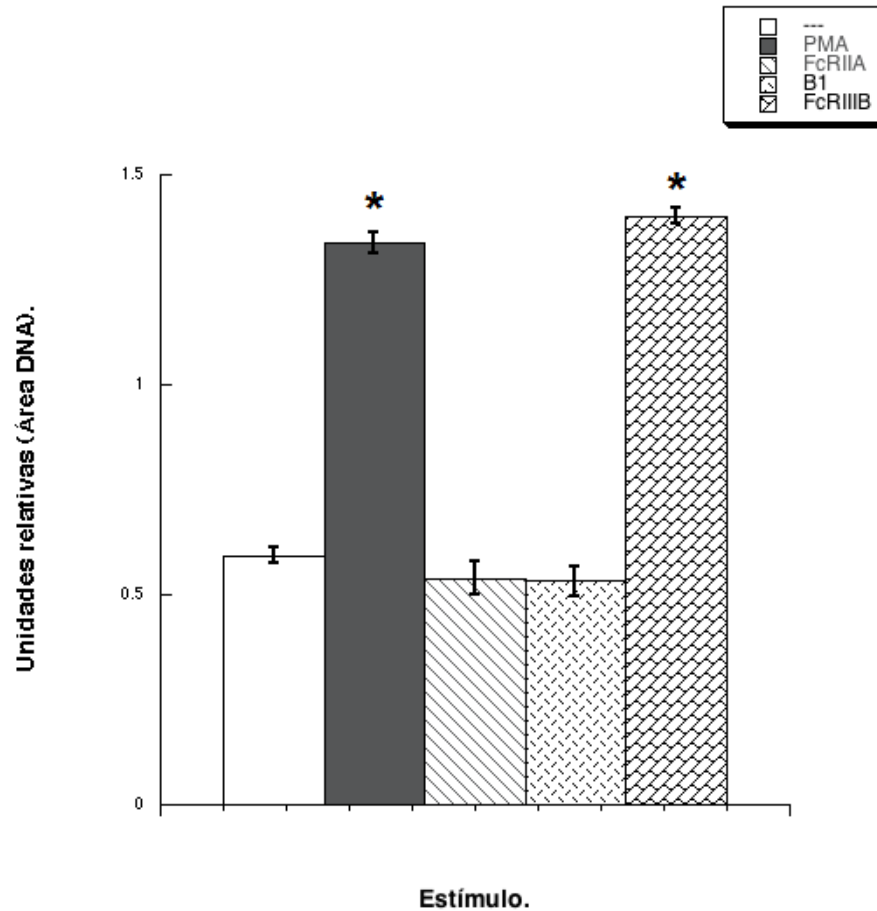


Gráfico 1. Promedio del área relativa de DNA (\pm E. E. M.) por condición experimental. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control con una $p < 1.1981E-16$.

Inhibidores farmacológicos.

Debido a que el PMA es un activador de PKC, la participación de esta cinasa en la formación de NETs iniciada por el receptor FcγRIIIB fue probada utilizando dos inhibidores específicos para PKC. Como se esperaba los PMN estimulados con PMA formaron NETs. Sin embargo, cuando los neutrófilos son tratados previamente con el inhibidor general Gö 6983 específico para las isoformas convencionales α , β y γ de PKC, o con el inhibidor Gö 6976, específico para las isoformas α y β de PKC, no se observa la formación NETs posterior al estímulo con PMA (Figura 14). De forma contraria, la formación de NETs debido al entrecruzamiento del receptor FcγRIIIB no es inhibida por ninguno de los dos inhibidores específicos para PKC (Figura 15). Esto sugiere que el receptor FcγRIIIB podría inducir la formación de NETs por una vía independiente de PKC.

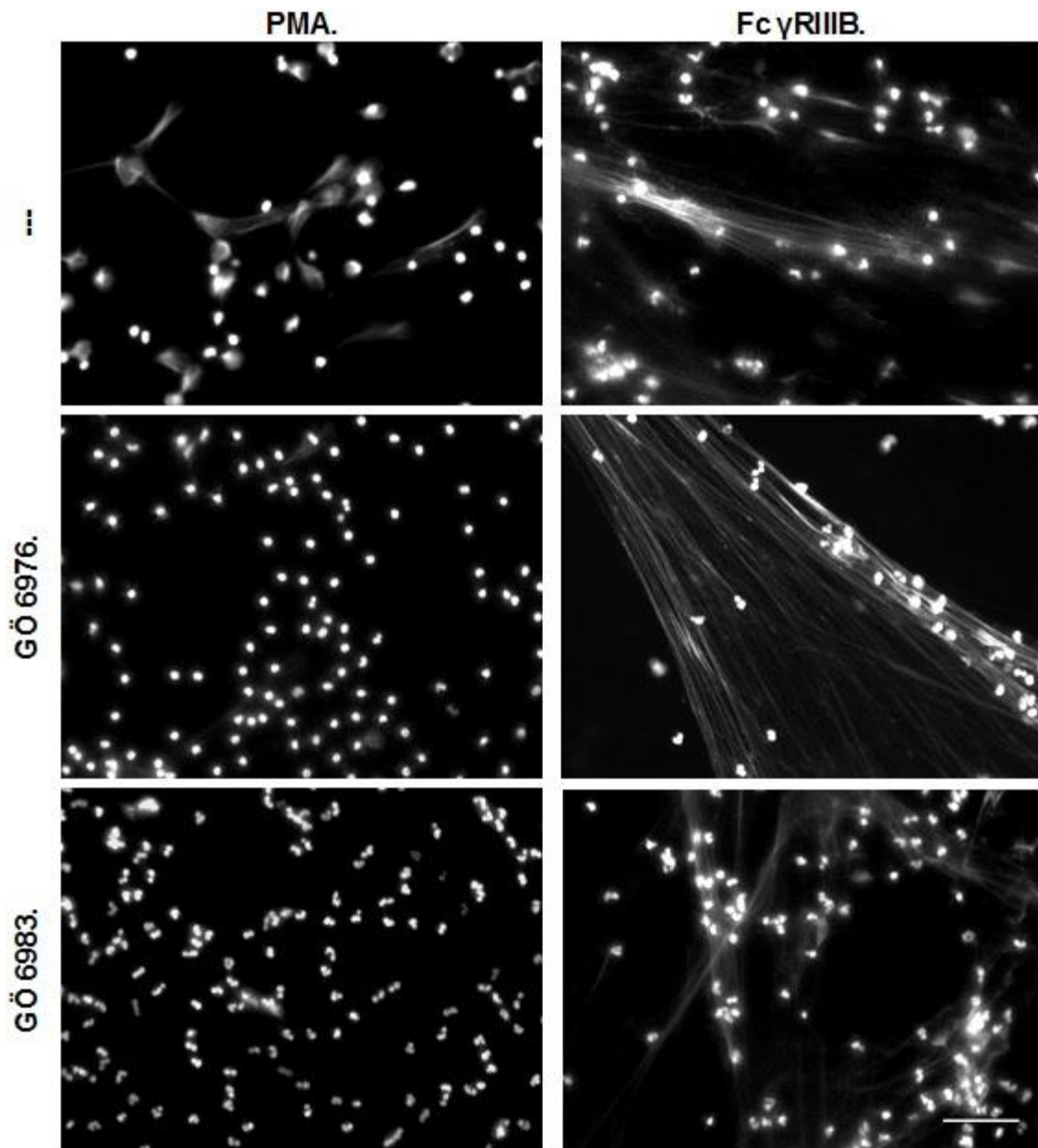


Figura 15. Tratamiento con los inhibidores específicos para PKC. Los neutrófilos pretratados con los inhibidores para PKC son incapaces de formar NETs al ser estimulados con PMA (izquierda). En contraste la formación de NETs inducida por el estímulo al receptor Fc γ RIIIB no logra ser detenida por los inhibidores para PKC (derecha). La barra representa 50 μ m.

Al realizar el análisis estadístico del área relativa de ADN utilizando los inhibidores específicos para la molécula PKC Gö 6976 y Gö 6983 se observó un decremento significativo con respecto al control en la estimación del área relativa de ADN de los neutrófilos estimulados con PMA, sin embargo los PMN estimulados vía el FcγRIIIB no mostraron diferencias significativas respecto al control en la estimación del área relativa de ADN (Gráfico 2).

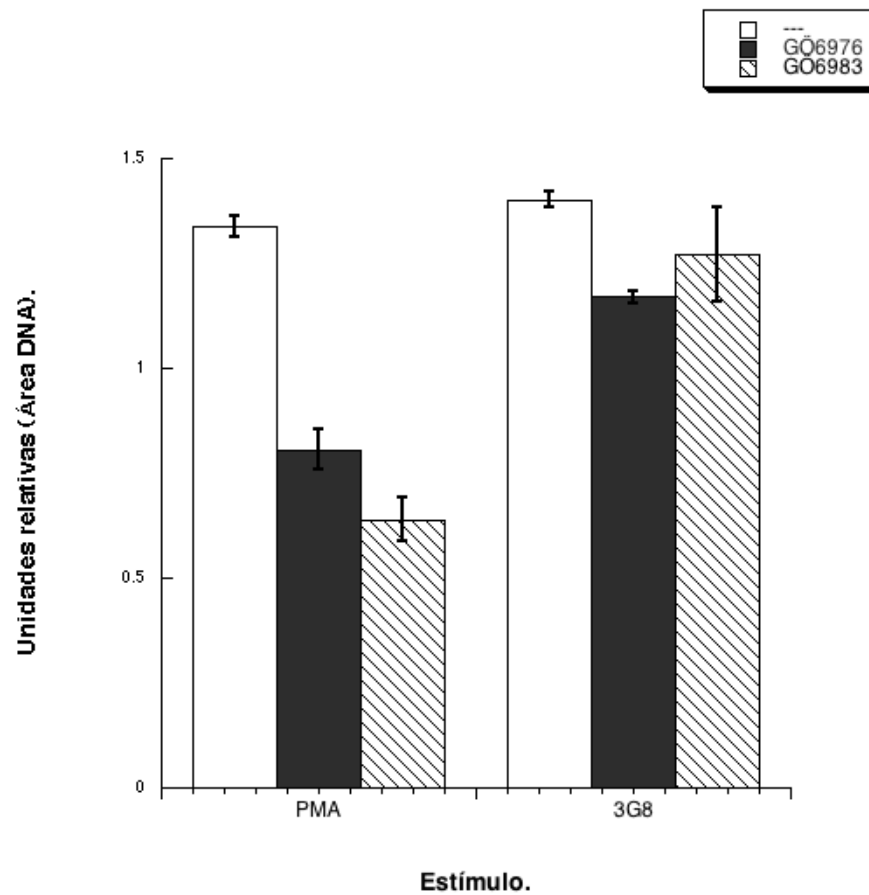


Gráfico 2. Promedio del área relativa de DNA (\pm E. E. M.) al utilizar los inhibidores específicos para PKC. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control con una $p < 1.9429E-07$.

Dado que, se ha reportado la participación de la vía de señalización MEK-ERK en la formación de NETs posterior a la estimulación con PMA (Hakkim et al., 2010). Cuando los PMN son tratados con el inhibidor UO126, específico para MEK, los neutrófilos son incapaces de formar NETs al ser estimulados con PMA (Figura 16). En contraste, el tratamiento con el inhibidor UO126 no afecta la formación de NETs iniciada por el entrecruzamiento del receptor FcγRIIIB (Figura 16). Esto sugiere que al estimular el receptor FcγRIIIB los PMN forman NETs sin involucrar la vía MEK-ERK.

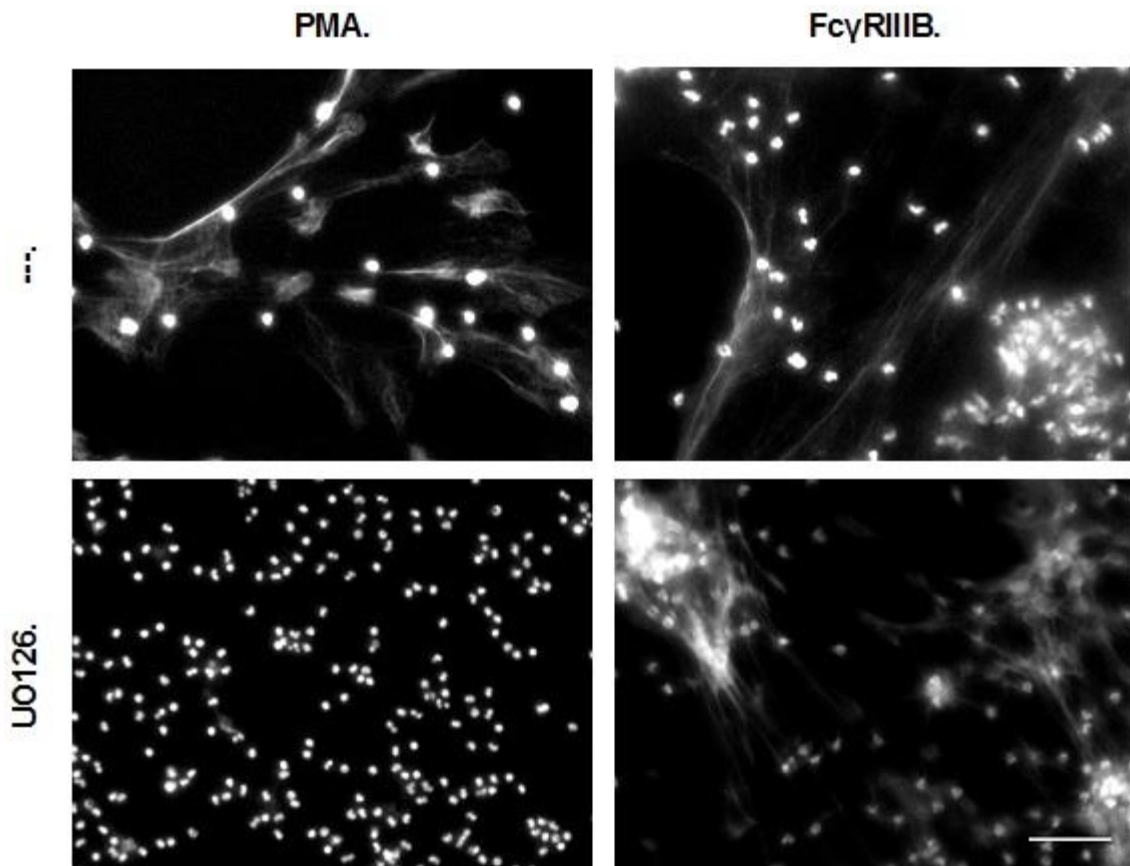


Figura 16. Tratamiento con el inhibidor específico para MEK. Al estimular los PMN con PMA el pretratamiento con el inhibidor para MEK impide la formación de NETs. De forma contraria al tratar los neutrófilos con el inhibidor para MEK y estimular el receptor FcγRIIIB no se impide la formación de NETs. La barra representa 50 μm .

El análisis estadístico del área relativa de DNA al utilizar el inhibidor UO126 específico para la molécula MEK y estimular el receptor FcγRIIIB no arroja diferencias significativas respecto al control, en contraste al inhibir la molécula MEK y estimular con el éster de forbol PMA se observó un decremento significativo en el área relativa de ADN respecto al control (Gráfico 3).

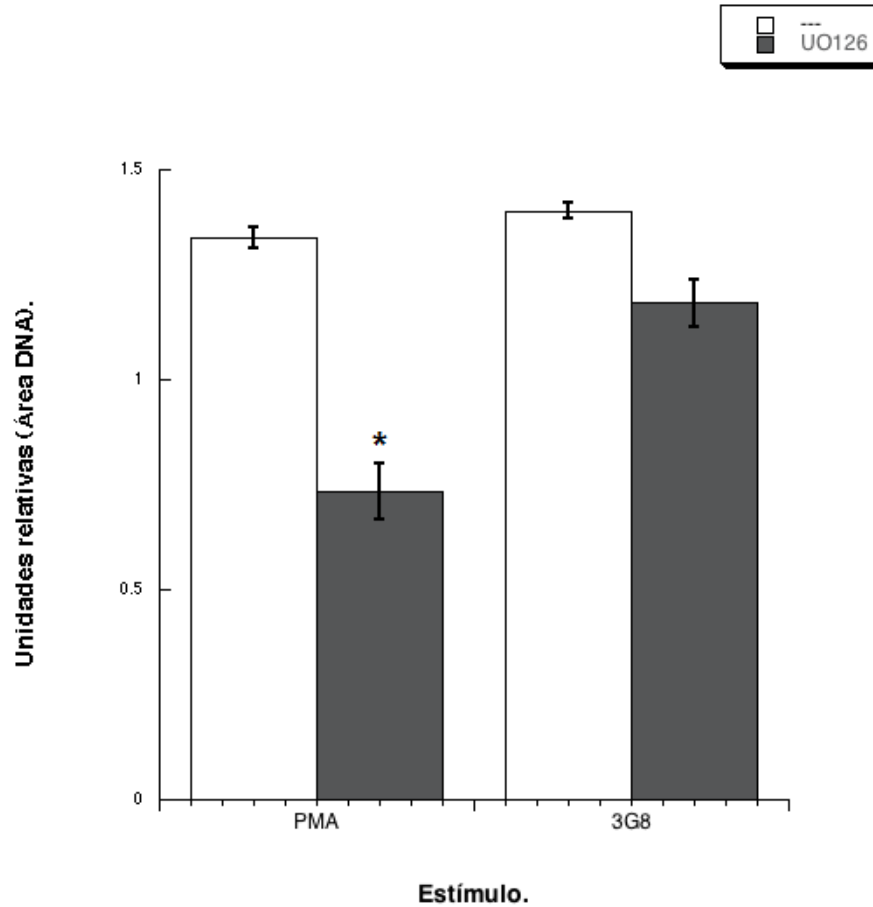


Gráfico 3. Promedio del área relativa de ADN (\pm E. E. M.) al utilizar el inhibidor específico para MEK. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control con una $p < 0.001$.

Otra molécula importante en la vía de señalización inducida por receptores Fc que contienen secuencias ITAM es Syk (spleen tyrosine kinase). Para evaluar la participación de esta molécula en la formación de NETs dependiente del receptor FcγRIIIB, los PMN fueron tratados con iSyk o Piceatannol, dos inhibidores de Syk, antes de la estimulación. Ninguno de estos inhibidores tiene efecto en la formación de NETs cuando los PMN son estimulados con PMA (Figura 17). De igual manera en presencia de estos inhibidores los neutrófilos forman NETs después de entrecruzar el receptor FcγRIIIB (Figura 17). Estos datos sugieren que la formación de NETs es independiente de Syk.

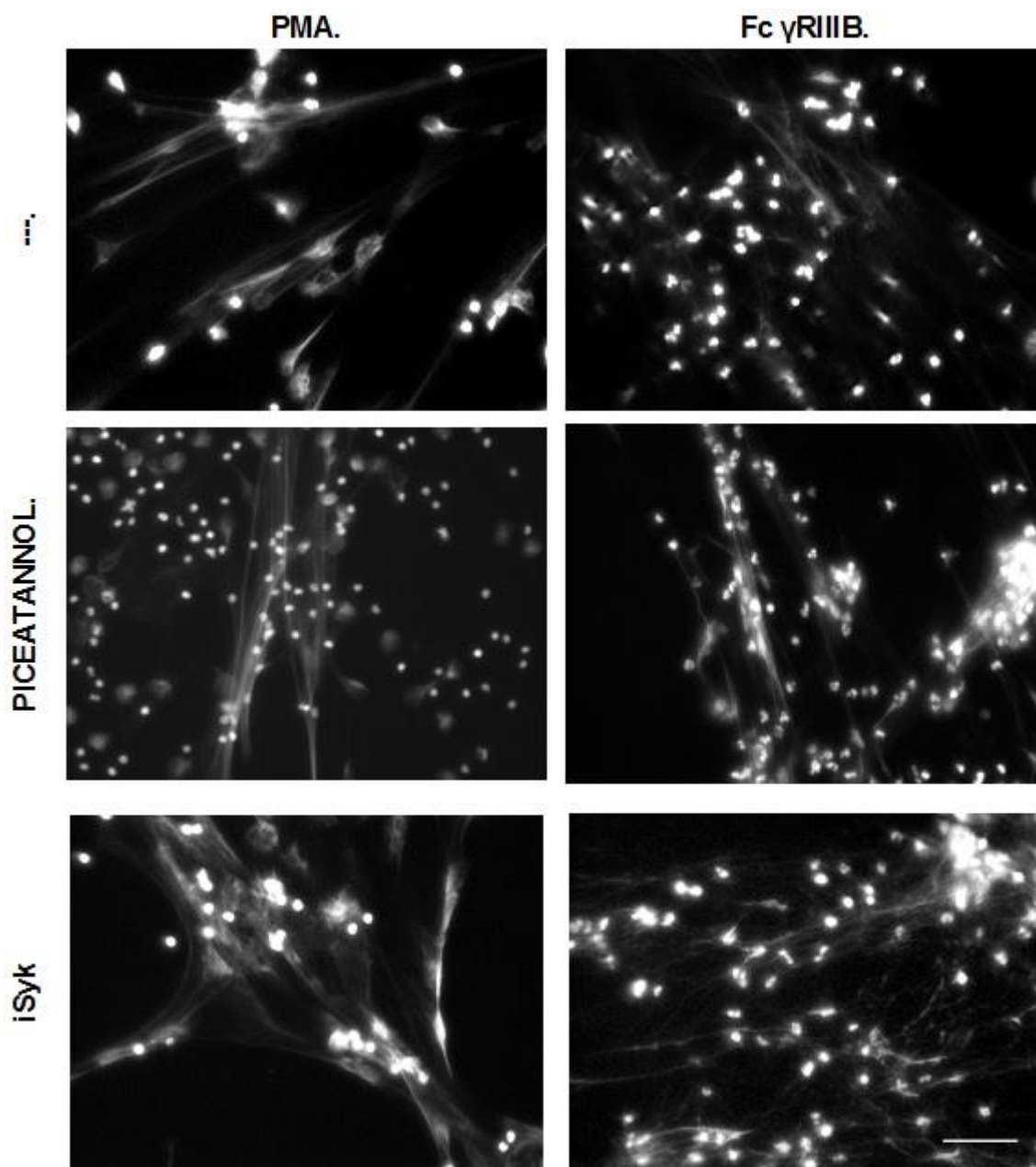


Figura 17. Tratamiento con los inhibidores específicos para Syk. Al estimular los PMN con PMA ninguno de los inhibidores para Syk impide la formación de NETs. De igual forma al estimular el receptor Fc γ RIIIB y tratar los neutrófilos con los inhibidores para Syk no se impide la formación de NETs. La barra representa 50 μ m.

Al utilizar los inhibidores Piceatannol e iSyk específicos para la molécula Syk no se observaron diferencias significativas respecto al control en el área relativa de ADN para ninguno de los dos estímulos utilizados (Gráfico 4).

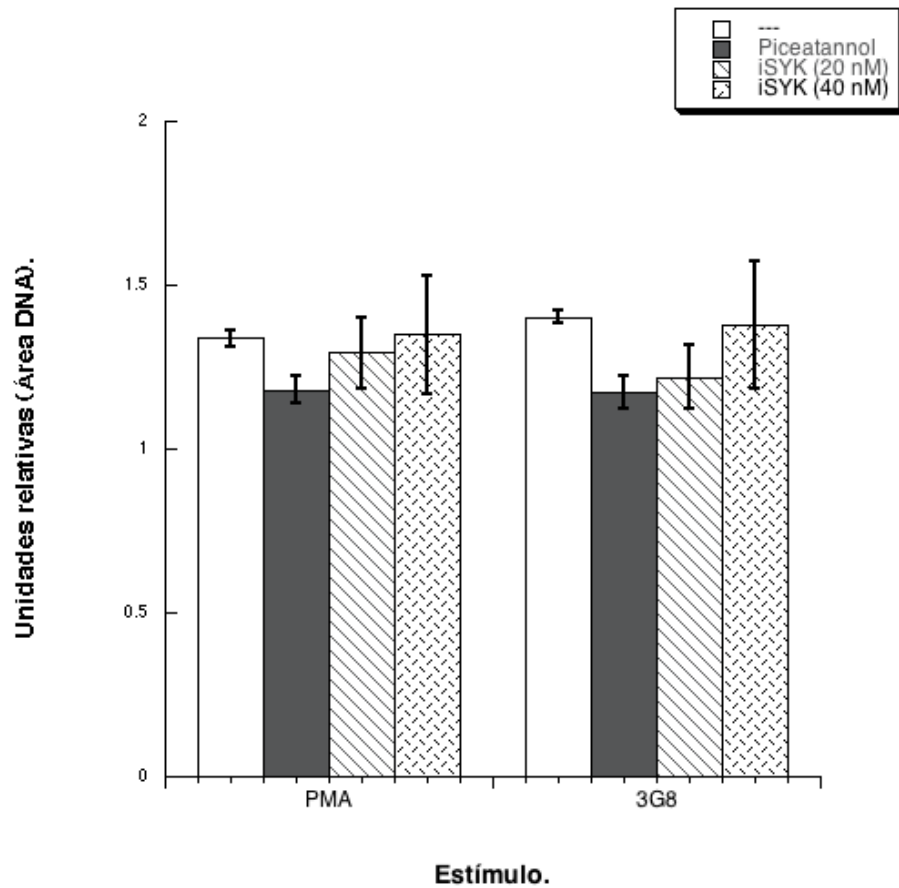


Gráfico 4. Promedio del área relativa de ADN (\pm E. E. M.) inhibiendo la molécula Syk con dos diferentes inhibidores. No se observan diferencias significativas entre los grupos.

De forma similar la molécula PI-3K (phosphatidylinositol 3-kinase) participa de forma importante en la vía de señalización inducida por receptores Fc que tienen secuencias ITAM. Para evaluar la participación de PI3-K en la formación de NETs dependiente del receptor FcγRIIIB, los PMN fueron tratados con Wortmannin C, un inhibidor de PI3-K antes de la estimulación. Este inhibidor no mostró efecto alguno en la formación de NETs en los PMN estimulados con PMA (Figura 18). De igual manera en presencia de Wortmannin C los neutrófilos forman NETs después de estimular el receptor FcγRIIIB (Figura 18). Estos datos también sugieren que la formación de NETs es independiente de PI-3K.

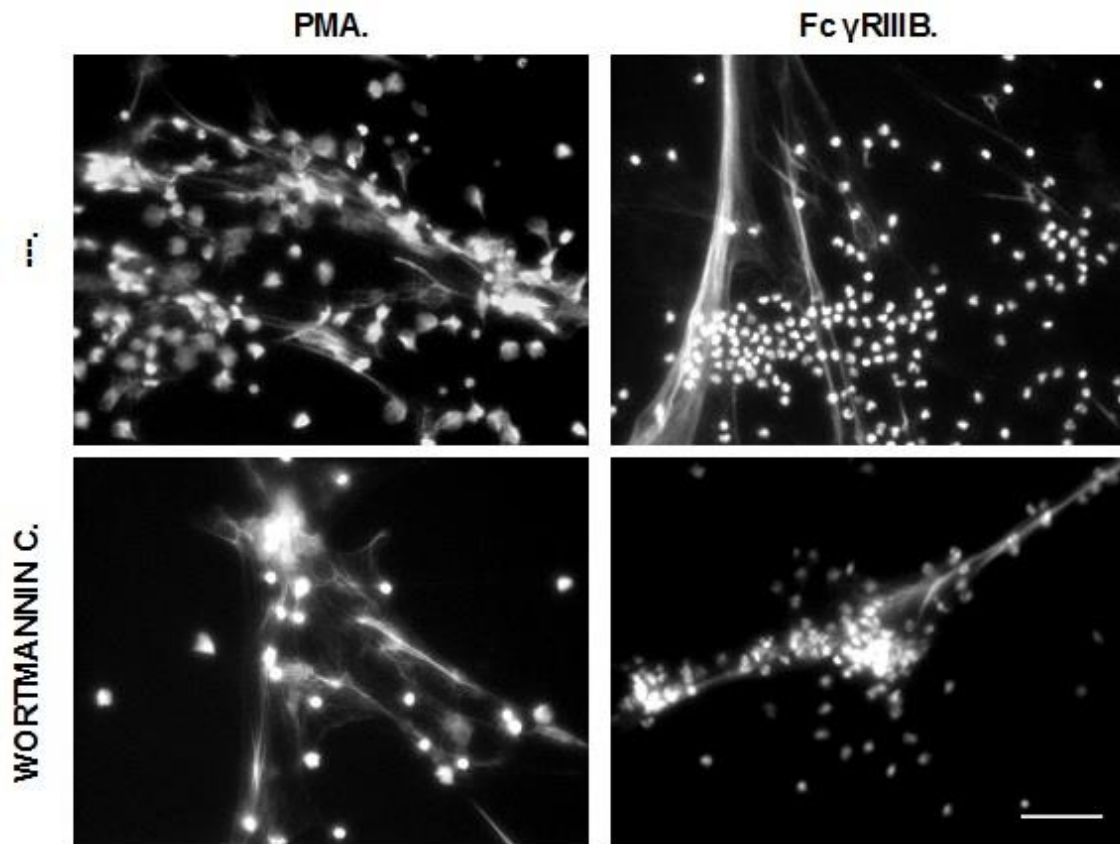


Figura 18. Tratamiento con el inhibidor específico para PI-3K. Al estimular el receptor FcγRIIIB y tratar los neutrófilos con el inhibidor para PI-3K no se impide la formación de NETs. Los PMN tratados con el inhibidor específico para PI-3K y estimulados con PMA forman NETs de manera eficiente. La barra representa 50 μm.

La inhibición de la molécula PI3-K con el inhibidor Wortmannin c no arroja diferencias significativas en el análisis del área relativa de ADN para ambos estímulos respecto al control (Gráfico 5).

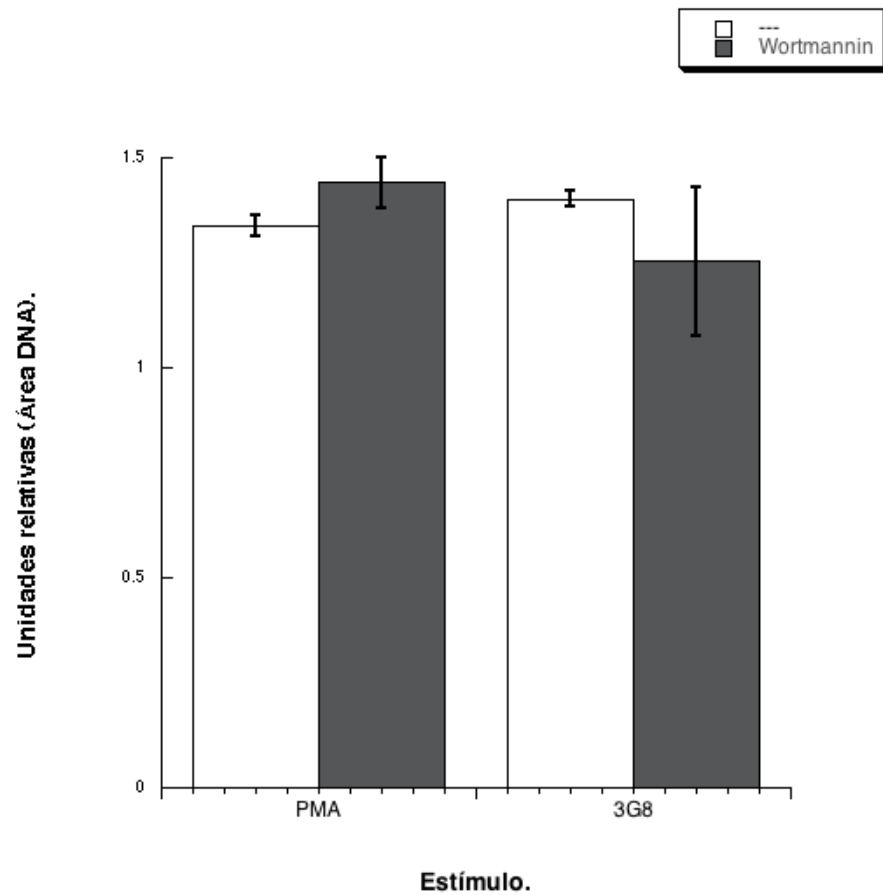


Gráfico 5. Promedio del área relativa de ADN (\pm E. E. M.) inhibiendo la molécula PI-3K. No se observan diferencias significativas entre

La formación de NETs posterior a la estimulación con PMA requiere la activación de la NADPH oxidasa y la formación de ROS (Fuchs *et. al.*, 2007). Por lo tanto, para evaluar la participación de esta enzima en la formación de NETs dependiente del receptor FcγRIIIB, los neutrófilos fueron tratados con el inhibidor diphenylene iodonium (DPI) un inhibidor para NADPH oxidasa. En presencia del inhibidor los PMN estimulados con PMA no forman NETs (Figura 19). De igual manera entrecruzando el receptor FcγRIIIB, los PMN tratados con DPI son incapaces de formar NETs (Figura. 19).

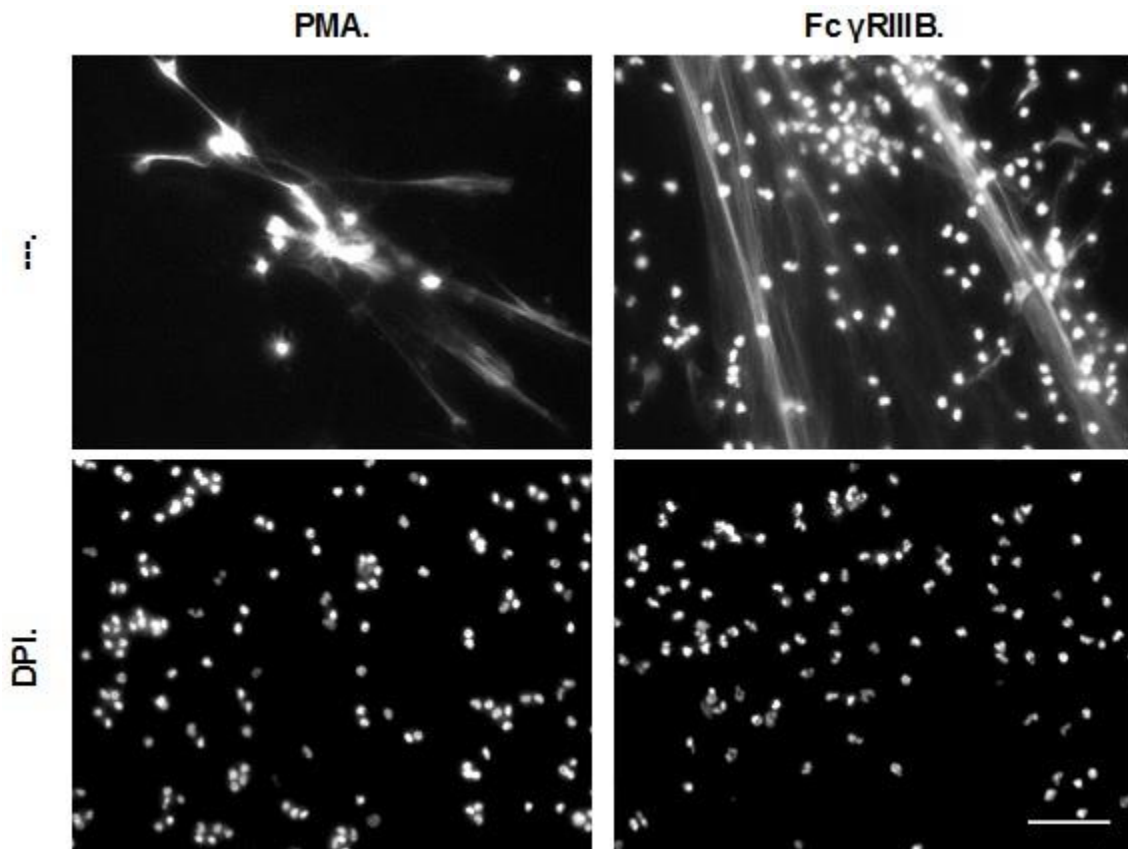


Figura 19. Tratamiento con el inhibidor específico para NADPH oxidasa. Al estimular el receptor FcγRIIIB y tratar los neutrófilos con el inhibidor DPI se impide la formación de NETs. De igual forma los PMN tratados con el inhibidor específico para NADPH oxidasa y estimulados con PMA no son capaces de formar NETs. La barra representa 50 μm.

La inhibición del complejo NADPH oxidasa con el inhibidor DPI mostró una disminución significativa respecto al control del área relativa de DNA para ambos estímulos tanto al tratar los PMN con el éster de forbol PMA como con el tratamiento al receptor FcγRIIIB respecto al control (Gráfico 6).

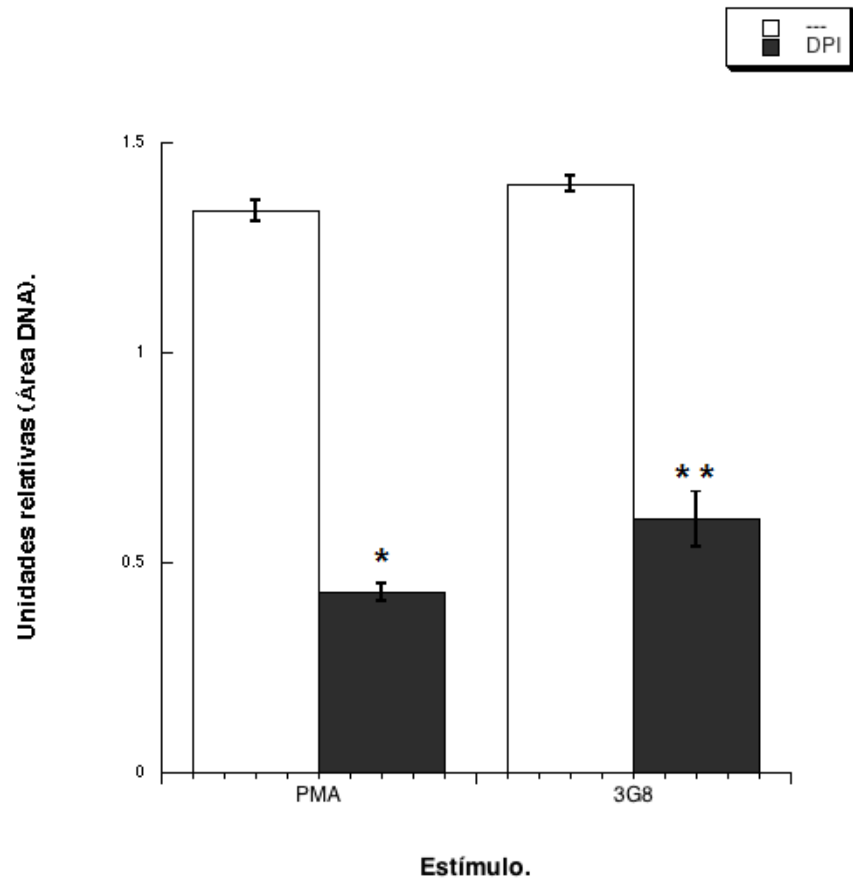


Gráfico 6. Promedio del área relativa de DNA (\pm E. E. M.) al inhibir la molécula NADPH oxidasa. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control. * $p < 3.9718E-07$ ** $p < 0.0002$.

Recientemente, se ha reportado que la formación de NETs posterior a la estimulación con PMA es dependiente de la activación del factor de transcripción NF- κ B (Lapponi, *et al.* 2013). Por tal motivo, se evaluó la participación de esta molécula en la formación de NETs estimulando el receptor Fc γ RIIIB. Los PMN fueron tratados con BAY 11-7082, un inhibidor de NF- κ B. Los neutrófilos estimulados con PMA en presencia del inhibidor no formaron NETs (Figura 20). En contraste, los PMN tratados con dos diferentes concentraciones del inhibidor, forman NETs de una forma eficiente al entrecruzar el receptor Fc γ RIIIB (Figura 20). Por lo tanto al estimular este receptor la formación de NETs es independiente de NF- κ B.

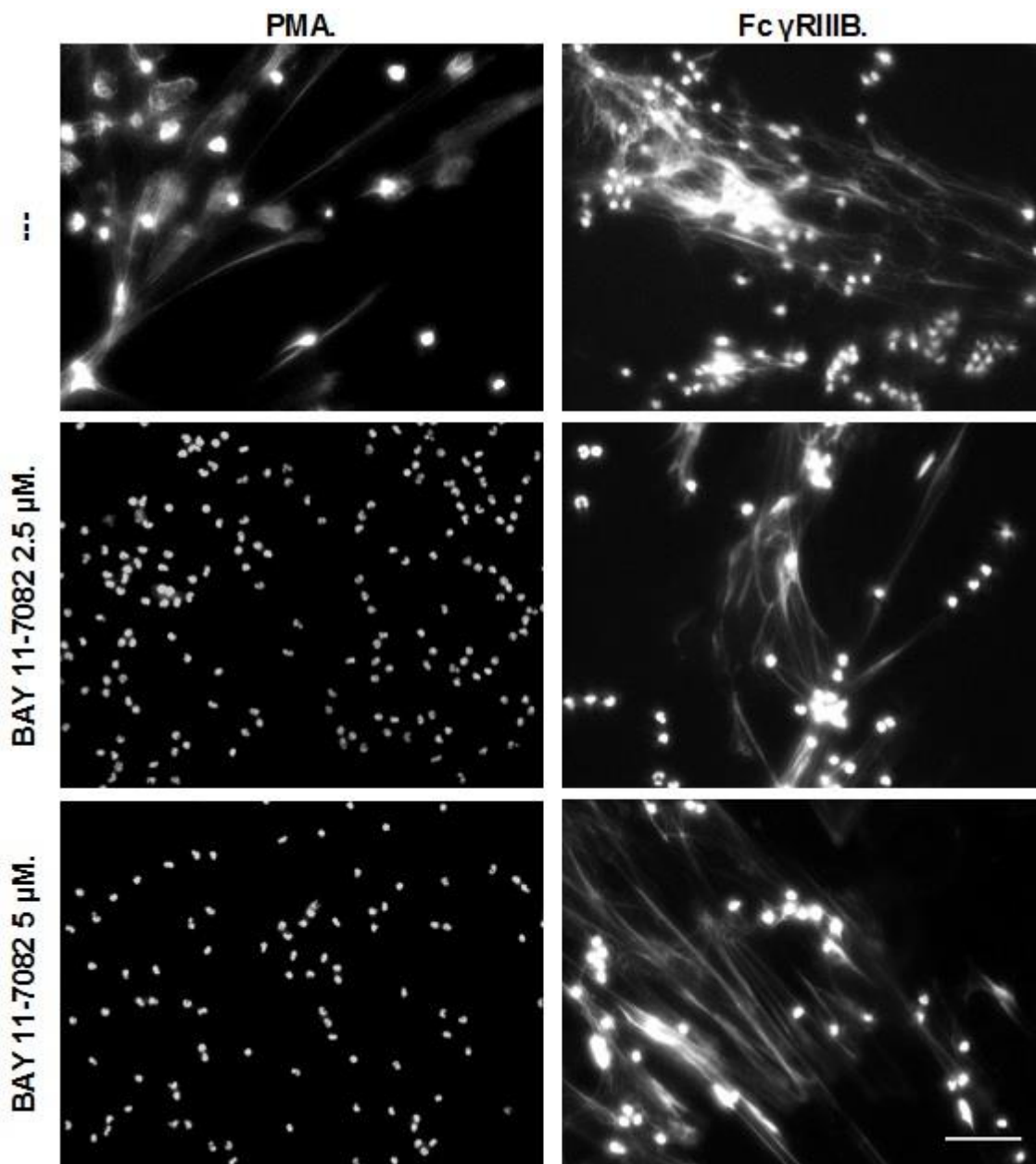


Figura 20. Tratamiento con el inhibidor específico para NF- κ B. Al estimular los PMN con PMA el pretratamiento con el inhibidor para NF- κ B se impide la formación de NETs. En contraste al tratar los PMN con el inhibidor para NF- κ B y estimular el receptor Fc γ RIIB no se impide la formación de NETs. La barra representa 50 μ m.

La inhibición de la molécula NF- κ B con el inhibidor específico Bay 117082 no mostro diferencias significativas en el análisis del área relativa de ADN al estimular el receptor Fc γ RIIB respecto al control. Sin embargo al estimular con PMA e inhibir la molécula NF- κ B se observó un decremento significativo en el análisis del área relativa de DNA respecto al control (Gráfico 7).

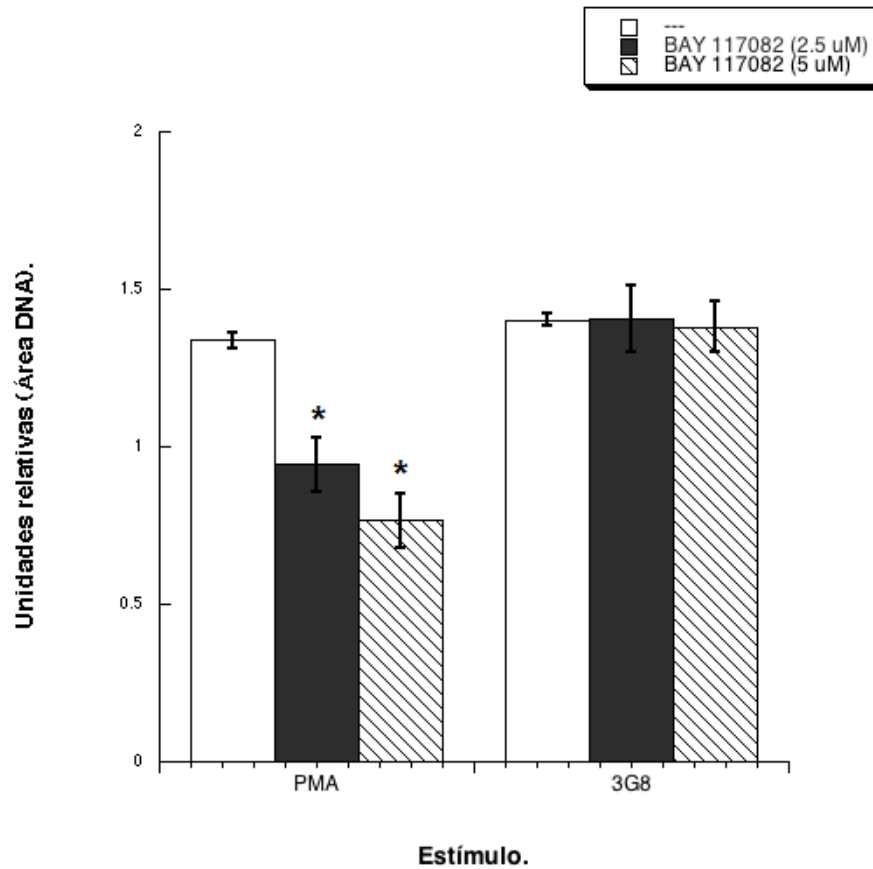


Gráfico 7. Promedio del área relativa de ADN (\pm E. E. M.) al inhibir la molécula NF- κ B. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control con una $p < 0.0003$.

Discusión.

La activación de los neutrófilos a través de distintos receptores de membrana es necesaria para iniciar diferentes mecanismos de defensa incluyendo: la fagocitosis, el estallido respiratorio y la degranulación de agentes microbicidas (Borregaard, 2010; Brinkmann *et al.*, 2004; Futosi *et al.*, 2013; Rosales, 2007); recientemente una nueva estrategia utilizada por los PMN para combatir a los microorganismos fue descrita esta consiste en la formación de NETs. Actualmente se conocen una gran variedad de patógenos capaces de iniciar la formación de NETs incluyendo virus, bacterias, hongos y parásitos (Jenne *et al.*, 2013; Saitoh *et al.*, 2012; Hemmers *et al.*, 2011; Narasaraju *et al.*, 2011; Fuchs *et al.*, 2007; Pilsczek *et al.*, 2010; Berends *et al.*, 2010; Buchanan *et al.*, 2006; Lauth *et al.*, 2009; Grinberg *et al.*, 2008; Urban *et al.*, 2006; Ramos-Kichik *et al.*, 2009; Chuah *et al.*, 2013; Brinkmann *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2009; Casutt-Meyer *et al.*, 2010; Aulik *et al.*, 2010; Bruns *et al.*, 2010; Bianchi *et al.*, 2009; Guimarães-Costa *et al.*, 2009; Abi Abdallah *et al.*, 2012), sin embargo no se ha descrito un receptor específico presente en el neutrófilo que induzca la formación de NETs únicamente se ha reportado que la formación de NETs se logra o se ve incrementada al utilizar microorganismos que fueron previamente opsonizados con suero autólogo (Grinberg *et al.*, 2008; Lauth *et al.*, 2009; Metzler *et al.*, 2011; Parker *et al.*, 2012; Pilsczek *et al.*, 2010; Urban *et al.*, 2006; Yipp *et al.*, 2012), estos reportes sugieren la posible participación de los receptores para IgG (FcγR) presentes en los PMN en la formación de NETs. Constitutivamente el neutrófilo expresa dos tipos de FcγR, el FcγRIIA y el FcγRIIB. Se sabe que el receptor FcγRIIA participa de forma importante en el

proceso de fagocitosis, en contraste no se conoce la función del receptor FcγRIIIB (Rosales y Uribe-Querol, 2013).

En este trabajo se demostró de manera contundente que el receptor FcγRIIIB y no el FcγRIIA, inicia la formación de NETs. La estimulación selectiva con el anticuerpo monoclonal 3G8 específico para el receptor FcγRIIIB inicia la formación de NETs después de 4 h de estimulación, dichas redes muestran una morfología similar a las formadas posterior a la estimulación con PMA, es decir, están formadas de un esqueleto de cromatina asociado con al menos elastasa que es una proteína almacenada en los gránulos del neutrófilo (Brinkmann *et al.*, 2004). Adicionalmente se conoce que el entrecruzamiento del receptor FcγRIIIB es capaz de activar integrinas $\beta 1$ (Ortiz-Stern y Rosales, 2005), sin embargo aquí se demostró que el entrecruzamiento de este receptor no promueve la formación de NETs. Al igual que con PMA la formación de NETs vía FcγRIIIB es dependiente de la formación de ROS ya que en presencia del inhibidor para NADPH-oxidasa DPI no se logran formar NETs (Fuchs *et al.*, 2007).

Se ha reportado la participación de proteínas cinasa C (PKC) en la formación de NETs vía PMA (Gray *et al.*, 2013), sin embargo al inhibir estas moléculas entrecruzando al receptor FcγRIIIB no se observa efecto alguno en la formación de redes, lo que sugiere que la formación de NETs al estimular el receptor FcγRIIIB es independiente de PKC. De forma similar se ha reportado la participación de MEK en la formación de NETs inducida por PMA (Hakkim *et al.*, 2010) , en contraste la formación de NETs estimulando el receptor FcγRIIIB no logra bloquearse inhibiendo MEK.

Reporte demuestran que la formación de NETs posterior al estímulo con PMA es

dependiente del factor de transcripción NF- κ B (Lapponi *et al.*, 2013), no obstante la formación de NETs vía Fc γ RIIIB mostro ser independiente de este factor transcripcional.

Se conoce que la vía de señalización de los receptores Fc dependiente de ITAM involucra a las moléculas Syk y PI3-K (Rosales, 2007), en contraste se demostró que la formación de NETs es independiente de PI-3K o Syk posterior al estímulo con PMA o Fc γ RIIIB. Los datos obtenidos sugieren que la formación de NETs inducida por el Fc γ RIIIB sigue una vía de señalización distinta a la utilizada en la inducción de NETs estimulando con PMA y únicamente coincide en la utilización de ROS formados por el complejo NADPH-oxidasa.

Conclusiones.

Los datos obtenidos en este trabajo muestran de manera contundente que el FcγRIIIB, es capaz de inducir la formación de NETs, similares estructuralmente a las redes formadas posterior al estímulo con PMA ya que están compuestas de un esqueleto de cromatina asociado a elastasa la cual es una proteína almacenada en los gránulos del neutrófilo, en contraste el receptor FcγRIIA no promueve la formación de NETs. Este hallazgo apoya la idea de que cada receptor Fc regula diferentes funciones celulares. Adicionalmente los datos demuestran que el receptor de integrina β1 no participa en la formación NETs.

Por otra parte los datos sugieren que la vía de señalización utilizada por el FcγRIIIB es distinta a la activada por PMA, ya que es independiente de NF-κB, ERK y PKC. Además la formación de NETs inducida por el FcγRIIIB es un proceso dependiente de la formación de ROS, las cuales son producidas por el complejo NADPH-oxidasa ya que al inhibir su actividad no se logra la formación de NETs.

Perspectivas.

Los mecanismos moleculares utilizados por el receptor FcγRIIIB son desconocidos, sin embargo existen reportes en los cuales se muestra que el receptor FcγRIIIB puede activar integrinas β2 en neutrófilos humanos. Los neutrófilos expresan dos tipos de receptores para integrina β2 el receptor LFA-1 (αLβ2) Mac-1 (αMβ2) las cuales podrían no solo estar involucrados en la adhesión sino que también podrían estar participando en la vía de señalización necesaria para la formación de NETs (Futosi *et al* 2013). Por tanto se planea evaluar la participación de las integrinas β2 presentes en neutrófilos humanos en la formación de NETs.

Referencias.

- Abi Abdallah, D.S., C. Lin, C.J. Ball, M.R. King, G.E. Duhamel, y E.Y. Denkers. 2012. *Toxoplasma gondii* Triggers Release of Human and Mouse Neutrophil Extracellular Traps. *Infect Immun.* 80:768-777.
- Aulik, N.A., K.M. Hellenbrand, H. Klos, y C.J. Czuprynski. 2010. *Mannheimia haemolytica* and Its Leukotoxin Cause Neutrophil Extracellular Trap Formation by Bovine Neutrophils. *Infect. Immun.* 78:4454-4466.
- Berends, E., A.R. Horswill, N.M. Haste, M. Monestier, V. Nizet, y M. von Kockritz-Blickwede. 2010. Nuclease Expression by *Staphylococcus aureus* Facilitates Escape from Neutrophil Extracellular Traps. *J Innate Immun* 2:576–586
- Bianchi, M., A. Hakkim, V. Brinkmann, U. Siler, R.A. Seger, A. Zychlinsky, y J. Reichenbach. 2009. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood.* 114:2919-2622.
- Borregaard, N. 2010. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* 33:657-670.
- Borregaard, N., y J. Cowland. 1997. Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood.* 89:3503-3521.
- Bremer M., y R. W. Doerge. 2010. Statistics at the bench: A step-by-step handbook for biologist. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. pp. 167.
- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. Weiss, Y. Weinrauch, y A. Zychlinsky. 2004. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science.* 303:1532–1535.
- Brinkmann, V., y A. Zychlinsky. 2007. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs *Nature* 5:577-582.
- Brinkmann, V., y A. Zychlinsky. 2012. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? . *J Cell Biol* 198:773-783.
- Bruns, S., O. Knemeyer, M. Hasenberg, V. Aimanianda, S. Nietzsche, A. Thywißen, A. Jeron, J.P. Latgé, A.A. Brakhage, y M. Gunzer. 2010. Production of Extracellular Traps against *Aspergillus fumigatus* In Vitro and in Infected Lung Tissue Is Dependent on Invading Neutrophils and Influenced by Hydrophobin RodA. *PLoS Pathog* 6:e1000873. doi:1000810.1001371/journal.ppat.1000873.
- Buchanan, J., A. Simpson, R. Aziz, G. Liu, S. Kristian, M. Kotb, J. Feramisco, y V. Nizet. 2006. DNase Expression Allows the Pathogen Group A *Streptococcus* to Escape Killing in Neutrophil Extracellular Traps. *Current Biology.* 16:396-400.
- Casutt-Meyer, S., F. Renzi, M. Schmalzer, N.J. Jann, M. Amstutz, y G.R. Cornelis. 2010. Oligomeric coiled-coil adhesin YadA is a doubleedged sword. *PLoS ONE.* 5:e15159. doi: 15110.11371/journal.pone.0015159.
- Chuah, C., M.K. Jones, M.L. Burke, H.C. Owen, B.J. Anthony, D.P. McManus, G.A. Ramm, y G.N. Gobert. 2013. Spatial and temporal transcriptomics of *Schistosoma japonicum*-induced hepatic granuloma formation reveals novel roles for neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 94:353-365.

- Fuchs, T.A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, y A. Zychlinsky. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176:231-241.
- Futosi, K., S. Fodor, y A. Mócsai. 2013. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int. Immunopharmacol.* 17:638-650.
- Gray, R.D., C.D. Lucas, A. MacKellar, F. Li, K. Hiersemenzel, C. Haslett, D.J. Davidson, y A.G. Rossi. 2013. Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the generation of human neutrophil extracellular traps. *J Inflamm (Lond)*. 10:12.
- Grinberg, N., S. Elazar, I. Rosenshine, y N. Shpigel. 2008. β -Hydroxybutyrate Abrogates Formation of Bovine Neutrophil Extracellular Traps and Bactericidal Activity against Mammary Pathogenic Escherichia coli. *Infect. Immun.* 76:2802-2807.
- Guimarães-Costa, A.B., M.T.C. Nascimento, G.S. Froment, R.P.P. Soares, F.N. Morgado, F. Conceição-Silva, y E. M. Saraiva. 2009. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106:6748-6753.
- Gupta, A.K., M.B. Joshi, M. Philippova, P. Erne, P. Hasler, S. Hahn, y T.J. Resink. 2010. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett.* 584:3193-3197.
- Hakim, A., T.A. Fuchs, N. Martinez, S. Hess, H. Prinz, A. Zychlinsky, y H. Waldmann. 2010. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat. Chem. Biol.* 7:75-77.
- Hemmers, S., J.R. Teijaro, S. Arandjelovic, y K.A. Mowen. 2011. PAD4-Mediated Neutrophil Extracellular Trap Formation Is Not Required for Immunity against Influenza Infection. *PLoS ONE* 6:e22043. doi:22010.21371/journal.pone.0022043.
- Hong, W., R.A. Juneau, B. Pang, y W. E. Swords. 2009. Survival of Bacterial Biofilms within Neutrophil Extracellular Traps Promotes Nontypeable *Haemophilus influenzae* Persistence in the Chinchilla Model for Otitis Media. *J Innate Immun.* 1:215-224.
- Jakus, Z., T. Németh, J.S. Verbeek, y A. Mócsai. 2008. Critical but Overlapping Role of Fc γ RIII and Fc γ RIV in Activation of Murine Neutrophils by Immobilized Immune Complexes. *J Immunol* 180:618-629.
- Jenne, C.N., C.H. Wong, F.J. Zemp, B. McDonald, M.M. Rahman, P.A. Forsyth, G. McFadden, y P. Kubes. 2013. Neutrophils Recruited to Sites of Infection Protect from Virus Challenge by Releasing Neutrophil Extracellular Traps. *Cell Host & Microbe* 13:169-180.
- Lapponi, M.J., A. Carestia, V.I. Landoni, L. Rivadeneyra, J. Etulain, S. Negrotto, R.G. Pozner, y M. Schattner. 2013. Regulation of neutrophil extracellular trap formation by anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 345:430-437.
- Lauth, X., M. von Kockritz-Blickwede, C.W. McNamara, S. Myskowski, A.S. Zinkernagel, B. Beall, P. Ghosh, R.L. Gallo, y V. Nizet. 2009. M1 Protein Allows Group A Streptococcal Survival in Phagocyte Extracellular Traps through Cathelicidin Inhibition. *J Innate Immun* 1:202-214.

- Lim, M.B.H., J.W.P. Kuiper, A. Katchky, H. Goldberg, y M. Glogauer. 2011. Rac2 is required for the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Leukoc. Biol.* 90:771–776.
- Metzler, K.D., T.A. Fuchs, W.M. Nauseef, D. Reumaux, J. Roesler, I. Schulze, V. Wahn, V. Papayannopoulos, y A. Zychlinsky. 2011. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood.* 117:953-959.
- Narasaraju, T., E. Yang, R.P. Samy, H.H. Ng, W.P. Poh, A.A. Liew, M.C. Phoon, N. van Rooijen, y V.T. Chow. 2011. Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Contribute to Acute Lung Injury of Influenza Pneumonitis. *Am J Pathol.* 179:199-210.
- Neeli, I., N. Dwivedi, S. Khan, y M. Radic. 2009. Regulation of Extracellular Chromatin Release from Neutrophils. *J Innate Immun.* 1:194–201.
- Ortiz-Stern, A., C. Rosales. 2005. FcγRIIIB stimulation promotes β1 integrin activation in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 77:787-799.
- Papayannopoulos, V., K. Metzler, A. Hakkim, y A. Zychlinsky. 2010. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps *J Cell Biol.* 191:677-691.
- Parker, H., A. Albrett, A. Kettle, y C. Winterbourn. 2012. Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. *J. Leukoc. Biol.* 91:369–376.
- Pilsczek, F., D. Salina, K. Poon, C. Fahey, B. Yipp, C. Sibley, S. Robbins, F. Green, M. Surette, M. Sugai, M. Bowden, M. Hussain, K. Zhang, y P. Kubes. 2010. A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus* *J Immunol.* 185:7413-7425.
- Pruchniak, M.P., M. Arazna, y U. Demkow. 2013. Life of neutrophil: From stem cell to neutrophil extracellular trap. *Respir. Physiol. Neurobiol.*
- Ramos-Kichik, V., R. Mondragón-Flores, M. Mondragón-Castelán, S. González-Pozos, S. Muñoz-Hernández, O. Rojas-Espinosa, R. Chacón-Salinas, S. Estrada-Parra, y I. Estrada-García. 2009. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 89:29-37.
- Rosales, C. 2007. Fc receptor and integrin signaling in phagocytes. . *Signal Transduction* 7:386-401.
- Rosales, C., y E. Uribe-Querol. 2013 Fc Receptors: cell activators of antibody functions. . *Advances in Bioscience and Biotechnology* 4:21-33.
- Sanchez-Gonzalez, A., B. W. Bardoel, C. J. Harbort, y A. Zychlinsky. 2014. Induction and quantification of neutrophil extracellular traps. In *Neutrophil Methods and Protocols*, Vol. 1124. M. T. Quinn, And F. R. DeLeo, eds Humana Press - Springer Science+Business Media, New York, pp. 307-318.
- Saitoh, T., J. Komano, Y. Saitoh, T. Misawa, T. Takahama, T. Kozaki, T. Uehata, H. Iwasaki, H. Omori, S. Yamaoka, N. Yamamoto, y S. Akira. 2012. Neutrophil Extracellular Traps Mediate a Host Defense Response to Human Immunodeficiency Virus-1. *Cell Host & Microbe* 12:109–116.

- Summers, C., S.M. Rankin, A.M. Condliffe, N. Singh, A.M. Peters, y E.R. Chilvers. 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology* 31:318–324.
- Urban, C.F., U. Reichard, V. Brinkmann, y A. Zychlinsky. 2006. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell. Microbiol.* 8:668–676.
- Yipp, B., B. Petri, D. Salina, C. Jenne, B. Scott, L. Zbytnuik, K. Pittman, M. Asaduzzaman, K. Wu, H. Meijndert, S. Malawista, A. Chevance, K. Zhang, J. Conly, y P. Kubes. 2012. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat. Med.* 18:1386-1395.