



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN DE REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILO (NETs)
INDUCIDAS POR ANTICUERPOS.

TESIS

QUE, PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

OMAR RAFAEL ALEMÁN MUÑOZ

TUTOR PRINCIPAL

Dr. CARLOS ROSALES LEDEZMA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. YVONNE ROSENSTEIN ASOULAY

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Dr. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 de maestría se realizó en el departamento de inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la dirección del **Dr. Carlos Rosales Ledezma**, 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.

El Comité Tutor que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Carlos Rosales Ledezma	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Yvonne Rosenstein Asoulay	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo	Facultad de Medicina, UNAM

Agradecimientos.

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la maravillosa oportunidad de formarme profesionalmente.
- 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 excelente apoyo técnico durante la realización de esta tesis.
- A la Dra. Ricarda Cortez Vyeira por su ayuda durante la realización de este trabajo.
- A todos los donadores de sangre ya que sin su generosa contribución todos los experimentos aquí realizados no hubiesen sido posibles.

Dedicatoria.

- A mis padres Rafael Antonio Alemán Reyna y Mercedes Muñoz Miranda por estar siempre a mi lado apoyándome a cada momento, también por ayudarme a culminar un capítulo más en mi vida los quiero mucho.

- A mi hermana Miriam Alemán por ser mi amiga y mi cómplice de travesuras, además por darme la dicha de ser tío. También los quiero mucho a ustedes monstruos Santiago e Isaac.

- A mis abuelos María Miranda y Guadalupe Muñoz por toda su ayuda durante mi día a día.

- A mis familiares que de alguna u otra forma siempre han estado ahí para brindarme su apoyo y consejo.

- A Pamela Meza por estar a mi lado, ser mi compañera, mi amiga y darme una razón más para ser mejor cada día.

- A mis compañeros Ricardo Muñoz y Fernando Gutiérrez por hacer amena la estancia en el laboratorio además de brindarme su amistad.

Índice.

Resumen	1
Abstract.....	2
Abreviaturas.....	3
Introducción	5
Morfología.	6
Cambios Morfológicos en el neutrófilo al formar NETs	7
Señales iniciales.....	8
NETs y enfermedad.	9
Receptores Fcy presentes en el neutrófilo	10
Planteamiento del problema.	11
Hipótesis.	11
Objetivo General.	12
Materiales y métodos.....	13
Purificación de neutrófilos.	13
Marcaje de receptores con anticuerpos monoclonales.	14
Formación de NETs.	14
Inhibidores farmacológicos.....	15
Visualización de NETs por inmunohistoquímica	15
Cuantificación de NETs.....	16
Formación de ROS.....	17
Western Blot.....	17
Resultados.	18
Purificación de neutrófilos	18
Estimulación de neutrófilos.	19
Inhibidores farmacológicos.....	24
Discusión.	42
Conclusiones.	45
Perspectivas.....	46
Referencias.....	47

CARACTERIZACIÓN DE REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILO (NETs) INDUCIDAS POR ANTICUERPOS.

Resumen.

Los neutrófilos son células del sistema inmune innato y en humanos son los leucocitos más abundantes en la circulación sanguínea. Al existir una infección, los neutrófilos son las primeras células en ser reclutadas para combatirla utilizando diferentes estrategias tales como la fagocitosis, la degranulación de agentes microbicidas y la secreción de citocinas. Recientemente se ha descrito otra estrategia utilizada por el neutrófilo para combatir microorganismos patógenos: esta es la formación de redes compuestas de cromatina asociada a proteínas microbicidas denominadas redes extracelulares de neutrófilo NETs (del inglés Neutrophil Extracellular Traps). Estas funcionan como una barrera para los microorganismos donde quedan atrapados y comienzan a ser degradados.

Gran parte del conocimiento sobre la formación de NETs es resultado de enfrentar al neutrófilo a microorganismos completos o estimulándolos con PMA (del inglés phorbol myristate acetate). Con el fin de dilucidar si los receptores Fc presentes en el neutrófilo son capaces de inducir la formación de NETs, cada uno de los receptores Fc presentes en el neutrófilo humano se estimularon de manera selectiva utilizando anticuerpos monoclonales específicos. Además, se utilizaron inhibidores farmacológicos para dilucidar la vía de señalización utilizada por los receptores Fc en la formación de NETs.

En este estudio pudimos demostrar que únicamente el receptor $Fc\gamma RIIIb$ y no el $Fc\gamma RIIa$ induce la formación de NETs. Este proceso es dependiente de la activación de Syk, la vía MEK-ERK, PKC y NADPH-oxidasa de forma similar al proceso activado por PMA. Sin embargo, a diferencia de este, el receptor $Fc\gamma RIIIb$ activa la formación de NETs independientemente de IKK. Además, las NETs formadas por la estimulación del receptor $Fc\gamma RIIIb$ requieren de la activación de TAK-1 en contraste en las NETs inducidas por PMA que no requieren de su activación. Este hallazgo refuerza la idea de que cada receptor Fc induce respuestas específicas en la célula.

CARACTERIZATION OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS (NETs) INDUCED BY ANTIBODIES.

Abstract.

Neutrophils are cells from innate immune system and in humans are the most abundant leukocytes in the blood stream. When there is an infection, neutrophils are the first cells to be recruited to fight it using different strategies such as phagocytosis, degranulation of microbicidal agents and cytokine secretion. Recently described another strategy used by the neutrophil to combat pathogens: this is the formation of structures composed by chromatin-associated with microbicidal proteins called Neutrophil Extracellular Traps (NETs). This function as a barrier to microorganisms where they are trapped and begin to be degraded.

Much of the knowledge about the formation of NETs is the result of confronting the neutrophil to complete microorganisms or PMA (phorbol myristate acetate). In order to elucidate if the Fc γ receptors on the neutrophil are able to induce the formation of NETs, each of the Fc γ receptor present in human neutrophils were stimulated selectively using specific monoclonal antibodies. Furthermore, pharmacological inhibitors were used to elucidate the signaling pathway used by Fc γ receptors for the formation of NETs.

In this study, we were able to show that only Fc γ RIIIb induced NETs formation. This process is dependent on the activation of Syk, MEK-ERK pathway, PKC, and NADPH oxidase similarly to PMA activated process. However, unlike the PMA process, Fc γ RIIIb activated NETs formation independently of IKK. Furthermore, NETs formed by Fc γ RIIIb stimulation require activation of TAK-1, in contrast with NETs induced by PMA does not require TAK1 activation. This results support the idea that different Fc receptors promote different cell functions.

Abreviaturas.

°C	Grados Celsius
µL	Microlitro
BPI	Bacterial 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
FBS	Fetal Bovine Serum
Fc	Fragmento constante
FcR	Receptor del Fragmento constante de anticuerpos
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GPI	Glycophosphatidylinositol
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Immunoglobulin G
IKK	Inhibitor of Nuclear factor κ B Kinase
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 2
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma.
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RSV	Respiratory Syncytial Virus
Syk	Spleen tyrosine kinase

T	Treonina
TLR4	Toll Like Receptor 4
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAF6	Tumor Necrosis Factor-Receptor Associated Factor 6
μM	Micromolar
Y	Tirosina

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 tienen 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 and Zychlinsky, 2012). Dichos gránulos son lisosomas especializados que contienen proteínas capaces de destruir microorganismos y digerir tejidos (Brinkmann and Zychlinsky, 2007). En general éstos pueden clasificarse en primarios, secundarios y terciarios. Los primarios o azurófilos contienen defensinas, mieloperoxidasa, proteasas de serina, elastasa, catepsina G y BPI. Los secundarios o específicos contienen lactoferrina, muramidasa, fosfatasa alcalina, NADPH oxidasa, colagenasa y catelicidina. Los terciarios contienen catepsina y gelatinasa (Borregaard and Cowland, 1997; Pruchniak et al., 2013).

Durante una infección los PMN se reclutan a los sitios de infección, guiados por señales inflamatorias como IL-8, 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 se describió: ésta consiste en la formación de Redes Extracelulares o NETs del inglés Neutrophil Extracellular Traps (Brinkmann *et al.*, 2004).

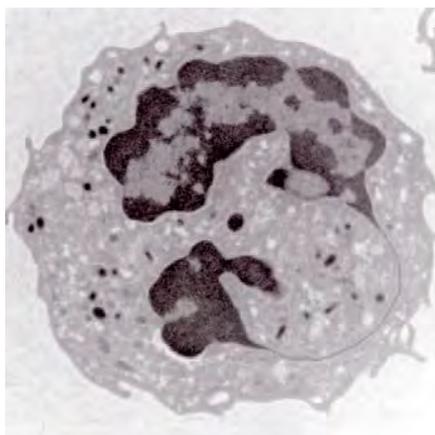


Figura 1. Microscopia electrónica de transmisión. Se observa la morfología característica del neutrófilo, con sus múltiples gránulos y su núcleo lobulado. Imagen modificada de (Brinkmann and Zychlinsky, 2007).

Redes extracelulares de neutrófilo.

Morfología.

El componente estructural más importante de las NETs es el ADN. Esto se ha puesto en 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 desoxirribonucleasas. 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). 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 a la cromatina (Brinkmann et al., 2004).

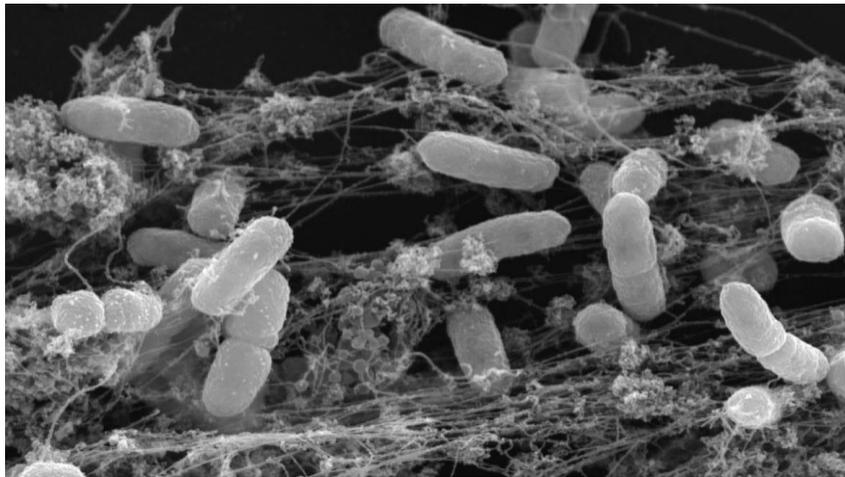


Figura 2. Microscopia Electrónica de barrido de bacteria *Salmonella* atrapada en NETs. Imagen modificada de (Brinkmann y Zychlinsky., 2012).

La formación de NETs puede ser inducida por una gran variedad de estímulos pro-inflamatorios, tales como LPS vía TLR4, IL-8 y TNF. Otro potente estímulo formador de NETs es el éster de forbol PMA, que es un activador de PKC (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 (Jenne et al., 2013; Saitoh et al., 2012; Hemmers et al., 2011; Narasaraju et al., 2011; Fuchs et al., 2007; Pilszczek 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; Ávila et al., 2016).

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, (Brinkmann y Zychlinsky, 2007). (Figura 3).

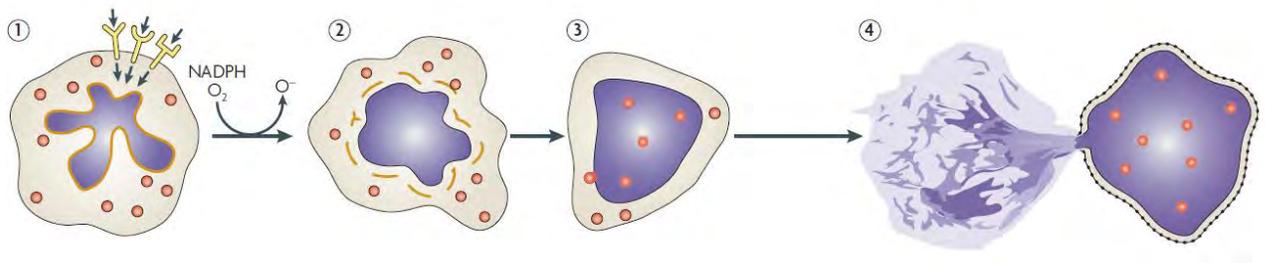


Figura 3. Representación esquemática de la formación de NETs. 1) La estimulación lleva a la formación de ROS. 2) La membrana nuclear comienza a desintegrarse y los gránulos pierden integridad. 3) El núcleo y los gránulos pierden por completo la integridad y se mezclan. 4) Por último la célula se contrae 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 CGD, 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). Asimismo al utilizar DPI 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. Las PKC son una familia de enzimas que se han catalogado en tres diferentes grupos: PKC α , PKC β I, PKC β II y PKC γ conforman el grupo de PKC convencionales (cPKC). PKC δ , PKC ϵ , PKC η y PKC θ integran el grupo de PKC nuevas (nPKC). Por último, el grupo de las PKC atípicas (aPKC) conformado por PKC ζ y PKC ι . Utilizando inhibidores farmacológicos específicos para las distintas isoformas de PKC se ha demostrado que las NETs inducidas por PMA son dependientes de cPKC (Gray et al., 2013). Otras moléculas que parecen participar en la formación de las NETs son Rac2 (Lim et al., 2011) y las de la vía Raf-MEK-ERK (Hakkim et al., 2010; Lim et al., 2011).

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) 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. Al utilizar inhibidores que detienen la actividad de la elastasa el núcleo del neutrófilo no puede descondensarse y por lo tanto no es capaz de formar NETs. En contraste la MPO contribuye a la descondensación nuclear independiente de su actividad enzimática ya que al colocar inhibidores específicos para MPO continúa el proceso de descondensación nuclear; se ha propuesto que su actividad es actuar en conjunto con la NE potenciando su actividad y provocando la descondensación del núcleo ya que al inhibir la actividad de NE la MPO no es capaz por si sola de comenzar la descondensación nuclear. Tanto MPO como NE migran al núcleo donde degradan a las histonas para comenzar la descondensación del núcleo (Papayannopoulos et al., 2010).

NETs y enfermedad.

Como se ha mencionado con anterioridad, la CGD ha sido relacionada a la incapacidad de formar NETs. Los pacientes con esta condición poseen un complejo NADPH-oxidasa que no logra formar ROS y por lo tanto son susceptibles a infecciones (Bianchi et al., 2009; Fuchs et al., 2007). Recientemente se han descrito enfermedades en las que la formación de NETs se encuentra relacionada. Datos experimentales han demostrado que la infección por el virus sincitial respiratorio (RSV) es combatida produciendo NETs tanto en vías respiratorias como en pulmones. Sin embargo datos histopatológicos muestran una elevada formación de NETs tanto en pulmones como en vías respiratorias lo que sugiere que el conjunto RSV-NETs contribuye a la obstrucción de las vías respiratorias resultando perjudicial (Cortjens et al., 2016). Adicionalmente la producción de NETs se ha relacionado con enfermedades autoinmunes. Estudios sugieren que la misma composición de las NETs, es decir el esqueleto de cromatina y las proteínas granulares con las que se asocia, es una gran fuente de autoantígenos. En diversas enfermedades autoinmunes se han encontrado autoanticuerpos específicos para proteínas de los componentes de las NETs, como en la psoriasis, en el lupus eritematoso sistémico, en la artritis reumatoide, en el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos y en la vasculitis asociada a anticuerpos citoplasmáticos de neutrófilo. Estos anticuerpos no solo producen la formación de complejos inmunes sino que inducen el aumento de la elaboración de NETs, sin embargo el mecanismo aún es desconocido (Kessenbrock et al., 2009; Khandpur et al., 2013; Leffler et al., 2014; Nakazawa et al., 2014; Sur Chowdhury et al., 2014; Villanueva et al., 2011; Yalavarthi et al., 2015).

Receptores Fc γ 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.

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. 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 GPI (Figura 4). Sin embargo no se conocen subunidades asociadas a este receptor, y hasta el momento sus mecanismos de señalización son desconocidos (Rosales and Uribe-Querol, 2013).

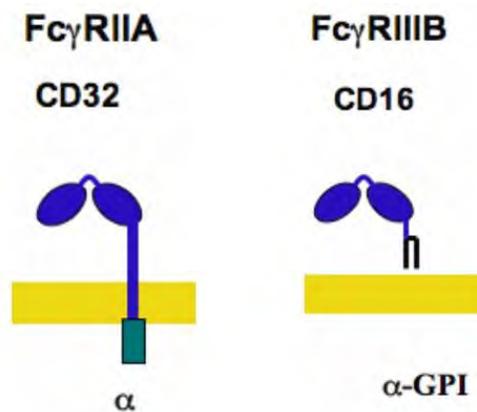


Figura 4. Receptores Fc en neutrófilos humanos. Los neutrófilos humanos expresan los receptores Fc γ RIIA (CD32) y Fc γ RIIIB (CD16). Ambos presentan en su región extracelular dos regiones tipo IgG. El Fc γ RIIA atraviesa la membrana y en su región citoplasmática cuenta con una región ITAM (verde) en 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; Pilsczek et al., 2010; Urban et al., 2006; Yipp et al., 2012). Además, recientemente se ha relacionado la elaboración de NETs con enfermedades autoinmunes. La exposición de autoantígenos en el proceso de formación de NETs promueve la formación de anticuerpos contra las moléculas estructurales de las NETs (cromatina y proteínas granulares), esto provoca no solo la formación de complejos inmunes sino el aumento de la producción de NETs (Kessenbrock et al., 2009; Khandpur et al., 2013; Leffler et al., 2014; Nakazawa et al., 2014; Sur Chowdhury et al., 2014; Villanueva et al., 2011; Yalavarthi et al., 2015). Sin embargo, el mecanismo que emplea el PMN para formar NETs es desconocido hasta el momento. Por lo tanto es de gran importancia realizar estudios con el fin de describir este proceso. En éste trabajo se plantea la posibilidad de que al estimular los receptores Fc γ presentes en el neutrófilo desencadenen la formación de NETs.

Hipótesis.

Si se estimula selectivamente a los receptores Fc γ del neutrófilo, entonces esto iniciará la formación de NETs. Además, la vía de señalización sera similar a la inducida por PMA.

Objetivo General.

Determinar si la estimulación de receptores Fc γ presentes en el neutrófilo son capaces de iniciar la formación de NETs. Y en su caso, caracterizar la vía de señalización involucrada.

Objetivos particulares.

- Obtener una población homogénea y pura de neutrófilos humanos.
- Determinar cuál de los receptores Fc γ de neutrófilos humanos induce la formación de NETs.
- Dilucidar la vía de señalización que el receptor Fc γ 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 contenía 0.25 mL de heparina (10 U/mL) y 2 mL de una disolución 6% de dextrán T500 (Pharmacia Cat # 170320-01) en solución amortiguadora PBS (del inglés phosphate buffered saline). La sangre se mezcló 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, se colocó dentro de un tubo cónico de centrifuga de 15 ml que contenía 5 mL de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB Uppsala Sweden Cod # 17-1440-03). El tubo se centrifugó 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 centrifugó a 290 x g durante 5 min a 4°C. Después se eliminó 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, 20 mM de Hepes, pH= 7.4) agitando suavemente 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 por inversión. Las células se centrifugaron a 290 x g durante 5 min a 4°C y finalmente se resuspendieron en PBS frío (4°C). La suspensión celular se mantuvo en hielo. Se realizó un conteo de las células utilizando un hemocitómetro. Con este método aproximadamente el 95 % de las células fueron neutrófilos.

Marcaje de receptores con anticuerpos monoclonales.

Se colocó 1×10^6 PMN en un tubo cónico de plástico de 1.5 mL (Axygen, Union City CA USA), posteriormente se centrifugó a 1,743 x g durante 1 min se eliminó el sobrenadante y se añadió 100 μ L de una disolución 10 μ g/mL del anticuerpo anti-receptor correspondiente (Tabla 1). Se incubó durante 20 min a 4°C. Después fueron serializados dos lavados con 1 mL de PBS frío (4°C), se centrifugó a 1,743 x g durante 1 min cada uno. Se eliminó el sobrenadante y enseguida se resuspendieron los PMN en 500 μ L de medio de cultivo RPMI-1640 frío (4 °C. Gibco, Grand Island NY USA) suplementado con 5 % de FBS (Gibco; Grand Island, NY). Los datos de los anticuerpos utilizados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Anticuerpos.

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

Formación de NETs.

Los neutrófilos se dejaron sin tratamiento para la estimulación con PMA o bien se pretrataron con anticuerpos monoclonales par la estimulación de receptores. Se colocaron 1×10^6 PMN suspendidas en 500 μ L de medio RPMI por pozo en una placa de 24 pozos que contenía un cubreobjetos redondo de 12 mm. La placa se incubó por 30 min a 37°C y 5% CO₂. A continuación, se adicionó 100 μ L de una disolución 120 nM de PMA en PBS o 100 μ L de 450 μ g/ml del anticuerpo F(ab')₂ de cabra anti-IgG de ratón, concentración final 75 μ g/ml para la estimulación de receptores (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. PA, USA). La mezcla se incubó durante 4 horas a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, para fijar las células 600 μ L de una disolución 2 % de paraformaldehído en PBS, se añadió por pozo. La placa se incubó durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂.

Inhibidores farmacológicos.

En algunos experimentos los PMN fueron tratados 30 min con inhibidores farmacológicos, antes de realizar la estimulación. Las concentraciones e inhibidores utilizados se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Inhibidores

Inhibidor	Marca	Concentración final	Molécula que inhibe
U0126	Promega	50 μ M	MEK
Gö6976	Calbiochem	1 μ M	cPKC
Gö6983	Calbiochem	1 μ M	cPKC
DPI	Sigma	10 μ M	NADPH oxidasa
BAY 117082	Sigma	2.5 μ M	IKK α
LLZ1640-2	Santa Cruz Biotechnology	10 nM	TAK1

Visualización de NETs por inmunohistoquímica.

Durante el proceso de inmunohistoquímica, los lavados e incubaciones se realizaron a temperatura ambiente 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 formasen cavidades cóncavas. En cada cavidad se colocaron 250 μ L de agua, o de la disolución correspondiente, para que creasen una pequeña gota convexa, sobre la cual se colocaron los cubreobjetos.

Los cubreobjetos se sacaron uno a uno de la placa de cultivo y se lavan cuatro veces con agua durante 5 min. Posteriormente, los cubreobjetos se colocaron sobre una disolución 0.1% de Tritón X-100 disuelto en paraformaldehído al 4% durante 10 min, enseguida se pusieron sobre PBS durante 5 min. A continuación, los cubreobjetos se situaron 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 μ g/mL en 5% de BSA en PBS y se incubaron por 60 min. Después, se realizaron 4 lavados colocando los cubreobjetos sobre PBS durante 5 min en cada lavado. En seguida, los cubreobjetos se ubicaron 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 μ g/mL en 5% de BSA en PBS, que además contenía 300 nM DAPI. Los cubreobjetos se incubaron en oscuridad durante 60 min. Finalmente, cada cubreobjetos se montó sobre un portaobjetos con una gota de agente antiblanqueo Flourosave (cat. # 345789, Calbiochem).

Las preparaciones se observaron en un microscopio invertido Olympus IX70 (Center Valley, PA) 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/>).



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

Cuantificación de NETs.

5×10^5 PMN se resuspendieron en medio RPMI-1640 que contenía 500nM de SYTOX Green (Molecular Probes, Inc.; Eugene, OR). Se colocaron 100 μ L de la suspensión celular (1×10^5 PMN) por pozo en una placa de 96 pozos. A continuación, se colocó la placa dentro del lector de placas Synergy HT (BioTek Instruments Winooski, VT) precalentado a 35 °C y se incubó durante 20 min. Para la estimulación con PMA se adicionaron 20 μ L de PMA 120 nM disuelto en medio RPMI-1640 que contenía 500nM de SYTOX Green.

Para la estimulación de receptores se colocaron 5×10^5 PMN en un tubo cónico de plástico de 1.5 ml, posteriormente se centrifugó a 1,743 x g durante 1 min se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 μ L de una disolución 10 μ g/mL del anticuerpo anti-receptor correspondiente. Se incubaron durante 20 min a 4°C. Después serializaron dos lavados con 1 mL de PBS frío (4°C), se centrifugó a 1,743 x g durante 1 min cada uno. Se eliminó el sobrenadante y enseguida se resuspendieron los PMN en 100 μ L de medio de cultivo RPMI-1640 frío que contenía 500nM de SYTOX Green (4 °C). Se colocan 20 μ L de la suspensión celular (1×10^5 PMN) por pozo en una placa de 96 pozos. A continuación, se colocó la placa dentro del lector de placas Synergy HT precalentado a 35 °C y se incubó durante 20 min. Posteriormente se agregan 100 μ L del anticuerpo goat anti-mouse IgG a 44.6 μ g/ml (Jackson Immuno Research Laboratories Inc.) disuelto en RPMI-1640 con SYTOX Green 500 nM. Se realizaron lecturas en el fondo de la placa cada 5 min durante 4 horas utilizando los filtros de excitación 485 nm y de emisión 528 nm.

Formación de ROS.

La formación de ROS se evaluó utilizando el kit DCFDA-Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay (#Cat. ab113851 Abcam, Inc. Cambridge, MA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se colocaron 2.5×10^5 PMN en un tubo cónico de 0.6 mL (Axygen, Union City CA USA) y se trataron con los anticuerpos 3G8 y IV.3 a 20 µg/ml durante 20 min en hielo. Posteriormente se realizó un lavado con buffer 1X. A continuación, se adicionaron 250 µL de DCFDA 15 µM en buffer 1X y se incubó por 30 min a 37 °C. Enseguida se realizó un lavado con buffer 1X se resuspendió en 250 µL de buffer 2 (buffer 1X más 10 % de SFB). Se colocaron 50 µL de la suspensión celular por pozo, en una placa de 96 pozos negra de fondo claro (Corning Inc. New York, NY) y se incubó durante 20 min a 35 °C dentro del lector de placas Synergy HT. Para la estimulación de receptores se adicionaron 50 µL de goat anti-mouse IgG a 150 µg/mL en buffer 2. En la estimulación con PMA se adicionan 50 µL PMA a 40 nM en buffer 2. Se realizaron las lecturas durante dos horas en lector de placas Synergy HT utilizando los filtros de excitación 485 nm y de emisión 528 nm.

Western Blot.

Las células se lisaron con buffer RIPA (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50mM HEPES, 0.5% desoxicolato de sodio, 1% Nonidet P-40, y 10mM 2-mercaptoethanol, pH 7.5) que contenía un coctel de inhibidores de proteasas (Roche Basel, Switzerland), durante 15 min en hielo. Los lisados celulares se centrifugaron y las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de SDS-PAGE 12%. Las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF. Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA). Se incubó la membrana en el buffer de bloqueo (5 % de leche en polvo sin grasa, (Carnation; Nestle, Glendale, CA) y 0.1 % de Tween 20 en PBS) durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente se adicionaron los anticuerpos primarios en buffer de bloqueo, durante una hora a temperatura ambiente, los anticuerpos primarios utilizados se describen en la tabla 3. Se lavó la membrana seis veces con PBS durante 5 minutos cada lavado. Se adiciono una disolución 1/3000 del anticuerpo goat antirabbit IgG conjugado con HRP F(ab')₂ o goat anti-mouse IgG según correspondiera y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Después se lavó la membrana seis veces con PBS y se reveló con el substrato de quimioluminiscencia (SuperSignal; Pierce, Rockford, IL) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Tabla 3. Anticuerpos primarios.

Anticuerpo	Blanco	Marca
Policlonal de conejo	ERK1	Sc-94 Santa Cruz Biotechnology
Monoclonal de ratón	ERK1 fosforilado(pY204)	Sc-7383 Santa Cruz Biotechnology
Policlonal de conejo	GAPDH	Sc-25778 Santa Cruz Biotechnology
Policlonal de conejo	TAK1 fosforilado (pT187)	ab192443 Abcam plc.

Resultados.

Purificación de neutrófilos.

Los neutrófilos PMN obtenidos de sangre periférica, utilizando el método de dextran-ficoll por encima 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.

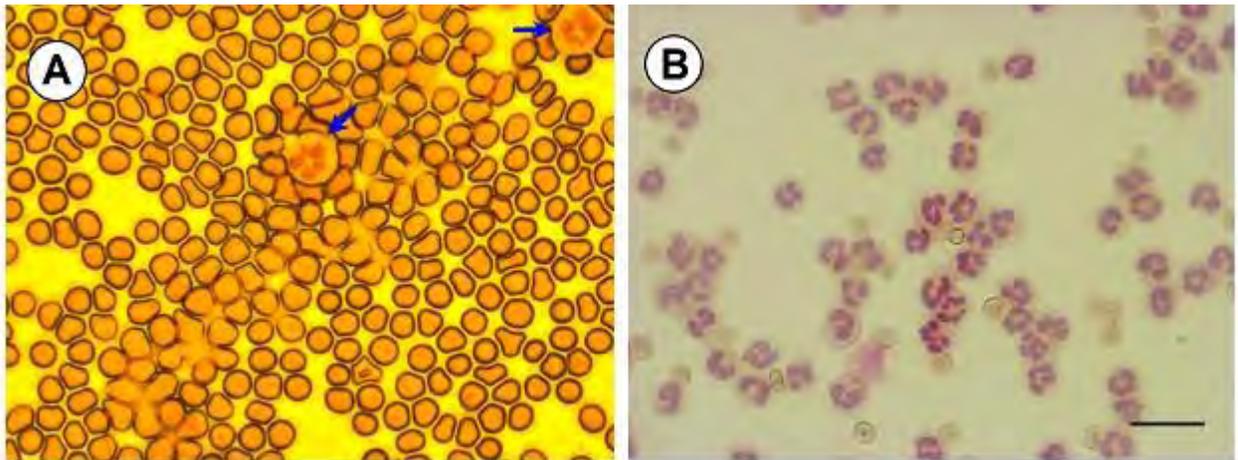


Figura 6. Purificación de neutrófilos. (A) Frotis de sangre completa, se observan únicamente 2 neutrófilos (flechas). (B) Neutrófilos purificados de sangre periférica por el método de Dextran-Ficoll. Se observa una gran cantidad de neutrófilos y escasos eritrocitos. Tinción Giemsa-Wright. La barra representa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

Estimulación de neutrófilos.

Al teñir los PMN sin tratamiento con el colorante DAPI, es posible observar la forma lobulada de su núcleo típica de neutrófilos. 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 y se forman fibras de cromatina, es decir ADN asociado a histonas (Figura 7). Además, al estimular el receptor FcγRIIa con el anticuerpo IV.3 que es específico para dicho receptor, no se forman NETs y se mantiene la forma lobulada del núcleo. En contraste al estimular el receptor FcγRIIIb con el anticuerpo específico 3G8, los PMN forman fibras de ADN asociadas a histonas de forma similar a cuando son estimulados con PMA (Figura 7). Por otra parte, cuando los PMN son estimulados con PMA la membrana plasmática pierde su integridad además se pierde la forma lobulada del núcleo y en su lugar se observan fibras de ADN. Los neutrófilos sin tratamiento alguno mantienen la integridad de la membrana plasmática y el núcleo mantiene su conformación lobulada (Figura 8). 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 FcγRIIIb los PMN pierden la integridad de la membrana plasmática y se observa ADN en forma de fibras (Figura 8).

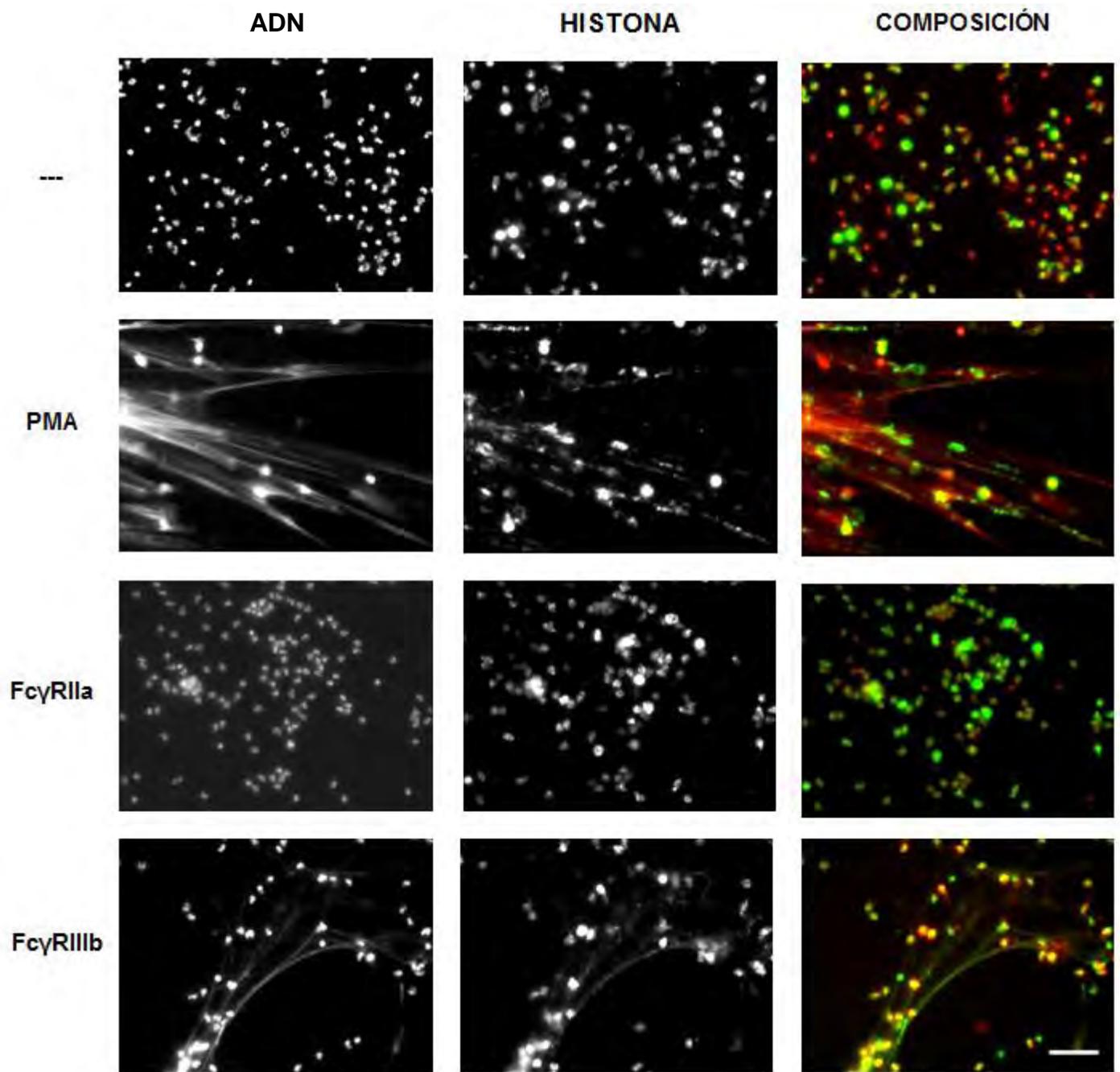


Figura 7. Activación de PMN. De arriba hacia abajo PMN sin estímulo, estimulados con PMA, estimulando el FcγRIIa y estimulando el FcγRIIIb. El estímulo al FcγRIIIb induce la formación de fibras de cromatina al igual que el estímulo con PMA. En forma contraria, con el estímulo al FcγRIIa los PMN conservan la forma lobulada del núcleo y las histonas se encuentran regionalizadas en el núcleo celular en forma similar a las células sin estímulo. Fotografías representativas de diez experimentos independientes La barra representa 50 μm.

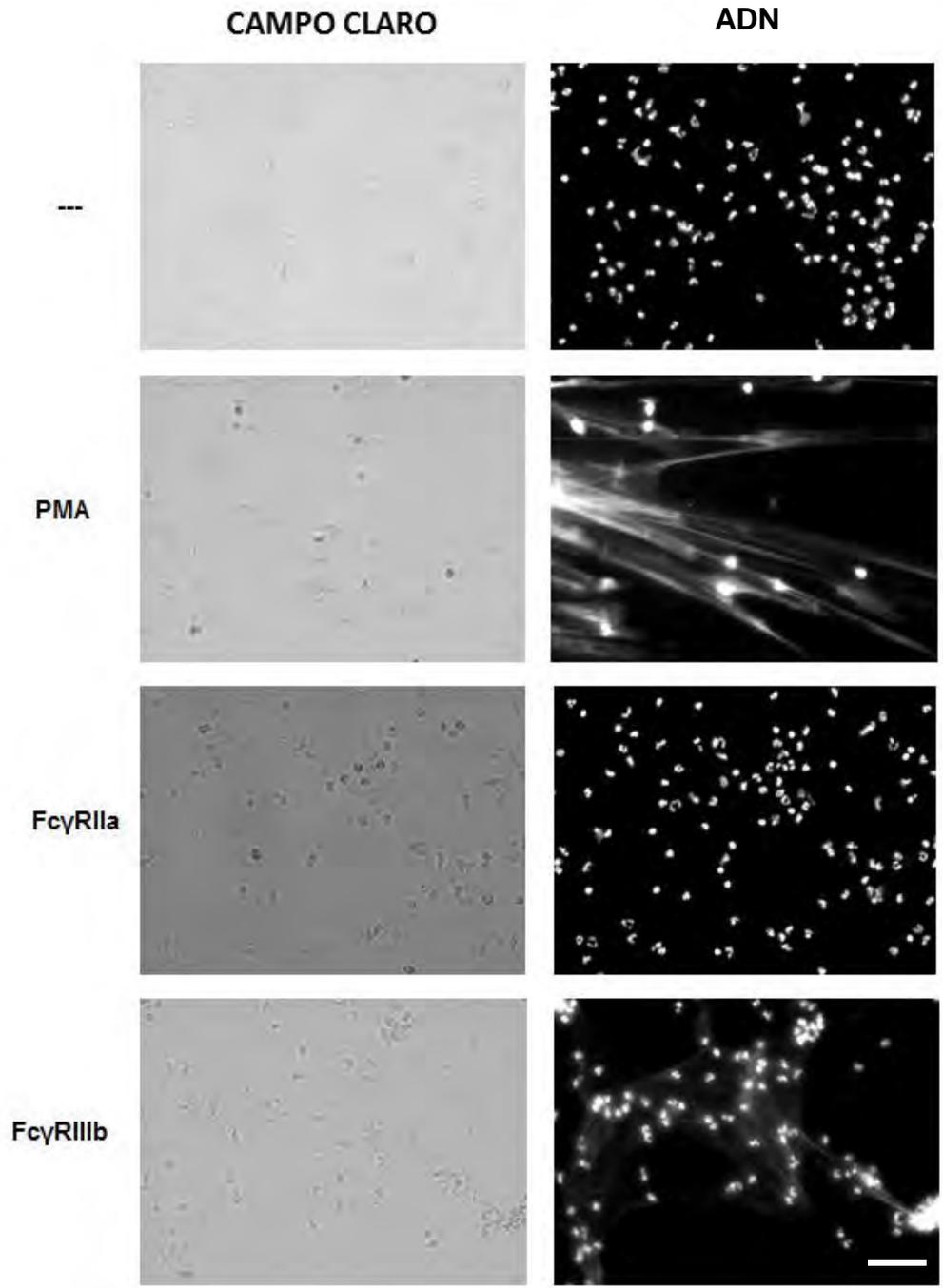


Figura 8. Cambio en la morfología de los Neutrófilos que forma NETs. De arriba hacia abajo se observan PMN sin tratamiento, estimulados con PMA, entrecruzando el FcγRIIa y estimulando el FcγRIIIb. Al estimular los PMN con PMA, así como el FcγRIIIb culmina en cambios en la morfología del neutrófilo se pierde la forma lobulada del núcleo y se observa ADN en forma de fibras. En contraste las células sin tratamiento y las que reciben el estímulo al FcγRIIa conservan la integridad de la membrana plasmática, además presentan su núcleo en forma lobulada. La barra representa 50 μm.

La presencia de proteínas microbicidas 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. De igual manera, cuando se indujo la formación de NETs estimulando el receptor FcγRIIb, la elastasa se encontró asociada a las fibras de ADN (Figura 11). 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 10).

Se estimó la formación de NETs de la cantidad de ADN extracelular en PMN no fijados utilizando el colorante SYTOX Green. La lectura se realizó posterior a cuatro horas de estímulo. El entrecruzamiento del FcγRIIb induce la expulsión de ADN al medio extracelular de igual forma que el estímulo con PMA. En contraste el estímulo al FcγRIIa no provoca la expulsión de ADN al igual que los PMN que no recibieron estímulo alguno. Estos datos indican que el entrecruzamiento del receptor FcγRIIb es un estímulo que induce la expulsión de cromatina asociada a elastasa, es decir el estímulo al FcγRIIb induce la formación eficiente de NETs (Figura 9).

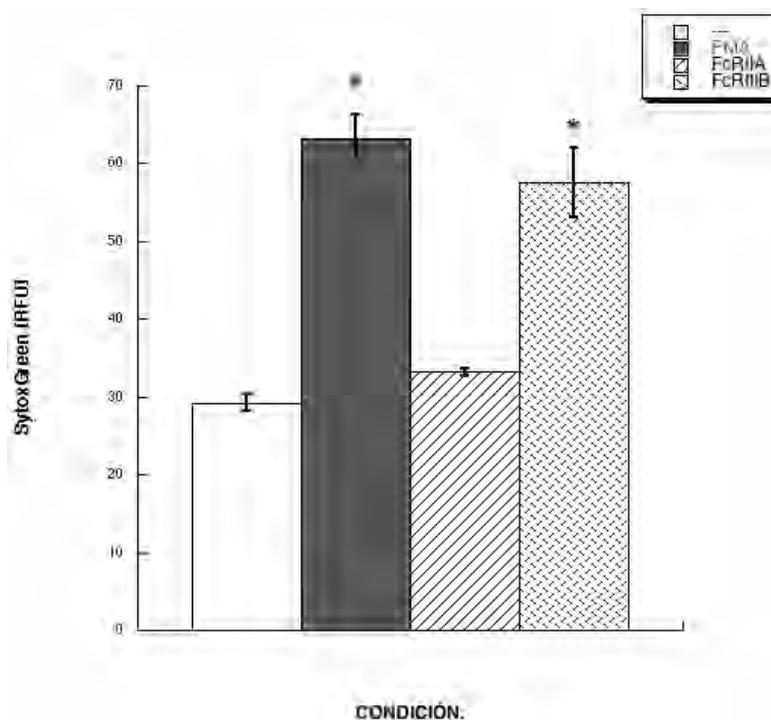


Figura 9. FcγRIIb induce la formación de NETs. De izquierda a derecha se observan PMN sin tratamiento (---), PMN estimulados con 20 nM de PMA, entrecruzando el FcγRIIa con el mAb IV.3, entrecruzando el FcγRIIb con el mAb 3G8. Exclusivamente la estimulación del FcγRIIb induce la formación de NETs. Los datos son la media ± ESM de cuatro experimentos independientes. Los asteriscos marcan las condiciones donde se encontró diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$). Además, no se observó diferencia entre el estímulo con PMA y el entrecruzamiento del FcγRIIb.

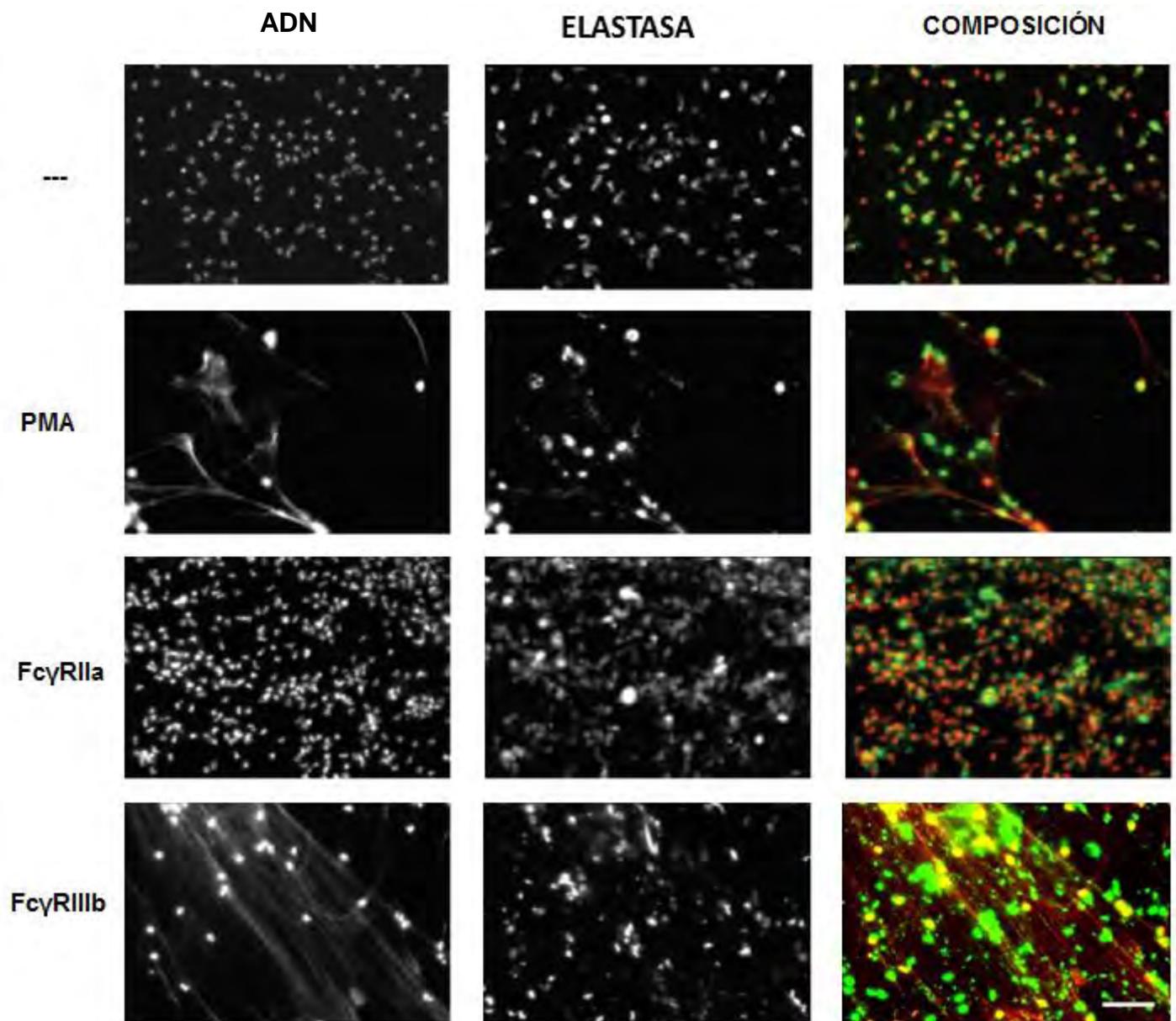


Figura 10. Detección de elastasa. Al estimular los PMN con PMA (derecha) las fibras de ADN (rojo) expulsadas al medio extracelular se encuentran asociadas a la proteína microbicida elastasa (verde). En forma similar, las NETs inducidas por el FcγRIIIb están decoradas de elastasa. Por lo contrario, el entrecruzamiento del FcγRIIa no induce la formación de NETs. Fotografías representativas de cinco experimentos independientes. La barra representa 50 μm.

Inhibidores farmacológicos.

Debido a que las NETs inducidas por PMA necesitan de la activación de cPKC, la participación de estas cinasas en la formación de NETs iniciada por el receptor FcγRIIIb se probó utilizando dos inhibidores específicos para cPKC (Gö 6983 y Gö 6976). Como se esperaba los PMN estimulados con PMA formaron NETs. Sin embargo, cuando los neutrófilos son tratados previamente con el inhibidor Gö 6983 o con inhibidor Gö 6976, se disminuye la formación NETs posterior al estímulo con PMA (Figura 11 y 12). Así mismo, la formación de NETs debido al entrecruzamiento del receptor FcγRIIIb es disminuida por ambos inhibidores específicos para cPKC (Figura 11 y 12). Esto sugiere que el receptor FcγRIIIb al igual que el estímulo con PMA podría inducir la formación de NETs por una vía dependiente de cPKC.

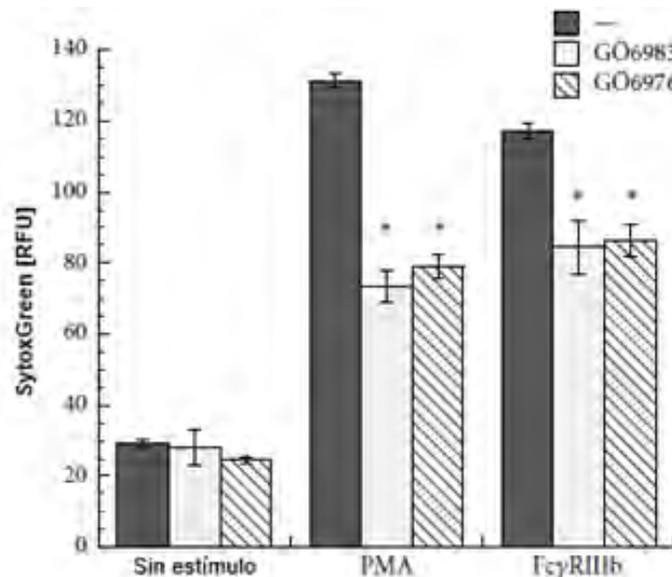


Figura 11. La formación de NETs inducida por el FcγRIIIb es dependiente de PKC. Los PMN se incubaron 30 min antes del estímulo con el inhibidor GÖ6983 o con el inhibidor GÖ6976 (ambos específicos para PKC) o con el disolvente (---). En ambos casos tanto el tratamiento con el inhibidor GÖ6983 como con el inhibidor GÖ6976 disminuye la formación de NETs inducidas tanto por PMA, así como por el estímulo al FcγRIIIb. La cantidad relativa de NETs fue estimada de la fluorescencia del colorante SYTOX Green. La lectura se realizó posterior a cuatro horas de estímulo. Los datos son la media ± ESM de once experimentos independientes. Los asteriscos marcan las condiciones donde se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control.

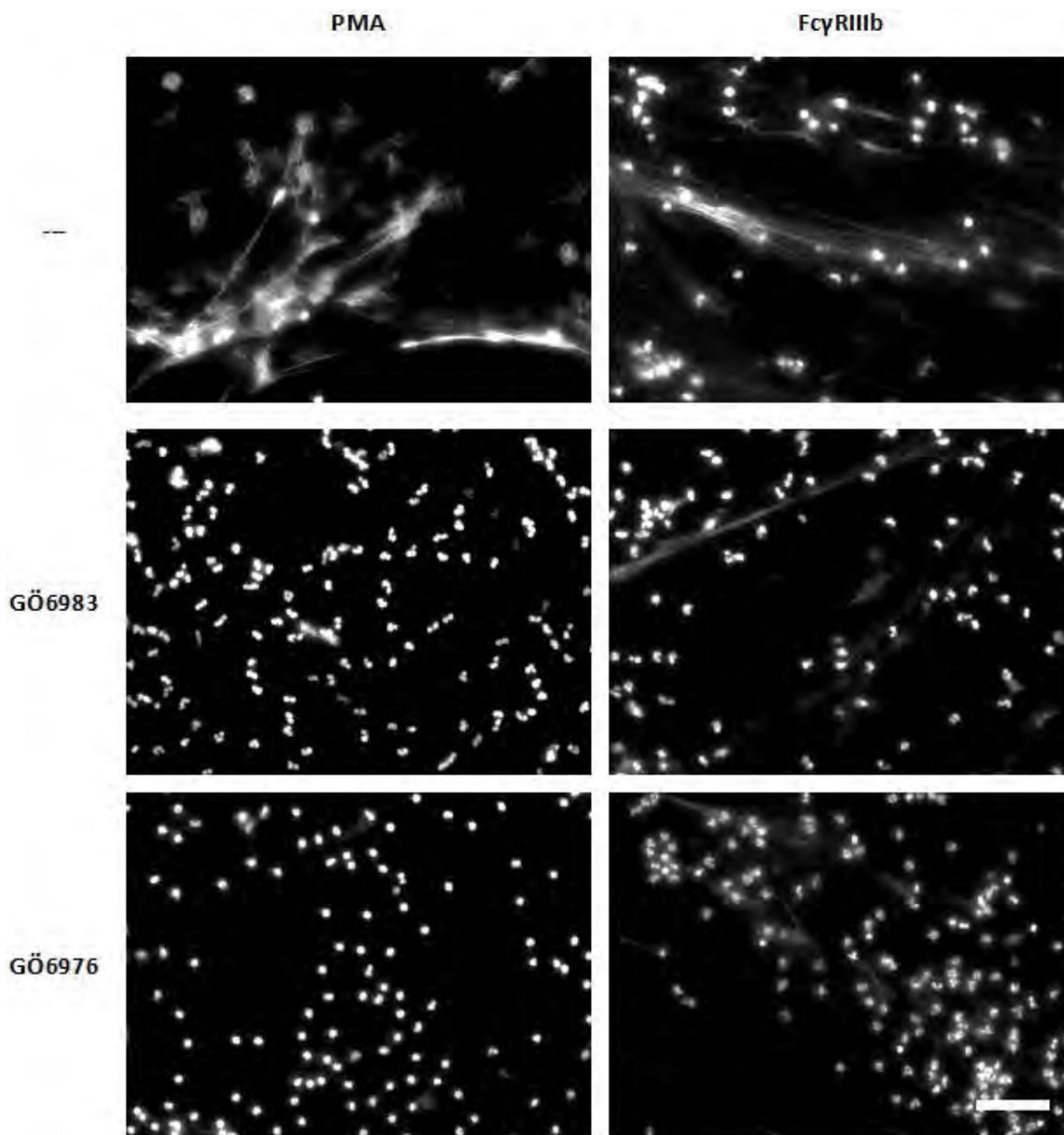


Figura 12. Las cPKC participan en la formación NETs inducidas por el FcγRIIIb. Los neutrófilos pretratados con los inhibidores para cPKC disminuyen la formación de NETs al ser estimulados con PMA (izquierda) al igual que los PMN estimulados vía el FcγRIIIb. Fotografías representativas de cinco experimentos independientes. La barra representa 50 μm.

Conocemos que la participación de la vía de señalización MEK-ERK es necesaria en la formación de NETs posterior a la estimulación con PMA (Hakim et al., 2010). Por lo tanto, cuando los PMN son pretratados con el inhibidor UO126, específico para MEK, los neutrófilos disminuyen la formación de NETs al ser estimulados con PMA (Figura 13 y 14). Así mismo, el tratamiento con el inhibidor UO126 impide la formación de NETs iniciada por el entrecruzamiento del receptor FcγRIIIb (Figura 13 y 14). Esto sugiere que MEK está involucrado en la formación de NETs inducidas por el FcγRIIIb al igual que las NETs inducidas por PMA.

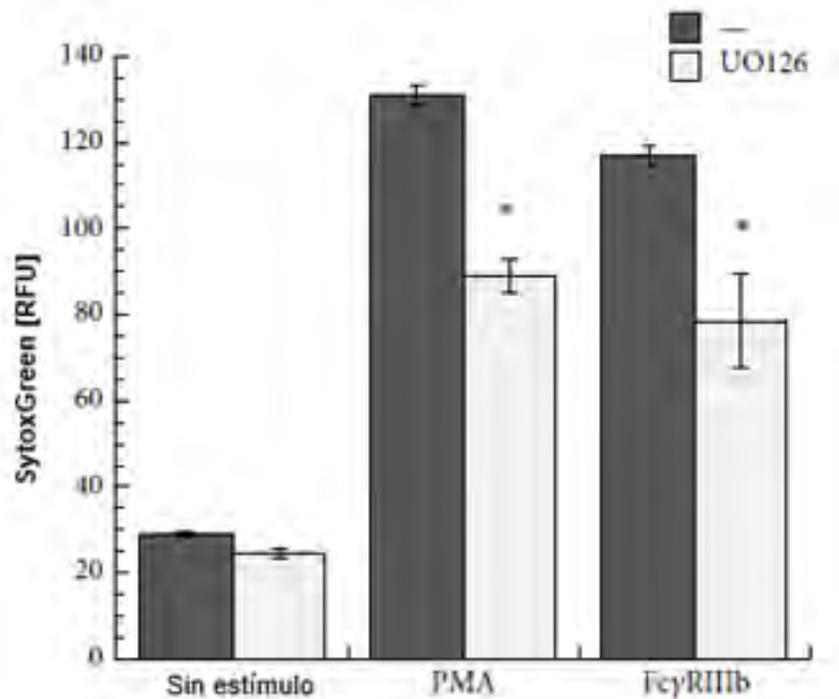


Figura 13. La formación de NETs inducida por el FcγRIIIb es dependiente de la activación MEK. Los PMN se incubaron 30 min antes del estímulo con el inhibidor UO126 (específico para MEK) o con el disolvente (---). El tratamiento con el inhibidor UO126 disminuye la formación de NETs inducidas tanto por PMA, así como por el estímulo al FcγRIIIb. La cantidad relativa de NETs fue estimada de la fluorescencia del colorante SYTOX Green. La lectura se realizó posterior a cuatro horas de estímulo. Los datos son la media \pm ESM de ocho experimentos independientes. Los asteriscos marcan las condiciones donde se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control.

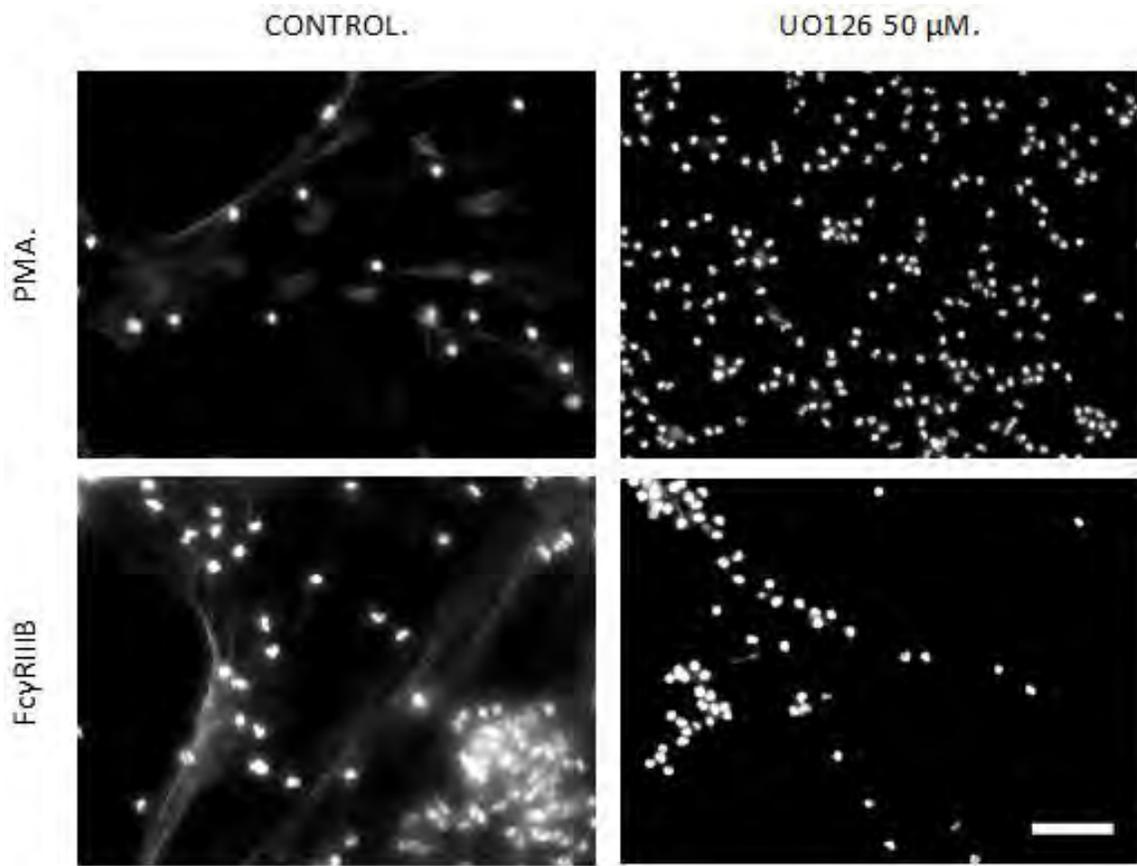


Figura 14. Fc γ RIIIb involucra a MEK en la formación de NETs. Al estimular los PMN con PMA el pretratamiento con el inhibidor UO126 impide la formación de NETs de forma similar los neutrófilos estimulados vía el Fc γ RIIIb se impide la formación de NETs. Fotografías representativas de cinco experimentos independientes. La barra representa 50 μ m.

Para confirmar la activación de ERK posterior a la estimulación del FcγRIIIb o por PMA, los PMN fueron estimulados en ausencia o presencia del inhibidor UO126 y la activación de ERK fue estimada por Western Blot. El estímulo con PMA es capaz de inducir la fosforilación de ERK, además es completamente abatido en presencia del inhibidor UO126 (Figura 15 A). De forma similar, la estimulación al FcγRIIIb induce la fosforilación de ERK y es totalmente bloqueada en presencia del inhibidor UO126 (Figura 15 B). Esto sugiere que al estimular el receptor FcγRIIIb los PMN forman NETs involucrando la vía MEK-ERK.

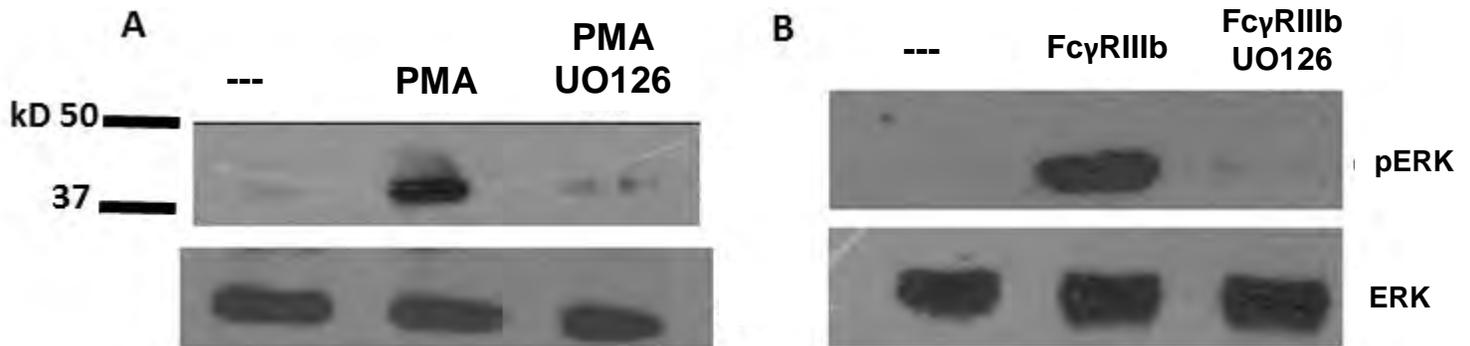


Figura 15. FcγRIIIb induce la activación de ERK. A) De izquierda a derecha se observan PMN sin tratamiento, estimulados con PMA en presencia o ausencia del inhibidor UO126 específico para ERK. Las proteínas se corrieron en un gel de SDS-PAGE, el Western Blot se realizó para ERK en su forma fosforilada (p-ERK imagen superior) o para ERK total (imagen inferior). B) De izquierda a derecha se observan PMN sin tratamiento, estimulando el FcγRIIIb en presencia o ausencia del inhibidor UO126 específico para ERK. Las proteínas se corrieron en un gel de SDS-PAGE, el Western Blot se realizó para ERK en su forma fosforilada (p-ERK imagen superior) o para ERK total (imagen inferior). Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

La formación de NETs posterior a la estimulación con PMA requiere la activación del complejo NADPH oxidasa y la formación de ROS (Fuchs et al., 2007). Por lo tanto, para evaluar la participación de este complejo 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 de DPI los PMN estimulados con PMA no son capaces de formar NETs (Figura 16A y 17). De igual manera entrecruzando el receptor FcγRIIIb, los PMN tratados con DPI no logran formar NETs (Figura 16A y 17).

Adicionalmente se estimó la formación de ROS en presencia o ausencia de DPI, posterior a la estimulación del FcγRIIIb o por PMA. Tanto el tratamiento con PMA como el estímulo al FcγRIIIb inducen la formación de ROS y son completamente bloqueadas utilizando DPI (Figura 16B). Estos datos sugieren que la formación de ROS procedentes de la actividad del complejo NADPH-oxidasa es un evento necesario posterior al estímulo FcγRIIIb para la formación de NETs.

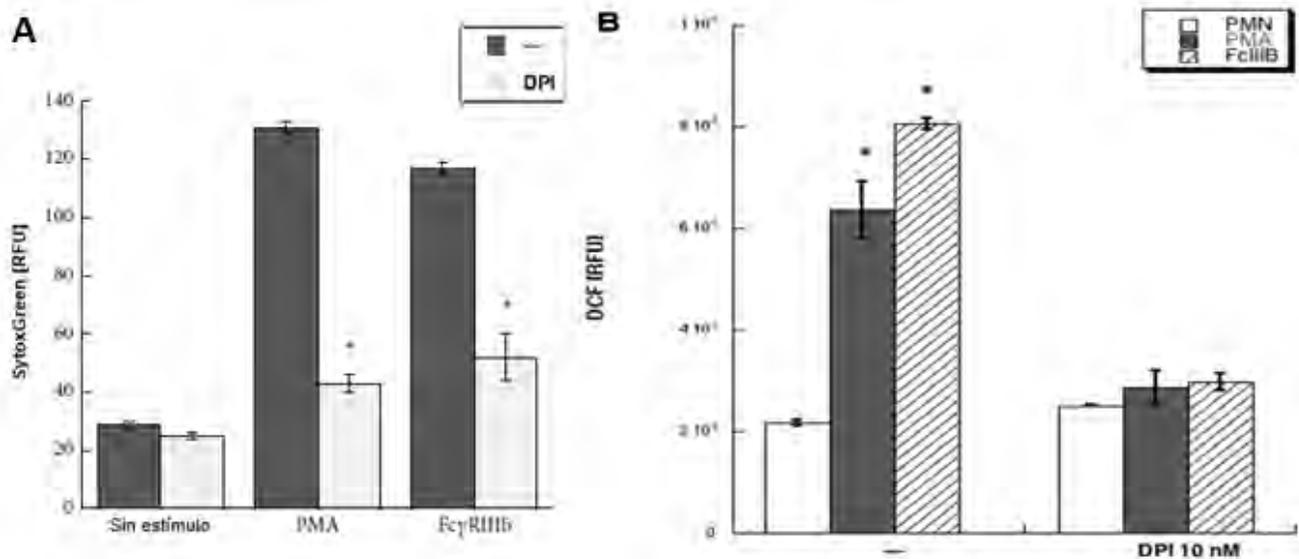


Figura 16. La formación de NETs dependiente del estímulo del FcγRIIIb necesita la activación del complejo NADPH-oxidasa. A) Los PMN se incubaron 30 min antes del estímulo con el inhibidor DPI (específico para NADPH oxidasa) o con el disolvente (---). El tratamiento con el inhibidor DPI disminuye la formación de NETs inducidas tanto por PMA o por el estímulo al FcγRIIIb. La cantidad relativa de NETs fue estimada de la fluorescencia del colorante SYTOX Green. La lectura se realizó posterior a cuatro horas de estímulo. Los datos son la media ± ESM de cinco experimentos independientes. Los asteriscos marcan las condiciones donde se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control negativo. B) Se estimó la formación de ROS utilizando la fluorescencia del colorante DCFDA. Los PMN se incubaron 30 min antes del estímulo con el inhibidor DPI o con el disolvente (---). El tratamiento con el inhibidor DPI disminuye la formación de ROS inducidas tanto por PMA o por el estímulo al FcγRIIIb. Los datos son la media ± ESM de tres experimentos independientes. Los asteriscos marcan las condiciones donde se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control.

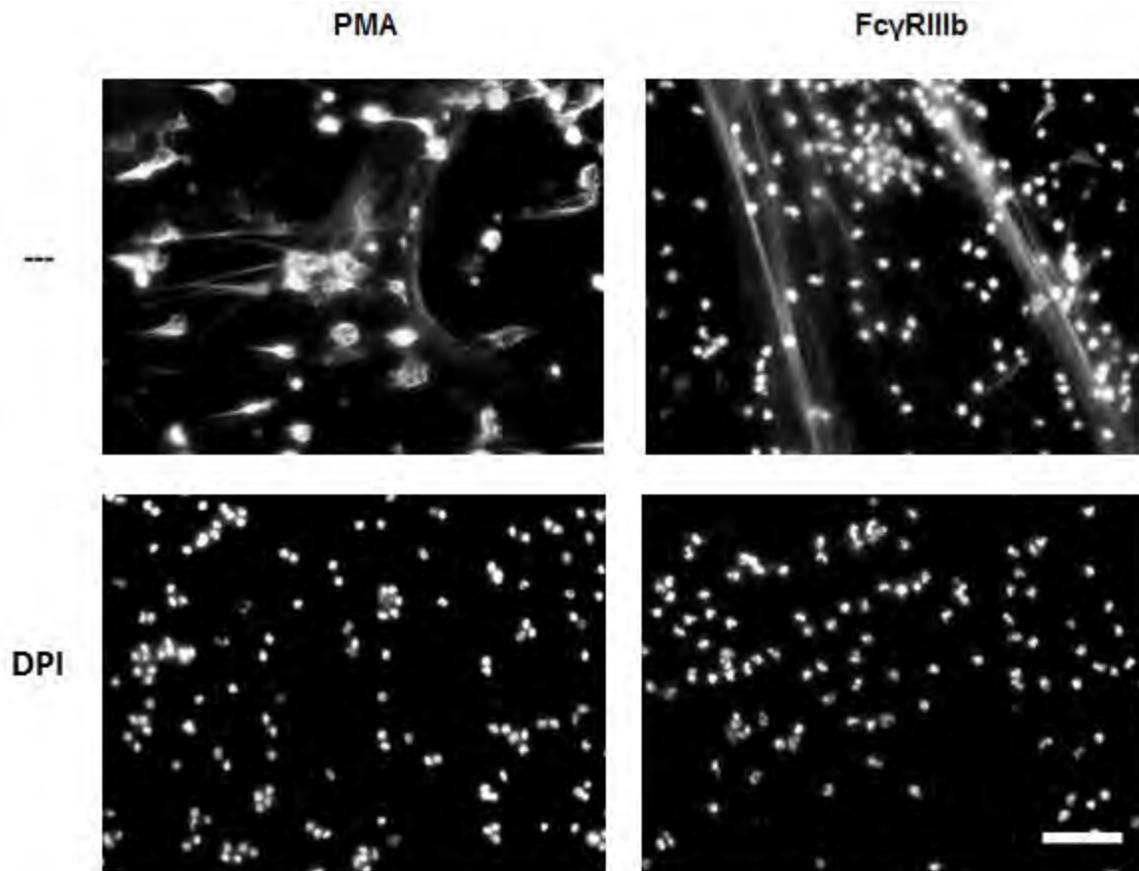


Figura 17. Tratamiento con el inhibidor específico para NADPH oxidasa. Al estimular el receptor FcγRIIb y tratar los neutrófilos con el inhibidor DPI se impide la formación de NETs. De igual forma los PMN tratados con el inhibidor específico para NADPH oxidasa y estimulados con PMA no son capaces de formar NETs. Fotografías representativas de tres experimentos independientes. La barra representa 50 μm .

IKK está involucrado en la formación de NETs posterior a la estimulación con PMA (Lapponi et al., 2013). Por tal motivo, se evaluó la participación de esta molécula en la formación de NETs estimulando el receptor FcγRIIIB. Los PMN fueron tratados con BAY 11-7082, un inhibidor de IKK. Los neutrófilos estimulados con PMA en presencia del inhibidor disminuye significativamente la formación de NETs (Figura 18 y 19). En contraste, los PMN tratados con dos diferentes concentraciones del inhibidor BAY 11-7082, forman NETs de una forma eficiente al entrecruzar el receptor FcγRIIIB (Figura 18 y 19). Los datos sugieren que la formación de NETs inducidas por el FcγRIIIB es independiente de IKK.

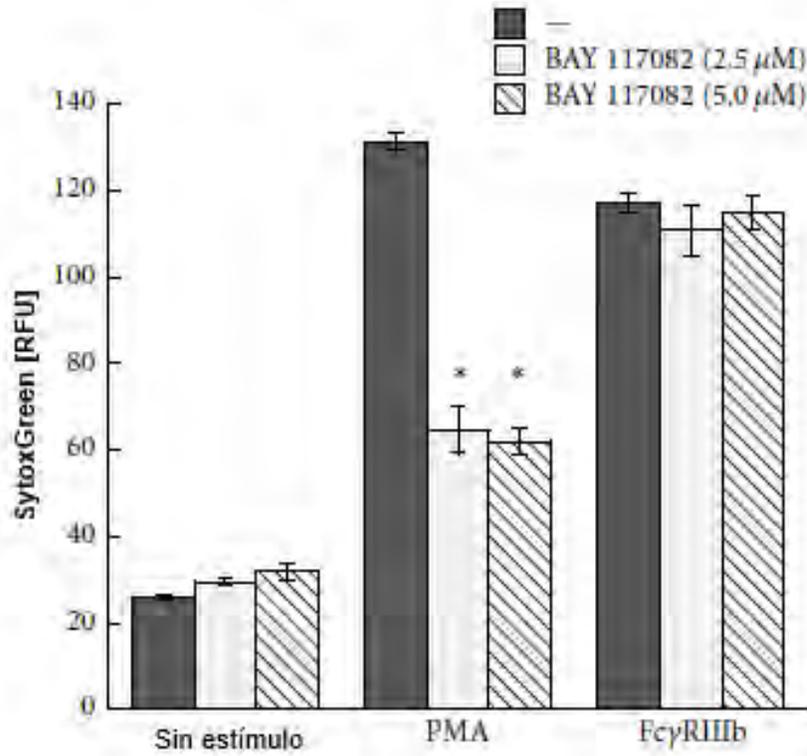


Figura 18. Los PMN se incubaron 30 min antes del estímulo con el inhibidor BAY 117082 a 2.5 μM y 5 μM respectivamente o con el disolvente (---). El tratamiento con ambas concentraciones del inhibidor BAY 117082 disminuye la formación de NETs inducidas por PMA, en contraste la formación de NETs inducidas por el FcγRIIIB no disminuye al pretratar los PMN con ninguna de las dos concentraciones del inhibidor BAY 117082. La cantidad relativa de NETs fue estimada de la fluorescencia del colorante SYTOX Green. La lectura se realizó posterior a cuatro horas de estímulo. Los datos son la media ± ESM de cuatro experimentos independientes. Los asteriscos marcan las condiciones donde se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control.

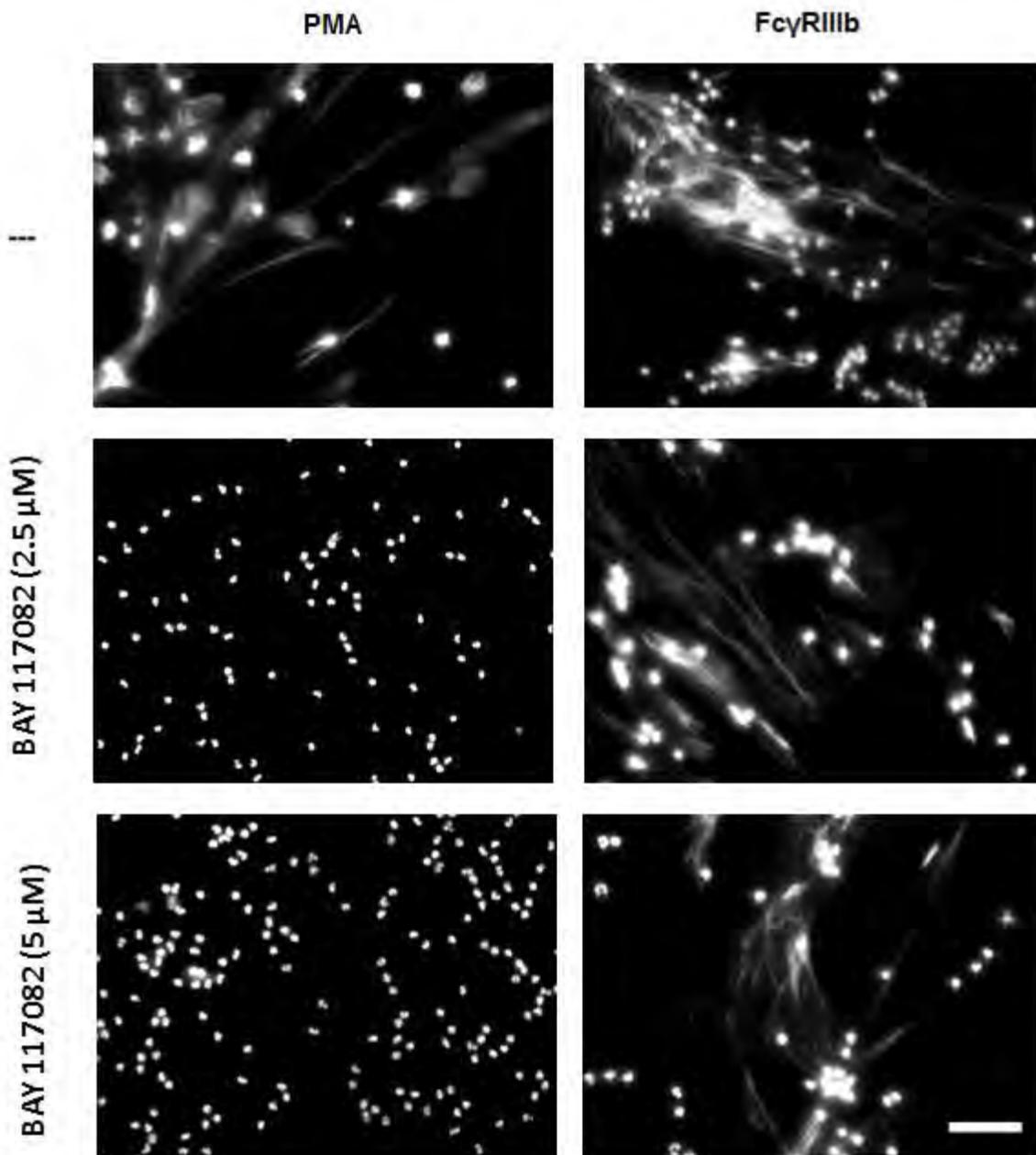


Figura 19. FcγRIIIb no requiere de IKK para inducir la formación de NETs. Al estimular los PMN con PMA el pretratamiento con el inhibidor para IKK se disminuye la formación de NETs. En contraste al tratar los PMN con el inhibidor para IKK y estimular el receptor FcγRIIIb no se impide la formación de NETs. La barra representa 50 μm. Fotografías representativas de tres experimentos independientes.

Otra molécula importante en la señalización de receptores Fc guiados por ITAM es Syk. Sin embargo, el FcγRIIIb no cuenta con secuencia ITAM, pero se ha sugerido que este receptor podría señalizar en cooperación con FcγRIIa (Rosales and Uribe-Querol, 2013). Por lo tanto, se evaluó la participación de Syk en la formación de NETs inducidas por el FcγRIIIb utilizando piceatanol, un inhibidor específico para Syk. Los PMN estimulados con PMA en presencia de piceatanol disminuyen la formación de NETs (Figura 20 y 21). En forma similar, la inducción de NETs dependiente del FcγRIIIb se disminuye en presencia de piceatanol (Figura 20 y 21). Estos resultados sugieren que Syk es necesario en la formación de NETs inducidas tanto por el FcγRIIIb, así como por PMA.

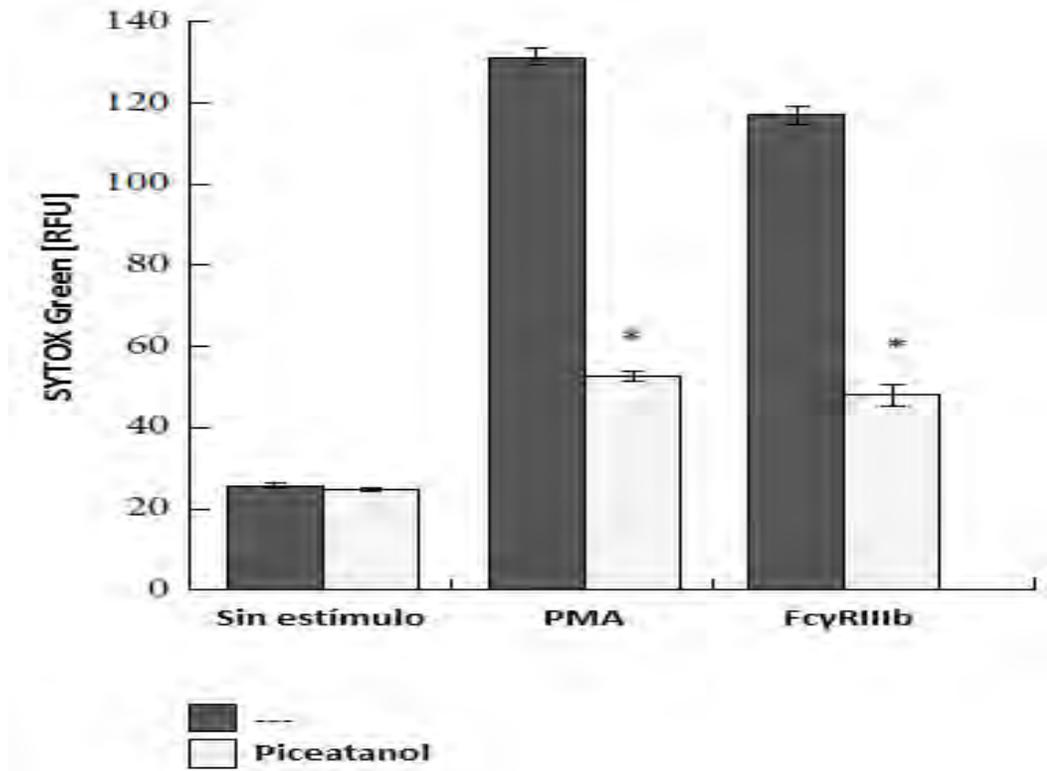


Figura 20. Los PMN se incubaron 30 min antes del estímulo con el inhibidor Piceatanol a una concentración final de 50 μ M o con el disolvente (---). El tratamiento con piceatanol disminuye la formación de NETs inducidas por PMA, así como la formación de NETs inducidas por el FcγRIIIb. La cantidad relativa de NETs fue estimada de la fluorescencia del colorante SYTOX Green. La lectura se realizó posterior a cuatro horas de estímulo. Los datos son la media \pm ESM de cinco experimentos independientes. Los asteriscos marcan las condiciones donde se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control.

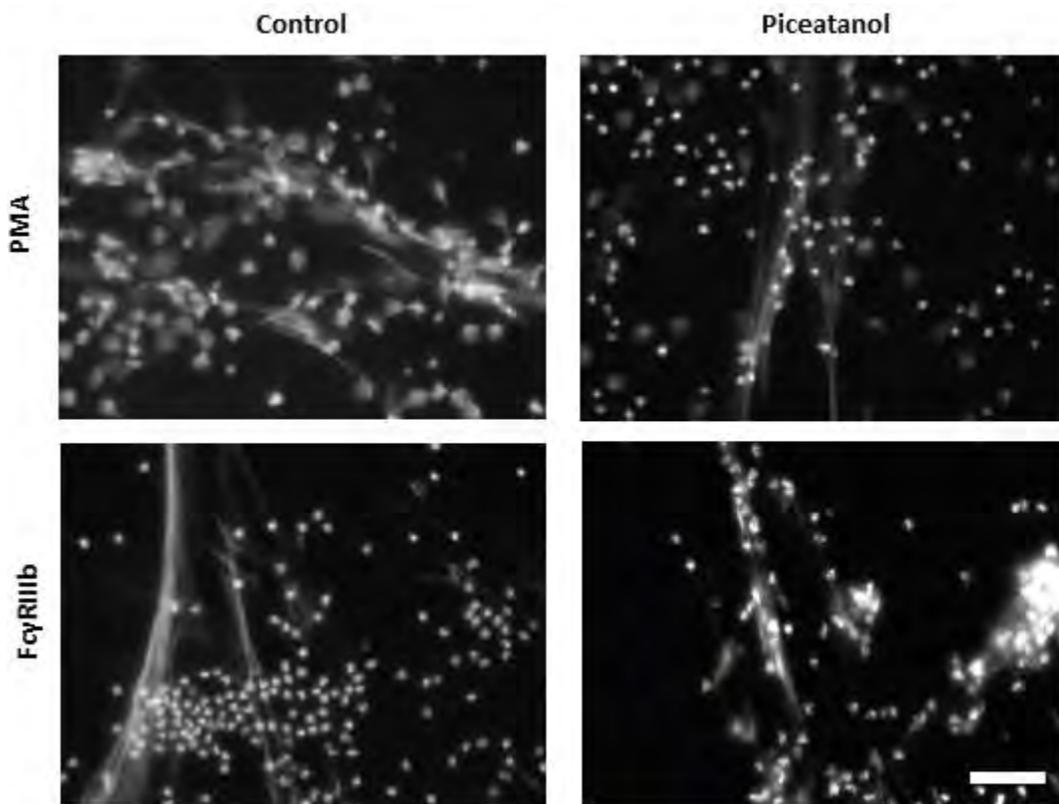


Figura 21. La formación de NETs requiere de Syk. Al estimular los PMN con PMA el pretratamiento con piceatanol se disminuye la formación de NETs al igual que las NETs inducidas por el FcγRIIIB. La barra representa 50 μ m. Fotografías representativas de tres experimentos independientes.

Anteriormente se demostró que el estímulo del FcγRIIIb induce la activación de ERK sin embargo cómo el FcγRIIIb induce la activación de ERK es desconocido. Recientemente se ha demostrado que TAK1 (del inglés transforming growth factor-β-activated kinase 1) es capaz de activar ERK en neutrófilos humanos (Sylvain-Prévost et al., 2015); por lo tanto se decidió evaluar si TAK1 está implicada en el proceso activado por el FcγRIIIb. Los PMN fueron tratados con el inhibidor LLZ 1640-2 (específico para TAK1) o con el disolvente durante 30 minutos. El tratamiento con el inhibidor para TAK1 disminuye la formación de NETs posterior al estímulo del FcγRIIIb. Sin embargo, el inhibidor para TAK1 no disminuyó la formación de NETs inducidas por PMA (Figura 22A y 23).

TAK1 es una cinasa que puede regular la activación de MAPK en la vía de activada por TGFβ (Yamaguchi et al., 1995), por lo tanto se evaluó si al estimular con TGFβ, los PMN son capaces de formar NETs. La formación de NETs inducidas tanto por PMA como por el FcγRIIIb no se ve afectada por el estímulo con TGFβ. Además, el tratamiento solo con TGFβ no induce la formación de NETs (Figura 22B). Los datos sugieren que la formación de NETs inducidas por el FcγRIIIb es dependiente de TAK1.

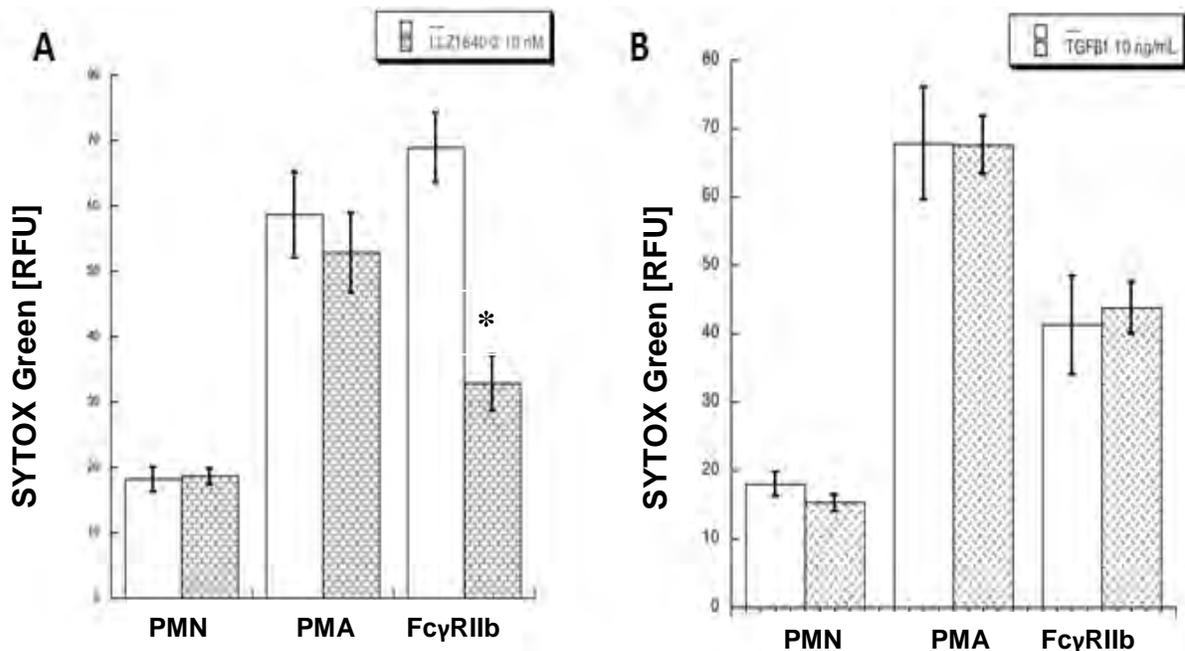


Figura 22. El inhibidor LLZ1640-2 detiene la formación de NETs inducidas por el FcγRIIIb. A) Los PMN se incubaron 30 min antes del estímulo con el inhibidor LLZ1640-2 o con el disolvente (---). La formación de NETs inducidas por el FcγRIIIb disminuye debido al tratamiento con inhibidor LLZ1640-2, en contraste la formación de NETs inducidas por PMA no disminuye al pretratar los PMN con inhibidor LLZ1640-2. La cantidad relativa de NETs fue estimada de la fluorescencia del colorante SYTOX Green. La lectura se realizó posterior a cuatro horas de estímulo. Los datos son la media ± ESM de tres experimentos independientes. El asterisco marca la condición donde se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$). B) Los PMN se incubaron 15 min antes del estímulo con TGFβ1 (10 ng/mL). La formación de NETs inducidas tanto por PMA como por el FcγRIIIb no se ve afectada por el estímulo con TGFβ. La estimulación con TGFβ no induce la formación de NETs. La cantidad relativa de NETs fue estimada de la fluorescencia del colorante SYTOX Green. La lectura se realizó posterior a cuatro horas de estímulo. Los datos son la media ± ESM de tres experimentos independientes.

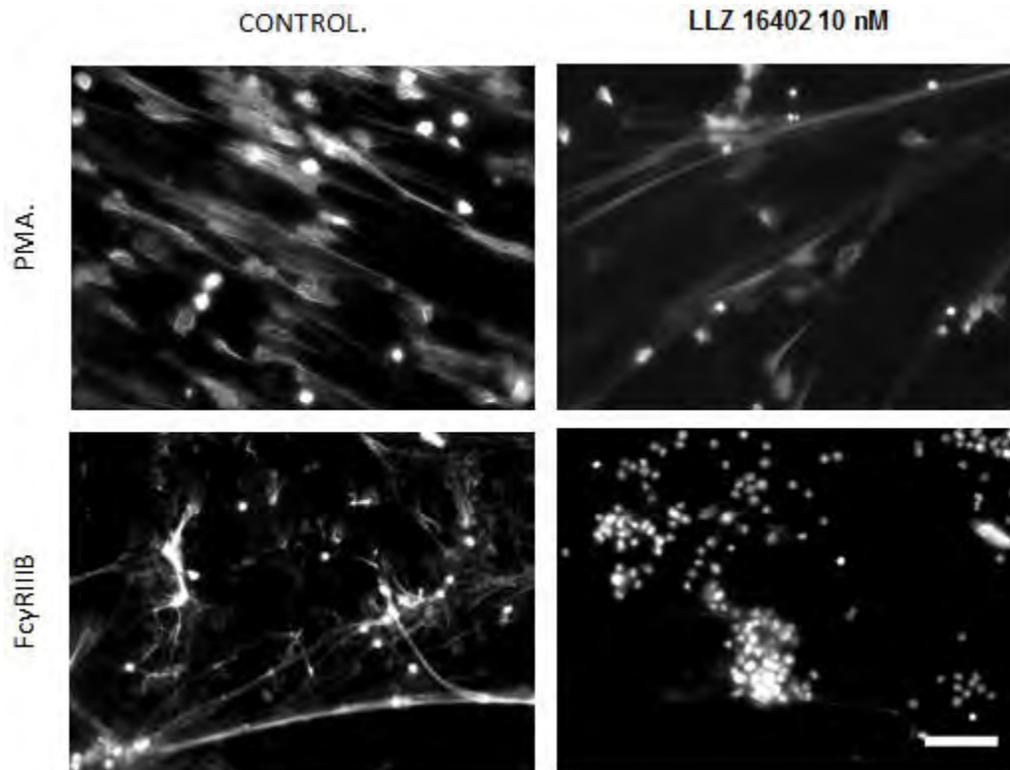


Figura 23. Tratamiento con el inhibidor LLZ1640-2. Los PMN se incubaron 30 min antes del estímulo con el inhibidor LLZ1640-2g o con el disolvente (---). El tratamiento con el inhibidor LLZ1640-2 disminuye la formación de NETs inducidas por el FcγRIIIB, sin embargo, la formación de NETs inducidas por PMA no se detiene al utilizar el inhibidor LLZ1640-2. Se realizó la tinción para DNA con DAPI. Fotografías representativas de tres experimentos independientes. La barra representa 50 μ m.

Para confirmar la activación de TAK1, se evaluó su fosforilación por Western Blot. Al estimular al FcγRIIIb en los PMN se logra la fosforilación de TAK1. En contraste la estimulación con PMA no produce la fosforilación de TAK1 (Figura 24A). Adicionalmente se estimó si la fosforilación de TAK1 es disminuida utilizando LLZ1640-2 (inhibidor específico para TAK1). Se estimuló el FcγRIIIb en presencia o ausencia de LLZ1640-2. Al estimular el FcγRIIIb en presencia de LLZ1640-2 se observó un decremento en la fosforilación de TAK1 (24B). Anteriormente se mostró que el estímulo con TGFβ no es capaz de inducir la formación de NETs, sin embargo, el estímulo con TGFβ logra la fosforilación de TAK1, mostrando que los PMN logran responder al TGFβ (Figura 24C).

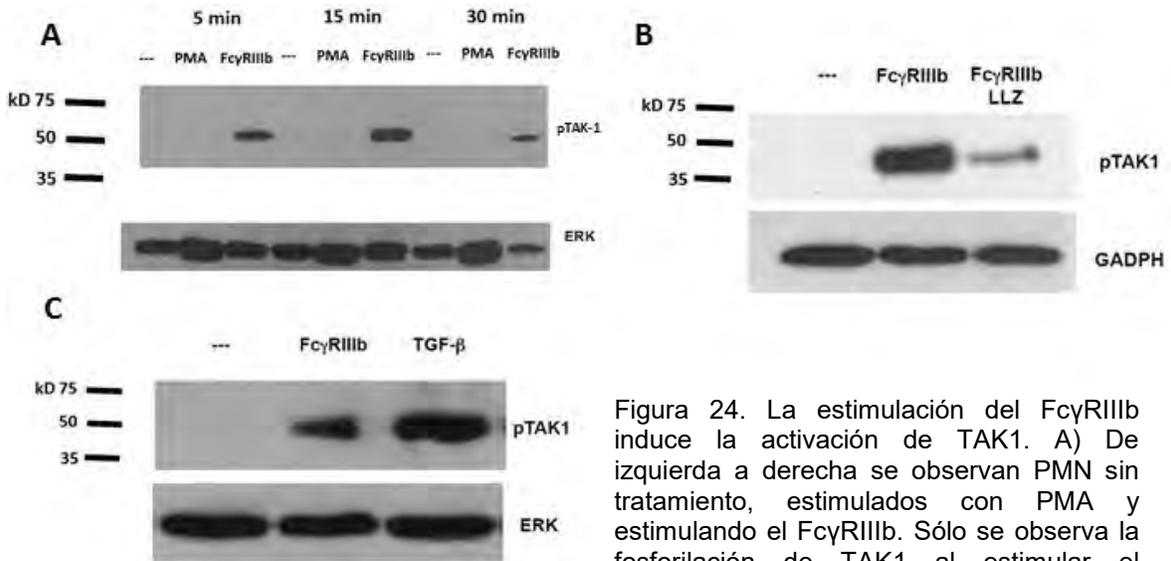


Figura 24. La estimulación del FcγRIIIb induce la activación de TAK1. A) De izquierda a derecha se observan PMN sin tratamiento, estimulados con PMA y estimulando el FcγRIIIb. Sólo se observa la fosforilación de TAK1 al estimular el FcγRIIIb. La fosforilación de TAK1 es detectable a los 5 min, observándose un máximo a los 15 min y comienza a perderse

Estos tiempos de estímulo fueron utilizados en los posteriores experimentos para detectar la fosforilación de TAK1. Las proteínas se corrieron en un gel de SDS-PAGE, el Western Blot se realizó para TAK1 en su forma fosforilada (pTAK1 imagen superior) o para ERK total (imagen inferior). B) De izquierda a derecha se observan PMN sin tratamiento, estimulando el FcγRIIIb y estimulado el FcγRIIIb en presencia del inhibidor LLZ1640-2 específico para TAK1 (LLZ). Las proteínas se corrieron en un gel de SDS-PAGE, el Western Blot se realizó para TAK1 en su forma fosforilada (pTAK1 imagen superior) o para GAPDH total (imagen inferior). C) De izquierda a derecha se observan PMN sin tratamiento, estimulando el FcγRIIIb y estimulados con TGFβ. Las proteínas se corrieron en un gel de SDS-PAGE, el Western Blot se realizó para TAK1 en su forma fosforilada (pTAK1 imagen superior) o para ERK total (imagen inferior). Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

Para establecer la conexión entre TAK1 y el FcγRIIIb, se estimuló el FcγRIIIb en presencia o ausencia de piceatanol y se estimó la fosforilación de TAK1. La fosforilación de TAK1 inducida por el FcγRIIIb se bloquea en presencia de piceatanol (Figura 25). Éstos datos sugieren que el FcγRIIIb activa TAK1 utilizando Syk.

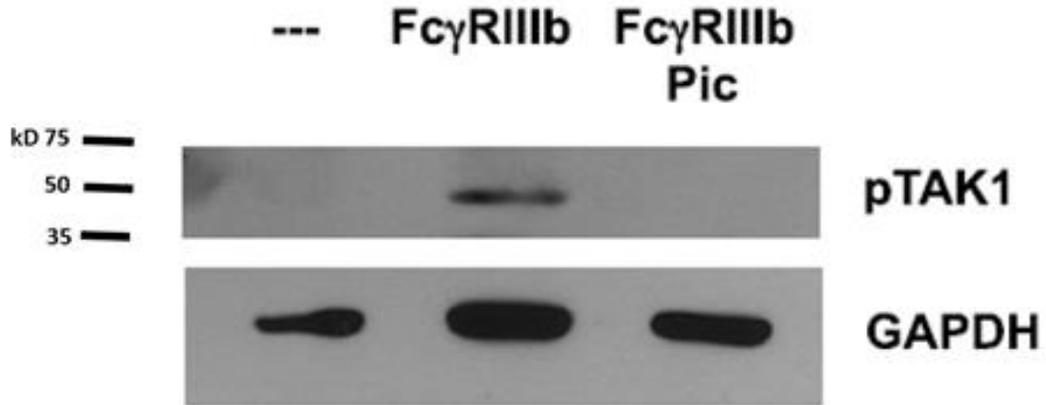


Figura 25. El FcγRIIIb induce la fosforilación de TAK1 utilizando Syk. De izquierda a derecha se observan PMN sin tratamiento, estimulando el FcγRIIIb en presencia o ausencia de piceatanol. La fosforilación de TAK1 inducida por el FcγRIIIb se bloquea en presencia de piceatanol. Las proteínas se corrieron en un gel de SDS-PAGE, el Western Blot se realizó para TAK1 en su forma fosforilada (pTAK1 imagen superior) o para GAPDH total (imagen inferior). Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

Para conocer si TAK1 se encuentra involucrado en la activación de ERK, se estimuló a los PMN en presencia del inhibidor de TAK1 (LLZ1640-2) con PMA o estimulando el FcγRIIIb y se detectó la fosforilación de ERK por Western Blot. Al estimular con PMA se logra la fosforilación de ERK, sin embargo, esta fosforilación de ERK no se logra abatir en presencia de inhibidor LLZ1640-2 (Figura 26A). En contraste el estímulo del FcγRIIIb induce la fosforilación de ERK, pero es bloqueada utilizando el inhibidor LLZ1640-2 (Figura 26B). Esto muestra que la activación de TAK1 es necesaria para la fosforilación de ERK posterior al estímulo del FcγRIIIb.

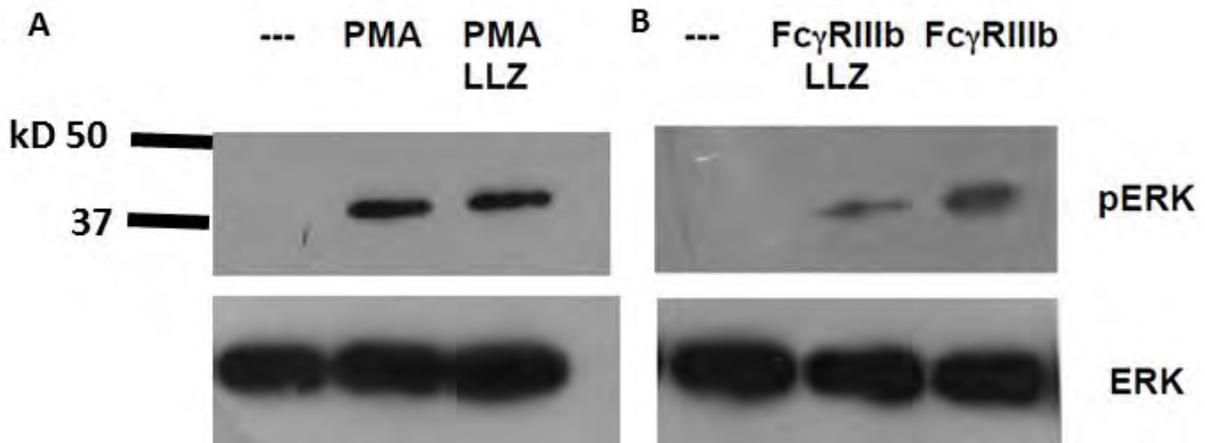


Figura 26. TAK1 está involucrado en la vía de activación de ERK estimulando el FcγRIIIb. A) De izquierda a derecha se observan PMN sin tratamiento, estimulados con PMA y estimulados con PMA en presencia del inhibidor LLZ1640-2 específico para TAK1. Las proteínas se corrieron en un gel de SDS-PAGE, el Western Blot se realizó para ERK en su forma fosforilada (p-ERK imagen superior) o para ERK total (imagen inferior). B) De izquierda a derecha se observan PMN sin tratamiento, estimulado el FcγRIIIb en presencia del inhibidor LLZ1640-2 específico para TAK1 y estimulando el FcγRIIIb. Las proteínas se corrieron en un gel de SDS-PAGE, el Western Blot se realizó para ERK en su forma fosforilada (p-ERK imagen superior) o para ERK total (imagen inferior). Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

Es común que la activación de MEK lleva a la fosforilación de ERK, además como se ha mostrado con anterioridad que al estimular el FcγRIIIb o con PMA en presencia del inhibidor de MEK UO126 se impide la fosforilación de ERK. Adicionalmente se mostró como al inhibir TAK1 se bloquea la fosforilación de ERK. Por lo tanto, para conocer si la actividad de TAK1 se ve afectada por la actividad de MEK se estimuló el FcγRIIIb en presencia o ausencia del inhibidor UO126. Como se mostró anteriormente la estimulación al FcγRIIIb produce la activación de TAK1, sin embargo, la activación de TAK1 no logra ser bloqueada en presencia del inhibidor de MEK UO126 (Figura 27). Estos datos sugieren que TAK1 se encuentra río arriba de la vía MEK-ERK.

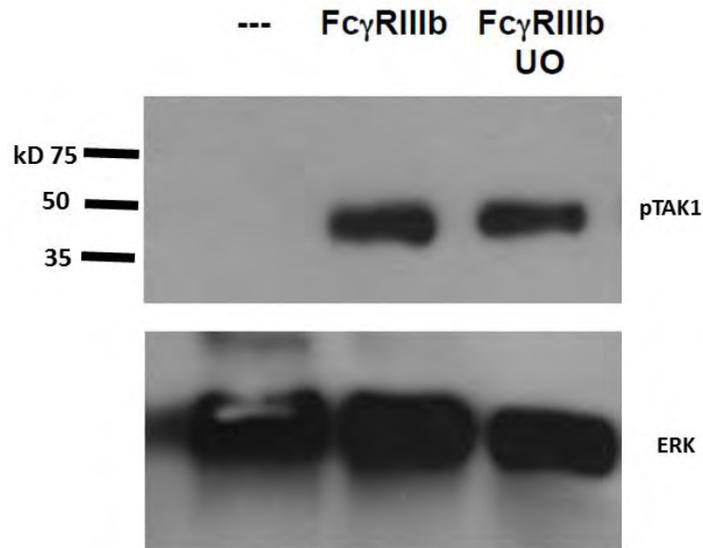


Figura 27. Tak1 se encuentra río arriba de la vía MEK-ERK. De izquierda a derecha se observan PMN sin tratamiento, estimulados el FcγRIIIb y estimulando el FcγRIIIb en presencia del inhibidor UO126. Las proteínas se corrieron en un gel de SDS-PAGE, el Western Blot se realizó para TAK1 en su forma fosforilada (pTAK1 imagen superior) o para ERK total (imagen inferior). Imagen representativa de tres experimentos independientes.

Con el fin de conocer si Syk se encuentra río arriba de la vía ERK, se estimuló el FcγRIIIb en presencia o ausencia de piceatanol y se estimó la fosforilación de ERK. La fosforilación de ERK inducida por el FcγRIIIb en presencia de piceatanol es bloqueada (Figura 28). Éstos datos sugieren que el FcγRIIIb activa Syk se encuentra río arriba de ERK en la vía activada por FcγRIIIb.

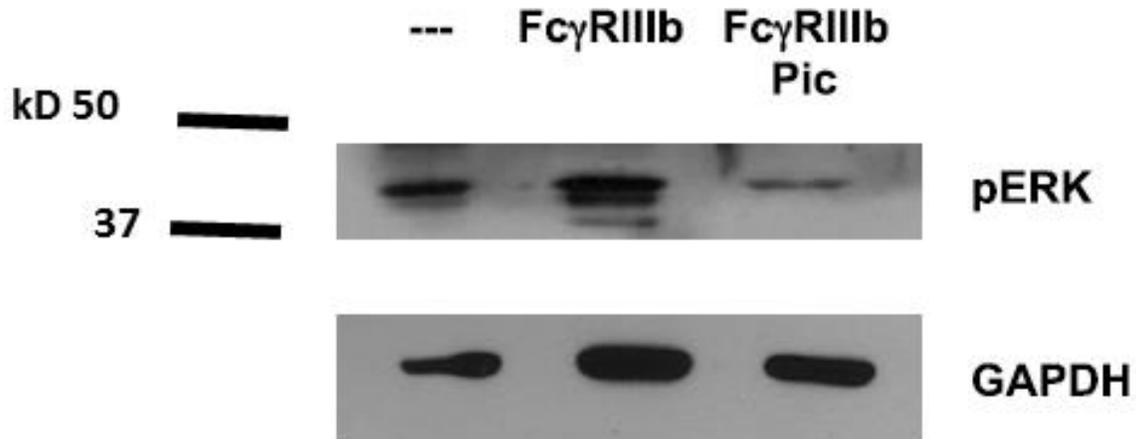


Figura 28. Syk se encuentra río arriba de ERK en la vía activada por el FcγRIIIb. De izquierda a derecha se observan PMN sin tratamiento, estimulando el FcγRIIIb en presencia o ausencia de piceatanol. La fosforilación de ERK inducida por el FcγRIIIb se bloquea en presencia de piceatanol (50 μ M). Las proteínas se corrieron en un gel de SDS-PAGE, el Western Blot se realizó para ERK en su forma fosforilada (pERK imagen superior) o para GAPDH total (imagen inferior). Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

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 (Brinkmann *et al.*, 2004). 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; Pilszczek *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; Ávila *et al.*, 2016), 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; Pilszczek *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 FcγRIIIb. Se sabe que el receptor FcγRIIa participa de forma importante en el proceso de fagocitosis (Rivas-Fuentes *et al.*, 2010), en contraste no se conoce la función del receptor FcγRIIIb (Rosales and 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 elastasa que es una proteína almacenada en los gránulos del neutrófilo (Brinkmann *et al.*, 2004). Se conoce que el LPS es un estímulo inductor de NETs y se ha sugerido que el TLR4 es quien guía esta respuesta en el neutrófilo, sin embargo, la participación de este receptor sigue siendo motivo de controversia (Clark *et al.*, 2007). Adicionalmente, sabemos que el FcγRIIIb es un receptor carente de una región intracelular, que se capaz de dirigir la vía de señalización al interior de la célula, por lo tanto, se ha sugerido que actúa utilizando señales accesorias de otros receptores (Rosales and Uribe-Querol, 2013). En su conjunto estos datos sugieren, que el FcγRIIIb podría señalizar con ayuda del TLR4, o bien actuar en conjunto para inducir la formación de NETs en el neutrófilo humano.

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 y se inhibe la formación de ROS (Fuchs *et al.*, 2007). Sin embargo, no conocemos el mecanismo utilizado por el FcγRIIIb para inducir

la activación del complejo NADPH-oxidasa. Una posible conexión entre el FcγRIIIb y el complejo NADPH-oxidasa son las PKC. Ya que al estimular los PMN con PMA, se ha observado, que la formación de NETs y la producción de ROS se ve disminuida al utilizar inhibidores para cPKC (Gray *et al.*, 2013). Además, en éste trabajo se demostró, que al estimular el FcγRIIIb en presencia de dos inhibidores para cPKC se disminuye parcialmente la formación de NETs, lo que sugiere que isoformas de este grupo de cinasas están involucradas en la vía de señal activada por el FcγRIIIb. Por lo tanto, este conjunto de datos sugiere que, posterior al estímulo del FcγRIIIb la activación del complejo NADPH-oxidasa podría ser mediada por cPKC. Además, sabemos que el neutrófilo no solo puede expresar isoformas de cPKC, si no también, del grupo de las nPKC y aPKC (Altman *et al.* 2016), por lo que es necesario realizar más estudios sobre la participación de la familia de PKC en la vía de señal activada por el FcγRIIIb.

La cinasa Syk se ha involucrado en la vía de señalización de los FcR dependiente de ITAM. Sin embargo, el FcγRIIIb no cuenta con secuencia ITAM, pero se ha sugerido que este receptor podría señalar en cooperación con FcγRIIa (Rosales and Uribe-Querol, 2013). En éste trabajo se demostró la participación de Syk en la vía de señal activada por el FcγRIIIb. Sin embargo, no conocemos como se conecta el FcγRIIIb con Syk, por lo que es necesario realizar más estudios con el fin de dilucidar su conexión.

La participación de la vía MEK-ERK se ha reportado en la formación de NETs inducida por PMA (Hakkim *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2011), así mismo la formación de NETs estimulando el FcγRIIIb necesita de la activación tanto de MEK como de ERK. Además, estudios recientes muestran que es necesaria la activación de ERK en la formación de NETs utilizando complejos inmunes solubles (Chen *et al.*, 2012) y complejos inmunes inmovilizados (Behnen *et al.*, 2014). Sin embargo, el papel de ERK en la formación de NETs no es claro. Con anterioridad se ha observado que ERK es necesario para la activación del complejo NADPH-oxidasa, es decir la activación de ERK es necesaria para la formación de ROS (Hakkim *et al.*, 2010) mientras que otro reporte muestra que la activación de ERK es posterior a la actividad del complejo NADPH-oxidasa, (Keshari *et al.*, 2013), esto muestra que la activación de ERK es dependiente del estímulo que reciba el neutrófilo.

Adicionalmente se demostró por primera vez la activación de TAK1 posterior al estímulo del FcγRIIIb, además TAK1 es requerida para la activación de la vía MEK-ERK desencadenando la formación de NETs dependiente de la activación del FcγRIIIb. Estos datos coinciden con los obtenidos en otros trabajos donde TAK1 se encuentra río arriba de la vía MEK-ERK en respuesta a factores de crecimiento y quimosinas (Sylvain-Prévost *et al.*, 2015). Cuando un receptor dependiente de ITAM es activado, las tirosinas incluidas en esta secuencia son fosforiladas, esto hace que Syk se una a estos sitios activando su función de cinasa, mediando la activación de distintas vías de señalización, entre ellas la vía MEK-ERK (Rosales, 2007). En este trabajo, se mostró, que el FcγRIIIb induce la activación de Syk, accionando la vía MEK-ERK, utilizando como molécula intermediaria a TAK1. No conocemos cuál es el mecanismo por el cual

Syk activa a TAK1, sin embargo, se conoce que TRAF6 es necesario para la activación de TAK1, además se ha demostrado que Syk puede estar unido a TRAF6 mediando la activación de TAK1 (Sorrentino et al., 2008; Lin et al., 2013). Por lo que es posible que el mecanismo utilizado por el receptor FcγRIIIb, sea similar al mencionado anteriormente.

La formación de NETs posterior al estímulo con PMA es dependiente de IKK, además, se logra la fosforilación de subunidades de NF-κB (Lapponi et al., 2013), no obstante la formación de NETs vía FcγRIIIb mostro ser independiente de esta molécula. Sin embargo, en este trabajo no se evaluó la fosforilación de NF-κB, por lo tanto, es necesario realizar experimentos que ayuden a dilucidar la fosforilación de este factor nuclear.

En diversas enfermedades autoinmunes se han encontrado autoanticuerpos específicos para proteínas de los componentes de las NETs, estos anticuerpos no solo producen la formación de complejos inmunes sino que inducen el aumento de la elaboración de NETs, sin embargo el mecanismo aún es desconocido (Kessenbrock et al., 2009; Khandpur et al., 2013; Leffler et al., 2014; Nakazawa et al., 2014; Sur Chowdhury et al., 2014; Villanueva et al., 2011; Yalavarthi et al., 2015). La formación de NETs inducida por el FcγRIIIb, podría explicar este fenómeno, es necesario realizar más estudios relacionados a este fenómeno, para en un futuro poder proponer al FcγRIIIb y la vía de señalización que inicia, cómo blanco terapéutico en este tipo de padecimientos.

Conclusiones.

Los datos obtenidos en este trabajo muestran de manera contundente que el FcγRIIIb y no el FcγRIIA, es capaz de inducir la formación de NETs, validando la hipótesis propuesta. Además, las NETs inducidas por el FcγRIIIb son similares estructuralmente a las redes formadas posterior al estímulo con PMA, dado que están compuestas de un esqueleto de cromatina asociado a elastasa, la cual es una proteína almacenada en los gránulos del neutrófilo. Este hallazgo es de gran importancia, ya que no existían reportes que vincularan la participación de un receptor que indujera la formación de NETs. Todo el conocimiento relacionado a la inducción de NETs se obtuvo estimulando al PMN con microorganismos completos o con PMA, señales poco específicas para el neutrófilo. Por lo tanto, los resultados apoyan la idea de que cada receptor Fc regula diferentes funciones celulares. 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 IKK. Además, la formación de NETs inducida por el FcγRIIIb es un proceso dependiente de la activación de Syk y posteriormente de TAK1, lo que conduce a la activación de la vía MEK-ERK. En contraste el estímulo con PMA no activa TAK1. Sin embargo, el estímulo al FcγRIIIb y con PMA convergen en la activación de Syk y de la vía MEK-ERK, además, de que en ambos casos es necesaria la activación del complejo NADPH-oxidasa y la formación de ROS, ya que al inhibir su actividad no se logra la formación de NETs. Además, en ambos casos es necesaria la activación de cPKC (Figura 29).

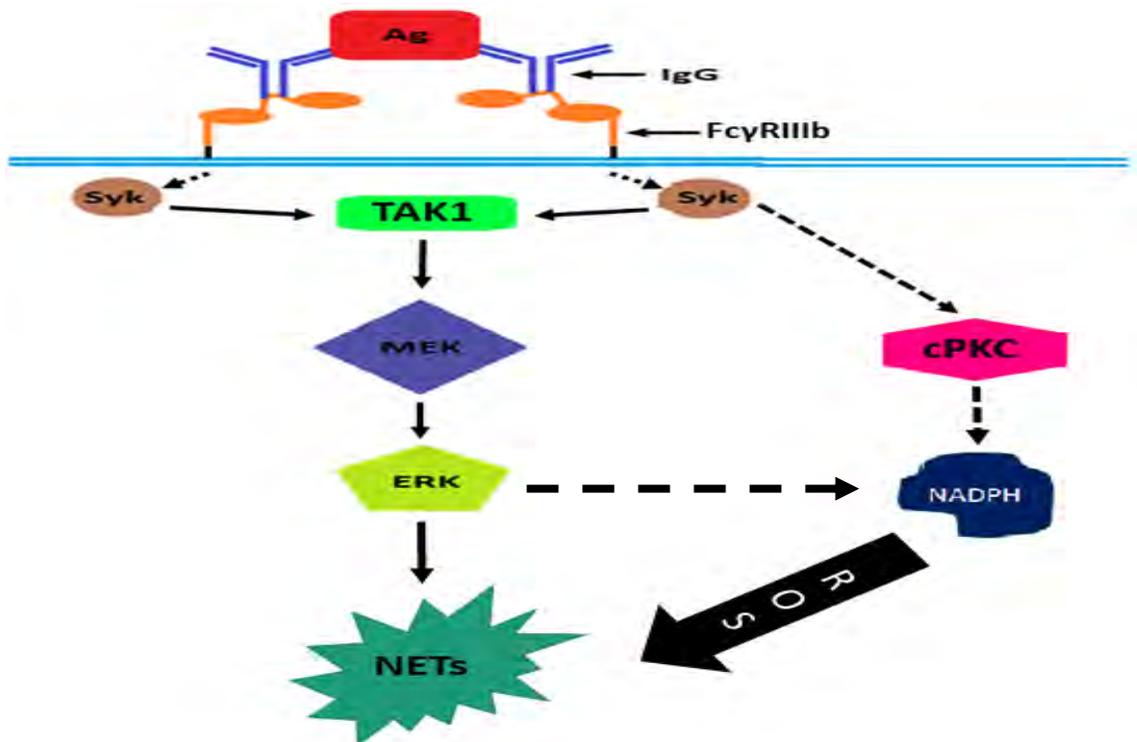


Figura 29. Modelo propuesto del mecanismo utilizado por el FcγRIIIb para inducir NETs.

Perspectivas.

Como se mencionó con anterioridad el papel de ERK en la formación de NETs no ha sido esclarecido del todo. Recientemente se ha reportado que es necesaria la activación de ERK en la formación de NETs utilizando complejos inmunes solubles (Chen et al., 2012) y complejos inmunes inmovilizados (Behnen et al., 2014). Además, con anterioridad se ha reportado que ERK es necesario para la activación del complejo NADPH-oxidasa, es decir la activación de ERK es necesaria para la formación de ROS (Hakkim et al., 2010; Lim et al., 2011) mientras que otros reportan que la activación de ERK es posterior a la actividad del complejo NADPH-oxidasa (Keshari et al., 2013) esto muestra que la activación de ERK es dependiente del estímulo que reciba el neutrófilo. Cuál es el papel de ERK en la vía activada posterior al estímulo del FcγRIIIb será abordado en futuros estudios. Además se conoce que TRAF6 es necesaria para la activación de TAK1, por lo tanto este es otro posible camino para darle continuidad al proyecto, es decir es dilucidar cuál es el mecanismo de activación de TAK1 posterior al estímulo del FcγRIIIb (Sorrentino et al., 2008).

Referencias.

- Altman, A and K. F. Kong. 2016. Protein Kinase C Enzymes in Hematopoietic and Immune Systems. *Annu. Rev. Immunol.* 34:511-538.
- Ávila, E. E., N. Salaiza, J. Pulido, M. C. Rodríguez, C. Díaz-Godínez, J. P. Laclette, I. Becker and J. C. Carrero. 2016. *Entamoeba histolytica* Trophozoites and Lipopeptidophosphoglycan Trigger Human Neutrophil Extracellular Traps. *PLOS ONE*. DOI:10.1371/journal.pone.0158979.
- Behnen, M., C. Leschczyk, S. Möller, T. Batel, M. Klinge, W. Solbach, and T. Laskay. 2014. Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via FcγRIIB and Mac-1. *Journal of Immunology*. 193:1954–1965.
- Bianchi, M., A. Hakkim, V. Brinkmann, U. Siler, R.A. Seger, A. Zychlinsky, and J. Reichenbach. 2009. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*. 33:657-670.
- Borregaard, N. 2010. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* 33:657-670.
- Borregaard, N., and J. Cowland. 1997. Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood*. 89:3503-3521.
- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. 2004. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*. 303:1532–1535.
- Brinkmann, V., and A. Zychlinsky. 2007. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature* 5:577-582.
- Brinkmann, V., and A. Zychlinsky. 2012. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 198:773-783.
- Chen, K., H. Nishi, R. Travers, N. Tsuboi, K. Martinod, D.D. Wagner, R. Stan, K. Croce, and T.N. Mayadas. 2012. Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIb but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIa in vivo. *Blood*. 120:4421–4431.
- Clark, S. R., A. C. Ma., S. A. Tavener., B. McDonald., Z. Goodarzi., M. M. Kelly., K. D. Patel., S. Chakrabarti., E. McAvoy., G. D Sinclair., E. M. Keys., E. Allen-Vercoe., R. Devinney., C. J. Doig., F. H. Green and P. Kubes. 2007. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* 13(4):463-469.
- Cortjens, B., O.J. de Boer, R. de Jong, A.F. Antonis, Y.S. Sabogal Piñeiros, R. Lutter, and R.A. Bem. 2016. Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease. *J Pathol.* 238:401-411.
- Fuchs, T.A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 176:231-241.
- Futosi, K., S. Fodor, and 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, and 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, and N. Shpigel. 2008. B-Hydroxybutyrate Abrogates Formation of Bovine Neutrophil Extracellular Traps and Bactericidal Activity against Mammary Pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 76:2802-2807.
- Gupta, A.K., M.B. Joshi, M. Philippova, P. Erne, P. Hasler, S. Hahn, and 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, and H. Waldmann. 2010. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat. Chem. Biol.* 7:75-77.
- Keshari, R.S., A. Verma, M.K. Barthwal, and M. Dikshit. 2013. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *Journal of Cellular Biochemistry.* 114:532–540.
- Kessenbrock, K., M. Krumbholz, U. Schonermarck, W. Back, W.L. Gross, Z. Werb, H.J. Grone, V. Brinkmann, and D.E. Jenne. 2009. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.* 15:623–625.
- Khandpur, R., C. Carmona-Rivera, A. Vivekanandan-Giri, A. Gizinski, S. Yalavarthi, J.S. Knight, S. Friday, S. Li, R. Patel, V. Subramanian, P. Thompson, P. Chen, D.A. Fox, S. Pennathur, and M.J. Kaplan. 2013. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* 5:178ra140.
- Lapponi, M.J., A. Carestia, V.I. Landoni, L. Rivadeneyra, J. Etulain, S. Negrotto, R.G. Pozner, and 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, and V. Nizet. 2009. M1 Protein Allows Group A Streptococcal Survival in Phagocyte Extracellular Traps through Cathelicidin Inhibition. *J Innate Immun* 1:202-214.
- Leffler, J., L. Stojanovich, Y. Shoenfeld, G. Bogdanovic, R. Hesselstrand, and A.M. Blom. 2014. Degradation of neutrophil extracellular traps is decreased in patients with antiphospholipid syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.* 32:66–70.
- Lim, M.B.H., J.W.P. Kuiper, A. Katchky, H. Goldberg, and 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, and A. Zychlinsky. 2011. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood.* 117:953-959
- Nakazawa, D., H. Shida, U. Tomaru, M. Yoshida, S. Nishio, T. Atsumi, and A. Ishizu. 2014. Enhanced formation and disordered regulation of NETs in myeloperoxidase-ANCA-associated microscopic polyangiitis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25:990–997.

- Neeli, I., N. Dwivedi, S. Khan, and M. Radic. 2009. Regulation of Extracellular Chromatin Release from Neutrophils. *J Innate Immun.* 1:194–201.
- Papayannopoulos, V., K. Metzler, A. Hakkim, and 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, and 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.
- Pilszczek, 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, and 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., M. Arazna, and U. Demkow. 2013. Life of neutrophil: From stem cell to neutrophil extracellular trap. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 187:68-73.
- Rosales, C. 2007. Fc receptor and integrin signaling in phagocytes. *Signal Transduction* 7:386-401.
- Rosales, C., and E. Uribe-Querol. 2013 Fc Receptors: cell activators of antibody functions. . *Advances in Bioscience and Biotechnology* 4:21-33.
- Sorrentino, A., N. Thakur, S. Grimsby, A. Marcusson, V. von Bulow, N. Schuster, S. Zhang, C.H. Heldin, and M. Landström. 2008. The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nature Cell Biology.* 10:1199–1207.
- Summers, C., S.M. Rankin, A.M. Condliffe, N. Singh, A.M. Peters, and E.R. Chilvers. 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology.* 31:318–324.
- Sur Chowdhury, C., S. Giaglis, U. Walker, A. Buser, S. Hahn, and P. Hasler. 2014. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res. Ther.* 16:R122.
- Sylvain-Prévost, S., T. Ear, S.F. A, C.F. Fortin, C.M. Dubois, N. Flamand, and P.P. McDonald. 2015. Activation of TAK1 by chemotactic and growth factors, and Its Impact on human neutrophil signaling and functional responses. *J Immunol* 195:5393–5403.
- Urban, C.F., U. Reichard, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2006. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell. Microbiol.* 8:668–676.
- Villanueva, E., S. Yalavarthi, C. Berthier, J.B. Hodgins, R. Khandpur, A. Lin, C.J. Rubin, W. Zhao, S.H. Olsen, M. Klinker, D. Shealy, M.F. Denny, J. Plumas, L. Chaperot, M. Kretzler, A.T. Bruce, and M.J. Kaplan. 2011. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 187:538–552.
- Yalavarthi, S., T.J. Gould, A.N. Rao, L.F. Mazza, A.E. Morris, C. Núñez-Alvarez, D. Hernández-Ramírez, P.L. Bockenstedt, P.C. Liaw, A.R. Cabral, and J.S. Knight. 2015. Release of neutrophil extracellular traps by neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: a newly identified mechanism

- of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 67:2990–3003.
- Yamaguchi, K., K.S. Shirakabe, H. K.O. Irie, I. N. Ueno, T. Taniguchi, E. Nishida, and K. Matsumoto. 1995. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-g signal transduction. *Science.* 270:2008-2011.
- 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, and P. Kubes. 2012. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat. Med.* 18:1386-1395.