



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Inducción de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)  
humanos estimulados a través de la aminopeptidasa N (CD13)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

**Álvarez Carrasco Pablo Arturo**

TUTOR:

**Enrique Ortega Soto**

Instituto de Investigaciones Biomédicas

COMITÉ TUTORAL:

**Dra. María Elena Ibarra Rubio**

Facultad de Química

**Dr. Julio César Carrero Sánchez**

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad de México. Febrero, 2019



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.

## **Agradecimientos**

Esta tesis fue realizada en el laboratorio del Dr. Enrique Ortega, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas y gracias al financiamiento de PAPIIT-DGAPA-UNAM (Proyecto IN205617) y CONACYT (Proyecto 252428).

Agradezco ampliamente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado formalizado con el número (CVU/Becario): 736805/607582 para realizar mis estudios de Maestría.

Agradezco al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP) por los apoyos recibidos para financiar mi asistencia a los congresos “Transduction Signalling in Health and Disease Conference” en Londres, Reino Unido y el “XII Congress of the Latin American association of Immunology-ALAI” en Cancún, México.

Gracias a la M. en C. Claudia Garay por su ayuda y dedicación como técnico académico, compañera de trabajo, maestra y amiga.

A mi comité tutor formado por la Dra. María Elena Ibarra Rubio y el Dr. Julio César Carrero Sánchez por guiarme en el curso de este trabajo.

A los miembros del jurado: Dra. Gladis del Carmen Fragoso, Dra. María Eugenia Torres, Dra. Gohar Gevorgyan, Dra. María Isabel Soto y Dr. Martín Gustavo Pedraza por la revisión crítica y las valiosas aportaciones a este trabajo.

Agradezco ampliamente al M. en C. Rodrigo Muñoz por su contribución tan importante en la realización de este proyecto.

Por último, pero no menos importante agradezco a mi *alma mater*, la Universidad Nacional Autónoma de México por darme todo el conocimiento y las herramientas necesarias para crecer profesionalmente, ayudarme a ser crítico y forjar en mí una actitud de crecimiento personal.

## **Dedicatorias**

Este trabajo está dedicado a cuatro personas que han sido la única razón de mis logros y sé que siempre estarán a mi lado: Gracias Irma, Gracias Jesús, Gracias Fabiola, Gracias Gina, gracias familia.

A los miembros y compañeros del laboratorio: Montse, Andrea, Laura, Kenia y Gabriela por ser grandes colaboradoras y amigas en el laboratorio.

A Gina López y Carlos García por brindarme su especial amistad y ayuda de manera incondicional en el ámbito académico y personal.

Quiero dar un especial agradecimiento y dedicación a la Dra. Gloria Erandi Pérez Figueroa por haber sido mi guía todo este tiempo, porque me ha enseñado un sinfín de cosas, me ha ayudado incondicionalmente, me ha brindado una amistad invaluable y éste trabajo es tan mío como de ella.

Le agradezco especialmente al Dr. Enrique Ortega por darme la confianza y el apoyo de trabajar con él en su laboratorio y con su equipo, por brindarme el conocimiento y las herramientas que me han hecho crecer profesionalmente.

Gracias a Rosario, Clarisa, Eduardo, Rafael, José de Jesús, Isaac, Juan, así como a todas aquellas personas que me rodearon este tiempo, que me ayudaron y que hicieron de estos años de maestría una experiencia increíble.

# 1. Tabla de contenido

<b>2. RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>4. MARCO TEÓRICO</b>	<b>8</b>
4.1 NEUTRÓFILOS	8
4.2 DEGRANULACIÓN	18
4.3 FAGOCITOSIS	19
4.4 ESTALLIDO RESPIRATORIO	20
4.5 TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETs)	21
4.6 CD13	22
<b>5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>25</b>
<b>6. HIPÓTESIS</b>	<b>25</b>
<b>7. OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
7.1 OBJETIVOS PARTICULARES	26
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
8.1 PURIFICACIÓN DE NEUTRÓFILOS HUMANOS	27
8.2 CONTEO CELULAR	28
8.3 ESTÍMULOS	28
8.4 CITOMETRÍA DE FLUJO	29
8.5 AGREGACIÓN HOMOTÍPICA	29
8.6 CINÉTICA DE FORMACIÓN DE NETs.	30
8.7 INMUNOFLUORESCENCIA (DETERMINACIÓN DE NETs POR MICROSCOPIA)	31
<b>9. RESULTADOS</b>	<b>32</b>
9.1 IDENTIFICACIÓN DE NEUTRÓFILOS Y PRESENCIA DE CD13 Y CD11b.	32
9.2 EFECTO DE LOS ESTÍMULOS PMA, FMLP E IL8 SOBRE LA EXPRESIÓN MEMBRANAL DE CD13 Y CD11b.	34
9.3 ACTIVACIÓN CON INTERLEUCINA 8 (IL-8)	34
9.4 ACTIVACIÓN CON N-FORMIL-MET-LEU-PHE (FMLP).	36
9.5 ACTIVACIÓN CON FORBOL-12-MIRISTATO-13-ACETATO (PMA).	38
9.6 EFECTO DEL ENTRECruzAMIENTO DE CD13 EN LA ACTIVACIÓN DE PMNs.	40
9.7 CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE CD13 Y CD11b DE MEMBRANA MONITOREADOS A TRAVÉS DEL TIEMPO DESPUÉS DE SER ESTIMULADOS.	44
9.8 AGREGACIÓN HOMOTÍPICA	51
9.9 CD13 EN LA FORMACIÓN DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETs).	53

<b>10.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>70</b>
<b>10.1</b>	<b>EXPRESIÓN DE CD13 EN MEMBRANA</b>	<b>70</b>
<b>10.2</b>	<b>AGREGACIÓN HOMOTÍPICA</b>	<b>72</b>
<b>10.3</b>	<b>CD 13 INDUCE LA FORMACIÓN DE REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS</b>	<b>73</b>
<b>11.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>75</b>
<b>12.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>76</b>
<b>13.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>78</b>
<b>14.</b>	<b>APÉNDICES</b>	<b>83</b>
<b>14.1</b>	<b>MODELOS LINEALES DE EFECTOS MIXTOS USADOS PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CD13 EN MEMBRANA</b>	<b>83</b>
<b>14.2</b>	<b>MODELOS LINEALES DE EFECTOS MIXTOS USADOS PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CD11B EN MEMBRANA</b>	<b>85</b>
	<b>RESPUESTAS LINEALES</b>	<b>85</b>
<b>14.3</b>	<b>MODELOS LINEALES DE EFECTOS MIXTOS USADOS PARA EL ANÁLISIS DE LA FORMACIÓN DE NETS ENTRECruzANDO A CD13 CON MAb452 O Fab452</b>	<b>87</b>
<b>14.4</b>	<b>MODELOS LINEALES DE EFECTOS MIXTOS USADOS PARA EL ANÁLISIS DE LA FORMACIÓN DE NETS ENTRECruzANDO A CD13 CON MAb 452 O Fab452 Y ALGÚN ESTÍMULO (PMA, FMLP O IL8)</b>	<b>88</b>

## 2. Resumen

El sistema inmunológico está conformado por una gran cantidad de elementos que trabajan de manera coordinada para proteger al organismo de la invasión de patógenos. Entre la amplia gama celular se encuentran los neutrófilos (PMNs), los cuales son los leucocitos más abundantes y la primera línea de defensa contra antígenos. Los PMNs, al igual que todas las células inmunes, expresan en su membrana una gran diversidad de receptores que detectan patógenos y median sus diversas funciones efectoras.

CD13 (aminopeptidasa N) es una molécula expresada en la membrana de células mieloides (monocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos). Hasta ahora se han descrito funciones para CD13 en procesos vinculados directamente con su capacidad enzimática, así como procesos ajenos a su calidad de aminopeptidasa como adhesión y fagocitosis en monocitos y macrófagos. Sin embargo, no existen estudios que relacionen las funciones conocidas de CD13 en los neutrófilos humanos en la respuesta innata, a excepción de un posible papel en la inhibición de la apoptosis a través de  $TNF\alpha$ .

En este trabajo investigamos a CD13 desde dos puntos de vista. El primero como parte del arsenal de receptores que cambia su expresión después de la activación celular y el segundo como un receptor capaz de activar funciones efectoras en PMNs. Observamos como la activación de los neutrófilos usando 3 activadores, forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), N- formilmetionina-leucil-fenilalanina (FMLP) e Interleucina 8 (IL-8), modifican la expresión de CD13 en membrana. Por otro lado, entrecruzamos a CD13 utilizando el anticuerpo monoclonal anti CD13 "452" o usando fragmentos Fab del mismo anticuerpo monoclonal. Lo que nos permitió demostrar la vinculación de CD13 con la agregación homotípica de neutrófilos, así como su capacidad de inducir la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs).

Estos resultados demuestran que CD13 (APN) está presente en los leucocitos polimorfonucleares (PMN), que su expresión está regulada por el metabolismo celular y que es capaz de mediar las funciones efectoras características de neutrófilos como la liberación de NETs.

### 3. Introducción

La Aminopeptidasa N, o CD13, es una glicoproteína de membrana con actividad de exopeptidasa, expresada en varios tipos celulares. En células hematopoyéticas, CD13 es expresado en células mielomonocíticas: granulocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y sus precursores. A través de su actividad de peptidasa, CD13 participa en el procesamiento de quimiocinas, péptidos vasoactivos, citocinas, encefalinas y hormonas. También participa en otras funciones, que no necesariamente dependen de su actividad enzimática, como adhesión celular, angiogénesis e invasividad de células tumorales. Aunque desde hace varios años se conoce que CD13 es altamente expresada en neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas, su participación en las funciones de estas células ha sido poco explorada.

En el laboratorio del Dr. Enrique Ortega se desarrolló, en los años recientes, una línea de investigación sobre las funciones de CD13 en monocitos, macrófagos y células dendríticas. Se demostró que CD13 es un receptor fagocítico primario en monocitos y macrófagos, y que esta fagocitosis está acoplada a la generación de especies reactivas de oxígeno, un mecanismo microbicida importante en la respuesta inmune innata de los fagocitos profesionales <sup>1,2</sup>.

CD13 también se expresa en leucocitos polimorfonucleares (PMNs), neutrófilos. Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en la sangre, y son las células con mayor capacidad fagocítica y microbicida. Una de las pocas funciones reportadas de CD13 expresado en la superficie de neutrófilos es la regulación de la apoptosis inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), inhibiendo al receptor para TNF. En el presente trabajo, se estudió la capacidad de CD13 como un receptor de la inmunidad innata capaz de mediar funciones efectoras (fagocitosis, agregación homotípica y formación de trampas extracelulares de neutrófilos) en neutrófilos.

Determinamos si la activación de los neutrófilos con diferentes agonistas como PMA (formol-miristato-acetato), el péptido quimiotáctico para neutrófilos fMLP e IL-8, afecta la expresión de aminopeptidasa N/CD13 en membrana. Además se determinó que CD13 puede mediar la activación de funciones efectoras como la producción de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs).

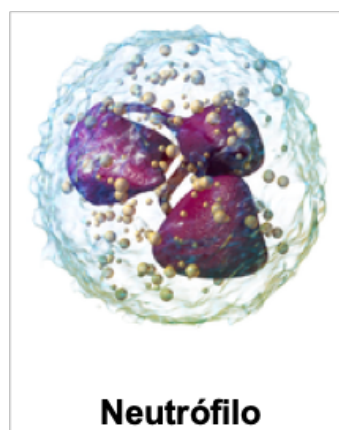
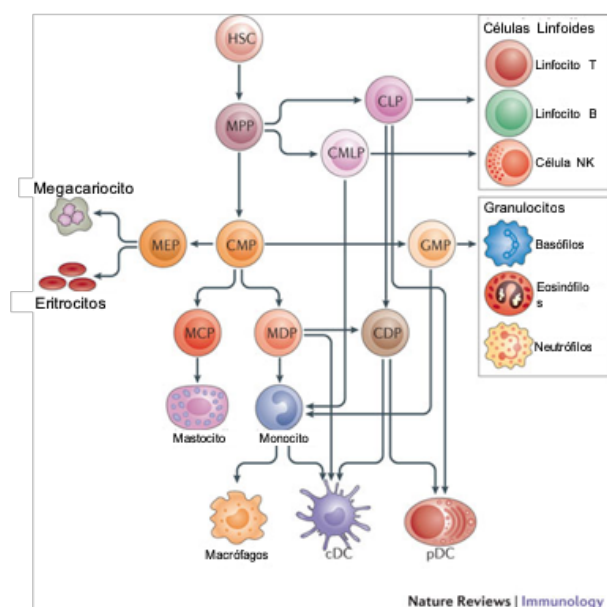


## 4. Marco Teórico

### 4.1 Neutrófilos

En 1883 Elie Metchnikoff observó bajo el microscopio ciertos glóbulos blancos en la sangre que eran capaces de ingerir microorganismos y otros materiales, a estas células las denominó fagocitos. Las células eran, en su mayoría, monocitos y neutrófilos sanguíneos. Hoy en día sabemos que casi la totalidad de la fagocitosis la llevan a cabo células especializadas; monocitos, neutrófilos sanguíneos, y macrófagos tisulares<sup>3</sup>.

En conjunto con los eosinófilos y basófilos, los neutrófilos, también llamados leucocitos polimorfonucleares (PMNs), forman parte de la familia leucocitaria conocida como granulocitos (Figura 1), caracterizados por poseer gránulos citoplasmáticos. Los gránulos son estructuras de almacenamiento de moléculas con importantes funciones antimicrobianas que son liberadas al medio extracelular o a las vesículas fagocíticas, para optimizar la defensa del organismo contra diversos antígenos.



**Figura 1.** Diferenciación hematopoyética en condiciones fisiológicas normales. Del lado izquierdo se observa la diferenciación celular de las diversas líneas hematopoyéticas desde sus precursores. Del precursor mioelide común (CMP) surge el precursor de granulocitos (GMP) del cual surgen los basófilos, eosinófilos y neutrófilos (tomado y modificado de Gabrilovich DI et al.)<sup>4</sup>. Del lado derecho se muestra una recreación de una de las células mioeloides más abundantes del cuerpo humano, el neutrófilo.

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en la sangre y median la primera fase de la respuesta inflamatoria. Su activación conlleva a procesos de captura, fagocitosis y destrucción de partículas o microorganismos entre otros procesos, a los que denominamos procesos efectores. En la mayoría de los casos, esta actividad conduce a las células a la muerte celular programada también conocido como apoptosis.

La maduración de neutrófilos se lleva a cabo en la médula ósea y se puede dividir en 6 estados principales: N1 mieloblastos, N2 promielocitos, N3 mielocitos tempranos, N4 mielocitos y metamielocitos, N5 metamielocitos en banda y N6 neutrófilos segmentados<sup>5</sup>. La médula ósea de un adulto produce alrededor de  $5 \times 10^{10}$  neutrófilos cada día<sup>6</sup>. Una vez en circulación los neutrófilos viven alrededor de 6 a 8 horas, lo cual corresponde a los leucocitos con menor tiempo de vida en el cuerpo humano<sup>7</sup>.

La liberación de neutrófilos a la sangre es controlada y regulada de diferentes maneras. Las quimiocinas controlan el paso de PMNs a la circulación, alistándolas para ser usadas en caso de infección. En una respuesta inflamatoria los neutrófilos migran de la circulación a tejidos infectados, en donde inactivan y fagocitan bacterias, las cuales son eliminadas por enzimas proteolíticas y especies reactivas de oxígeno. El oxígeno se consume por la célula en un proceso metabólico conocido como estallido respiratorio, una de las principales funciones efectoras. Asimismo, los PMNs tienen la capacidad de degranular, liberando proteínas antimicrobianas al medio extracelular<sup>8</sup>.

Los neutrófilos expresan varios receptores en su membrana que participan en la comunicación con otras células y/o el reconocimiento de material extraño. Por ejemplo, los receptores tipo Toll (TLRs) permiten a las células detectar moléculas que sugieran un proceso inusual en el organismo. El TLR2 detecta peptidoglucano de bacterias Gram positivas, mientras que el TLR4 detecta el lipopolisacárido (LPS) presente en las paredes de bacterias Gram negativas. Además de los TLRs, hay muchos otros receptores de reconocimiento en la superficie celular. En las siguientes Tablas (Tablas 1- 7) se muestran algunas moléculas que están presentes en la superficie de los neutrófilos.

**Principales Receptores de Quimiocinas en neutrófilos**

Receptor	Ligando	Principal Productor del ligando	Efecto
CXCR1 CXCR2	CXCL8 (IL-8)	Macrófagos Monocitos Queratinocitos Células Dendríticas Células Endoteliales Fibroblastos	Respuesta inflamatoria local. Quimioatrayente; activa y degranula Neutrófilos.
CXCR2	CXCL7 (PBP, $\beta$ - TG, NAP- 2)	Plaquetas	Activa Neutrófilos.
CXCR2	CXCL1 (GR0 $\alpha$ ) CXCL2 (GR0 $\beta$ ) CXCL3 (GR0 $\gamma$ )	Monocitos Fibroblastos Endotelio	Activa Neutrófilos

*Nota: Las quimiocinas CXC constan de un residuo aminoácido (X) entre dos cisteínas invariables (C) en la región amino terminal. Están codificadas en una agrupación en el cromosoma 17 en los seres humanos.*

**Tabla 1.** Principales receptores de quimiocinas en neutrófilos <sup>9</sup>.

**Receptores de la Inmunidad Innata expresados en neutrófilos**

Receptor	Ligando	Principal Productor del Ligando
<b>Receptores Tipo Toll</b>		
<i>TLR1</i>	Triacil lipopéptidos	Bacterias y Mycobacterium
<i>TLR2</i>	Lipoproteína, lipopéptidos Peptidoglicanos Ácido Lipoteicoico Lipoarabinomanano Glicolípidos Porinas Lipopolisacárido Zymosan Hsp70	Diversos patógenos Bactrias Gram positivas Bacterias Gram positivas Mycobacterium <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria</i> <i>Leptospira interrogans, Porphyromonas gingivalis</i> Hongos Hospedero
<i>TLR4</i>	Lipopolisacárido Taxol Proteína de envoltura Hsp60 Hsp70 Oligosacáridos del ácido hialurónico Fragmentos de policasárido de heparán sulfato Fibrinógeno	Bacterias Gram negativas Plantas Virus del tumor mamario de ratón <i>Chlamydia pneumoniae</i> Hospedero Hospedero Hospedero
<i>TLR5</i>	Flagelina	Bacterias
<i>TLR6</i>	Diacil Lipopéptidos Ácido lipoteicóico Zymosan	Micoplasma Bacteria Gram positivas Hongos
<i>TLR7</i>	Imidazoquinolina Loxoribina Bropirimina RNA de una hebra	Compuesto sintético Compuesto sintético Compuesto sintético Virus
<i>TLR8</i>	Imidazoquinolina RNA de una hebra	Compuesto sintético Virus
<i>TLR9</i>	DNA con CpG	Virus y Bacterias

Tabla 2 (cont)

<b>Lectinas tipo C</b>		
<i>Dectin-1</i>	Glucanos $\beta$ 1,3	<i>Mycobacterium</i> spp. <i>P. carinii</i> , <i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Penicillium marneffeii</i> , <i>Coccidioides posadasii</i> e <i>Histoplasma capsulatum</i>
<i>Mincle</i>	Manosa $\alpha$ Glicolípidos SAP-130	<i>M. tuberculosis</i> <i>C. albicans</i> , <i>Malassezia</i> spp. Células muertas
<i>MDL-1</i>	ND	ND
<i>Mcl</i>	ND	ND
<i>CLEC-2</i>	Podoplanina (PDPN) Rhodocytin	Células del endotelio linfático, células tumorales, VIH-1 Veneno de serpiente
<b>Receptores tipo NOD</b>		
<i>NOD2</i>	Muramil dipéptido (MDP)	Bacterias
<i>NLRP3</i>	Algunos Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMPs) como ATP	Hospedero
<b>Receptores tipo RIG</b>		
<i>RIG-MDA5I</i>	RNA de doble cadena Tandem CARDs	Virus

**Tabla 2.** Principales receptores de la inmunidad innata presentes en el neutrófilo. Los TLRs son los receptores mejor conocidos de la inmunidad innata y los neutrófilos los expresan todos a excepción del TLR3. Aún se debate la expresión de TLR7<sup>10-13</sup>. ND – no descrito.

### **Moléculas de adhesión (Integrinas) expresadas en neutrófilos**

<i>Receptor</i>	Ligando	Principal Productor	Efecto
$\alpha_L: \beta_1$ (LFA1, CD11a:CD18)	ICAM	Células del endotelio.	Se unen a moléculas de adhesión celular y matriz extracelular. Adherencia fuerte
$\alpha_M: \beta_2$ (CR3, Mac-1, CD11b:CD18)	ICAM-1, iC3b, fibrinógeno		
$\alpha_X: \beta_2$ (CR4, p150.95 CD11c:CD18)	iC3b		
$\alpha_5: \beta_5$ , (CD49d:CD29)	Fibronectina		Unión de monocitos y macrófagos a ECM.

**Tabla 3.** Principales integrinas en la membrana del neutrófilo necesarias para la interacción celular<sup>9</sup>.

### **Receptores para Inmunoglobulinas expresados en neutrófilos**

<i>Receptor</i>	Ligando	Principal Productor	Efecto
<i>FCγRII</i> (CD32) <i>FCγRIIIa</i> (CD16) <i>FCγRIIIb</i> (CD16b) <i>FCγRIV</i>	IgG	Linfocitos B	Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, fagocitosis, estallido respiratorio, expulsión de NETs.

**Tabla 4.** Receptores para la fracción cristalizable de la inmunoglobulina G (FcyRs) presentes en la superficie celular del neutrófilo<sup>9,11</sup>.

**Receptores para moléculas del complemento expresadas constitutivamente en la membrana de neutrófilos**

<i>Receptor</i>	Ligando	Principal Productor	Efecto
<i>C5aR (CD88)</i>	C5a	Producto de la activación del complemento	Quimiotaxis, degranulación y estallido respiratorio (8).

**Tabla 5.** Receptores de reconocimiento de moléculas de complemento presentes en neutrófilos. Los neutrófilos también expresan otros receptores para fragmentos de moléculas del complemento como C1qR, CR1, CR2 y CR4, los cuales son movilizados a la superficie de la célula a través de vesículas después de la activación del neutrófilo<sup>9</sup>.

**Moléculas involucradas en la interacción con Células T CD4<sup>+</sup>**

<i>Receptor</i>	Ligando	Principal Productor	Efecto
<i>IL-17R</i>	IL-17A	Linfocitos Th17	Migración de neutrófilos (6)(7).
<i>IL-17R</i>	IL-17F		
<i>IL-6R</i>	IL-6		
<i>LTβR</i>	Linfotoxina (LT, TNF-β)	Linfocitos Th1	Activación de neutrófilos

**Tabla 6.** Receptores de neutrófilos involucrados en la interacción con linfocitos T. El TNF-β es liberado por las células T para activar la respuesta fagocítica, así como para inducir la expresión de moléculas de adhesión útiles en el proceso de diapédesis<sup>9,11</sup>.

**Antígenos CD (Por sus siglas en inglés, “cluster of differentiation”) de neutrófilos**

<i>Receptor</i>	Principales células portadoras	Función
<i>CD11a</i> <i>CD11b</i>	Linfocitos, granulocitos	Subunidad $\alpha$ L de la integrina LFA-1 (relacionada con CD18); se une a CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), y CD50 (ICAM-3).
<i>CD13</i>	Células mielomonocíticas	Zinc-metaloproteasa
<i>CD14</i>	Células mielomonocíticas	Receptor para el complejo de lipopolisacárido y proteína de unión a lipopolisacárido (LPS).
<i>CD15</i>	Neutrófilos, eosinófilos, monocitos	Involucrado en diversas funciones de neutrófilos como la interacción célula-célula, fagocitosis, estimula la degranulación y el estallido respiratorio, aunque la función de CD15 aún no está completamente clara.
<i>CD16a</i> <i>CD16b</i>	Neutrófilos, células NK, macrófagos	Componente de baja afinidad del receptor Fc, Fc $\gamma$ RIII, media fagocitosis y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.
<i>CDw17</i>	Neutrófilos, monocitos, plaquetas	Lactosil ceramida, un glucoesfingolípido de superficie celular.
<i>CD43</i>	Leucocitos, excepto células B en reposo	Tiene estructura extendida, puede ser antiadhesivo.
<i>CD66a</i>	Neutrófilos	Miembro de la familia de antígeno carcinoembrionario.
<i>CD66c</i>	Neutrófilos, carcinoma de colon	Miembro de la familia de antígeno carcinoembrionario.
<i>CD66d</i>	Neutrófilos	Miembro de la familia de antígeno carcinoembrionario.



<i>CD68</i>	Neutrófilos, monocitos, macrófagos, basófilos, linfocitos grandes	Se une a oxLDL, fosfatidilserina y células apoptóticas. Su actividad como receptor scavenger aún no es clara.
<i>CD89</i>	Neutrófilos, monocitos, macrófagos, granulocitos	Receptor de IgA
<i>CD92</i>	Neutrófilos, monocitos, plaquetas	Importante para el transporte de colina a través de la membrana para la síntesis de componentes de la membrana celular y el neurotransmisor, acetilcolina.
<i>CD93</i>	Neutrófilos, monocitos, endotelio	Se ha propuesto su participación en fagocitosis y adhesión celular.
<i>CD116</i>	Neutrófilos, monocitos, eosinófilos	Cadena $\alpha$ del receptor de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).
<i>CDw128</i>	Neutrófilos, basófilos, subgrupos de células T	Receptor de IL-8.
<i>CD132</i>	Neutrófilos, linfocitos B y T, células cebadas	Cadena $\gamma$ del receptor de IL-2, subunidad común de receptores de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15.
<i>CD153</i>	Neutrófilos, linfocitos T activados, macrófagos activados, linfocitos B	Ligando para CD30, puede coestimular células T.
<i>CD156a</i>	Neutrófilos, monocitos	Posible implicación en la extravasación de leucocitos.
<i>CD162</i>	Neutrófilos, linfocitos, monocitos	Ligando para CD62P.
<i>CD170</i>	Neutrófilos	Molécula de adherencia. Lectina parecida a Ig de unión a ácido siálico (Sialic acid-binding Ig-like lectin). La cola citoplásmica contiene motivos ITIM.

**Tabla 7.** Se enlistan algunos de los antígenos CD presentes en los neutrófilos. También se mencionan otras células que presentan dicho receptor y su efecto en la célula<sup>9,14</sup>.

Las integrinas de leucocitos que son importantes para la extravasación son LFA-1 (antígeno 1 asociado a la función linfocitaria), también conocida como CD11a:CD18 y el CR3 (receptor del complemento tipo 3), también conocido como CD11b:CD18, ambas presentes en los neutrófilos y cuya interacción con las moléculas de adhesión ICAM regula la llegada de leucocitos a sitios con procesos inflamatorios. Asimismo, algunas citocinas como la IL-1 $\beta$ , IL-6, y TNF- $\alpha$ , también tienen un papel importante para la movilización de los leucocitos polimorfonucleares.

La inflamación requiere que los leucocitos (principalmente neutrófilos, monocitos y linfocitos T) pasen de la circulación a los tejidos inflamados en respuesta a estímulos locales. En la primera fase de interacción de la célula con el endotelio activado intervienen las selectinas, que median una unión reversible, se produce el rodamiento de leucocitos sobre el endotelio activado. En la segunda fase se produce la unión o arresto de los leucocitos al endotelio y la activación de los neutrófilos por el fragmento C5a del complemento, el PAF (factor de activación de plaquetas), y/o la interleucina 8 (IL-8), así como por el péptido fMLP (N-formilmetionil-leucil-fenilalanina). El siguiente paso es la unión firme de la célula al endotelio, intervienen integrinas de la célula que interaccionan con moléculas de adhesión, que pertenecen a la súper familia de las inmunoglobulinas, como ICAM-1 (Molécula 1 de adhesión intracelular) y VCAM (Molécula 1 de adhesión vascular) expresadas en la célula endotelial. La señalización a través de las integrinas participa en los rearrreglos del citoesqueleto que permiten el cambio en la forma de la célula y la diapédesis a través del endotelio hacia el tejido circundante (extravasación).

Los PMNs expresan en su membrana una variada cantidad de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) que participan ampliamente en la defensa del hospedero. Dentro de estos se encuentran los receptores para péptidos formilados<sup>15</sup> que reconocen productos bacterianos y tejido dañado. Otros GPCRs del neutrófilo son algunos receptores para quimiocinas, como el CXCR1, y receptores para IL-8.

Estos receptores activan la migración quimiotáctica, pero también la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la degranulación.

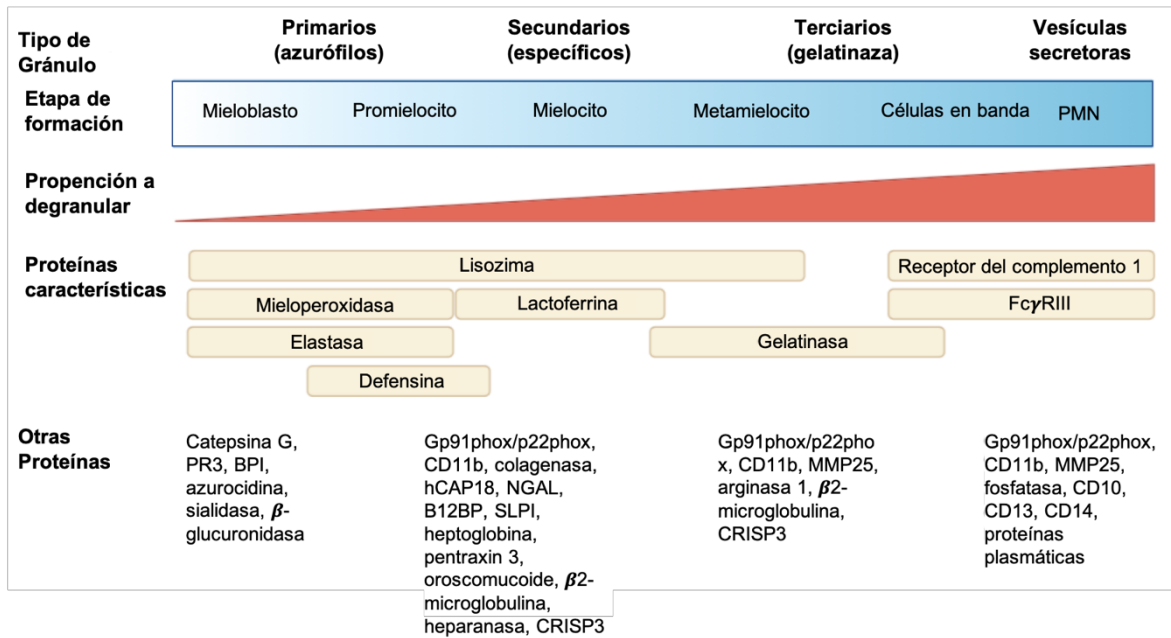
## 4.2 Degranulación

Los neutrófilos transportan una amplia gama de sustancias activas en orgánulos llamados gránulos. Estas son estructuras que participan activamente en casi todas las funciones efectoras de los neutrófilos durante la inflamación.

Existen tres tipos principales de gránulos en los neutrófilos. Los gránulos azurófilos (también conocidos como primarios o positivos a peroxidasa) son los más grandes (0.3  $\mu\text{m}$  de diámetro) y los primeros que se forman durante la maduración del neutrófilo. Éstos contienen mieloperoxidasa (MPO), proteína clave para el estallido respiratorio, así como defensinas, lisozimas, y diversas serina-proteasas como la elastasa de neutrófilo (NE)<sup>16,17</sup>.

Los gránulos específicos (o secundarios) son pequeños (0.1  $\mu\text{m}$  de diámetro) y no contienen MPO, se caracterizan por la presencia de lactoferrina y otros muchos compuestos antimicrobianos como lisozima y lipocalina asociada con la gelatinasa de neutrófilos (NGAL). El tercer tipo de gránulos, los gránulos de gelatinasa (terciarios) no contienen MPO y son más pequeños que los secundarios. Contienen pocas sustancias antimicrobianas, pero sirven de transporte para muchas metaloproteasas como gelatinasa y leucolisina. Estos gránulos son los últimos formados durante la maduración del neutrófilo<sup>7,18</sup>.

Las vesículas secretoras, por su parte, son más pequeñas que los otros gránulos y no contienen enzimas proteolíticas. En su lugar, portan una gama compleja de proteínas asociadas a su membrana, incluyendo distintos receptores de membrana usados en las fases más tempranas de la inflamación mediada por neutrófilos<sup>19</sup>. Las membranas de estas vesículas muestran una amplia expresión de la integrina  $\beta_2$  CD11b/CD18 (Mac-1, CR3), el receptor para complemento 1 (CR 1), receptores para péptidos formilados (fMLP-R), el receptor tipo 3 para la fracción cristalizable de la IgG (Fc $\gamma$ RIII, CD16) y la metaloproteasa leucolisina, entre otras, que son incorporadas a la membrana plasmática después de la exocitosis de dichas vesículas<sup>20</sup>. La movilización de las vesículas secretoras está acompañada por la reducción de L-selectina en la superficie de los neutrófilos. Su exocitosis permite una unión más firme con el endotelio vascular activado<sup>17</sup>.



**Figura 2.** Características y etapas de formación y secreción de los diferentes gránulos del neutrófilo (tomada y modificada de Cazalet C et al.).<sup>7</sup>

### 4.3 Fagocitosis

Un mecanismo de defensa importante en la respuesta innata es la ingestión y destrucción de material particulado extracelular. La fagocitosis es uno de los mecanismos más importantes en la eliminación de patógenos. Es un proceso mediado por receptores de membrana en el que una partícula es internalizada por la célula en una vacuola llamada fagosoma. La activación de la fagocitosis en los neutrófilos puede ser directa a través el reconocimiento de PAMPs por PRRs, o ser indirecta, mediada por opsoninas. La fagocitosis mediada por opsoninas más estudiada es la fagocitosis mediada por anticuerpos de la clase IgG que se unen a receptores para la porción Fc de las cadenas pesadas gamma. Durante este proceso, se generan extensiones de la membrana llamados pseudópodos que forman una copa fagocítica que va englobando la partícula, para finalmente encerrarla por completo en una vacuola. Después de escindir de la membrana citoplásmica para quedar dentro de la célula, la vacuola endocítica (fagosoma) pasa por un proceso de maduración en el que se fusiona con diversos gránulos para formar el fagolisosoma<sup>7</sup>. Estos gránulos contienen enzimas proteolíticas y otras moléculas con actividad antimicrobiana. Simultáneamente se ensambla, sobre la membrana del fagosoma, el complejo enzimático NADPH oxidasa, el cual es

responsable de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Juntos, estos mecanismos crean un microambiente tóxico para la mayoría de los patógenos. Cabe destacar que gran parte de nuestro conocimiento sobre la formación del fagosoma ha sido obtenida de estudios en macrófagos, por lo que el proceso en neutrófilos podría tener diferencias importantes. Una de ellas es el pH del fagosoma: mientras que en el macrófago el fagosoma se va acidificando gradualmente, en neutrófilos el fagosoma es ligeramente alcalino al principio y se mantiene neutro por largos períodos de tiempo<sup>18</sup>.

#### **4.4 Estallido Respiratorio**

Los neutrófilos cuentan con un arsenal basto de mecanismos y moléculas efectoras para defender al cuerpo, lo que los hace una de las principales herramientas de la respuesta inflamatoria. Son parte del grupo de células fagocíticas profesionales que se caracterizan por su eficacia ingiriendo y destruyendo una gran variedad de patógenos. Algunos de estos mecanismos destructivos incluyen especies químicas como enzimas líticas, péptidos antimicrobianos o especies reactivas de oxígeno sumamente oxidantes y que resultan mortales para los microorganismos<sup>7</sup>. Mecanismos tanto oxidativos como no oxidativos contribuyen para una defensa altamente eficaz que complementan la respuesta inmune innata<sup>21</sup>.

La activación de la NADPH oxidasa y la consecuente generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) es también conocida con el nombre de “estallido respiratorio” debido al aumento brusco de la cantidad de oxígeno consumido por la célula. Las ROS son generados por un complejo enzimático llamado Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH) Oxidasa. En este complejo se genera un flujo de electrones a través de 4 proteínas oxidasa (p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, y gp91<sup>phox</sup>) y una GTPasa (Rac1/2) que conforman el núcleo del complejo y que culmina en la catálisis de oxígeno (O<sub>2</sub>) a anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Esta especie química promueve la formación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y ácido hipocloroso (HOCl) a través de la mieloperoxidasa (MPO) del neutrófilo<sup>22,23</sup>. Dichas especies son oxidantes fuertes capaces de reaccionar con una amplia gama de moléculas cuya reactividad oxidante sobre las proteínas del patógeno afecta su función y finalmente lleva a la destrucción de los agentes patógenos dentro del fagosoma. La correcta activación de los neutrófilos puede generar grandes cantidades del anión superóxido por la NADPH oxidasa, que no necesariamente tienen como único fin la formación de ROS. Algunas de estas especies pueden ser requeridas en otro proceso con el que cuenta el neutrófilo conocido como NETosis.

#### **4.5 Trampas extracelulares de Neutrófilos (NETs)**

Hace más de una década, el descubrimiento de las trampas extracelulares de neutrófilos<sup>8</sup> estableció un mecanismo de respuesta inmunológica propio de estas células. La liberación de NETs es parte del proceso de muerte celular programada al que se le llamó NETosis.

Este proceso es una forma de muerte celular única independiente de caspasas, caracterizado por la liberación de cromatina laxa y gránulos propios del neutrófilo al espacio extracelular, aunque se ha visto que otros granulocitos también son capaces de liberar al medio extracelular su material nuclear después de ciertos estímulos.

Al liberar su material genético, la cromatina extracelular funciona inmovilizando a las bacterias para prevenir su dispersión a través de los tejidos del hospedero. La estimulación provocada por los productos bacterianos virulentos provoca inflamación y diversas señales quimiotácticas que resultan en el proceso al que se le denominó NETosis.

El proceso de NETosis puede ser inducido por un número extenso de estímulos que incluyen microorganismos patógenos, plaquetas, patógenos particulados, péptidos formilados, citocinas, entre otros. El primer paso que inicia la cascada de NETosis es la activación de diversos receptores seguida de la activación de la vía Raf/MEK/ERK que finaliza en el ensamblaje del complejo NADPH oxidasa y la producción de especies reactivas de oxígeno.

Este proceso está regulado, entre otras, por la peptidil arginina desiminasa 4 (PAD4). Esta enzima contiene una secuencia putativa de localización nuclear, pero reside principalmente en estructuras citosólicas en neutrófilos en reposo. También puede ingresar al núcleo para citrulinar las histonas y diversos factores de transcripción y, por lo tanto, participar en la regulación epigenética de la expresión de genes y la diferenciación de células<sup>24</sup>.

La PAD4 está asociada a las subunidades citosólicas p47<sup>phox</sup> (también conocida como factor citosólico de neutrófilo 1, NCF1) y p67<sup>phox</sup> (NCF2) que forman parte del complejo responsable del estallido respiratorio (NADPH oxidasa). La activación de la célula resulta en la elevación de calcio intracelular lo que promueve la citrulinación de NCF1 y NCF2 lo que resulta en la rápida disociación de PAD4<sup>24</sup>. Originalmente se reportó que era necesaria la presencia de la NADPH oxidasa y la MPO para la correcta formación de NETs. Hasta hace poco todos los activadores capaces de inducir trampas extracelulares de neutrófilos requerían de alguna manera la presencia de ROS<sup>5</sup>, sin embargo, este ha sido un tema controversial en los últimos

años dado que se han encontrado nuevas rutas de activación de la NETosis que parecen ser independientes de la NADPH oxidasa<sup>25,26</sup>.

La enzima PAD4 citrulina la cromatina, específicamente las histonas, cataliza la desiminación de las argininas en el extremo amino terminal de la subunidad H3, para reducir la atracción de la proteína HP1B de la heterocromatina a la lisina 9 adyacente de la H3 lo cual resulta en la formación de cromatina laxa. Aunado a esto, la proteína elastasa de neutrófilo (NE) y la mieloperoxidasa (MPO) complementan la descompactación de la cromatina. Tanto la NE como la MPO se encuentran almacenadas en gránulos azurófilos que son liberados una vez que se forman ROS en la célula. La NE es una serina proteasa específica de PMNs que degrada factores de virulencia y es bactericida, sin embargo, en este caso, entra en el núcleo y se encarga de cortar las histonas, lo que promueve más descompactación de cromatina<sup>27</sup>. La MPO, por su parte, es una enzima que cataliza la oxidación de haluros por peróxido de hidrógeno. En tiempos tardíos del proceso de NETosis, cuando la NE ya ha actuado, la MPO se une a la cromatina promoviendo aún más descompactación. El proceso sinérgico de estas proteínas para la formación de cromatina laxa alcanza el punto en el que se rompe la membrana nuclear y celular y se liberan las NETs. Resulta interesante que el componente más abundante de las NETs sean histonas, y éstas son uno de los factores antimicrobianos más potentes<sup>28</sup>.

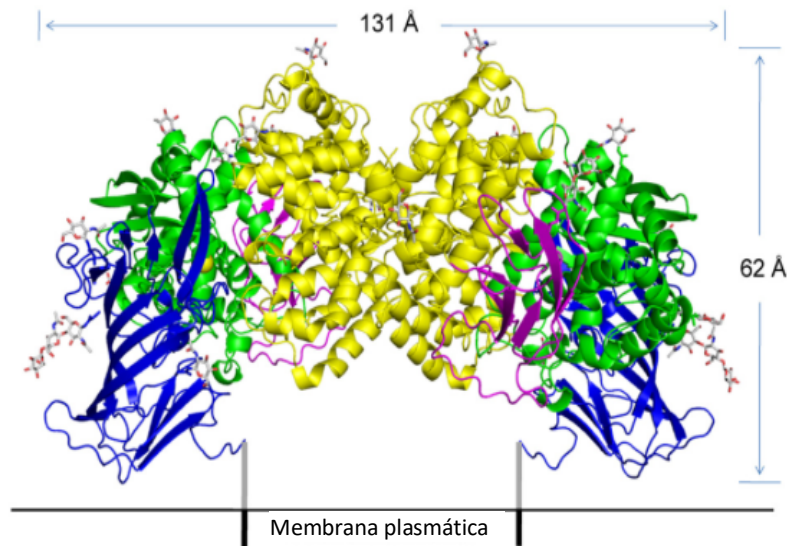
#### **4.6 CD13**

El CD13 o Aminopeptidasa N (APN) es una metaloproteasa dependiente de  $Zn^{2+}$  de 150 KDa que cataliza la eliminación de residuos N terminales de péptidos. También aparece en la superficie de muchas células y tejidos fuera del sistema hematopoyético, incluidos los fibroblastos, el epitelio intestinal, el epitelio tubular renal y las membranas sinápticas del sistema nervioso central<sup>29-31</sup>.

Este receptor está involucrado en una gran cantidad de procesos entre los que se incluyen el procesamiento de hormonas peptídicas, citocinas involucradas en la inflamación y angiogénesis, así como en ciertos procesos de endocitosis<sup>32</sup>. Dentro de las células hematopoyéticas, está presente en progenitores tempranos de granulocitos y monocitos (CFU-GM), en granulocitos y monocitos maduros, células estromales de médula ósea, osteoclastos, una pequeña cantidad de linfocitos granulares grandes y células T y se relaciona como un marcador de células cancerosas<sup>33,34</sup>.

Inicialmente, la Aminopeptidasa N (que fue después identificada como CD13) fue caracterizada como una enzima relacionada con la escisión de aminoácidos específicos N-terminales de oligopéptidos, preferentemente residuos neutrales. Esta función está distribuida en muchos tejidos, por lo que su función puede estar modulada de acuerdo a su localización. Por ejemplo, en las membranas sinápticas del sistema nervioso central, la aminopeptidasa N tiene una actividad primordial en la degradación de encefalina y endorfinas, hidrolizando el enlace Thr-Gly 'N-terminal común a toda una familia de péptidos opioides<sup>34</sup>. En el ámbito médico, la actividad enzimática de la proteína es medida para detectar algunas patologías del hígado. En las células inmunológicas, esta actividad enzimática tiene importancia para la regulación de algunas citocinas. Se sabe, por ejemplo, que la IL-8 es degradada e inactivada por la APN <sup>35</sup>.

En monocitos y macrófagos, CD13 está involucrado en diversas funciones no asociadas a su capacidad enzimática, tales como receptor para procesos relacionados con fagocitosis independientemente del estímulo de otros receptores fagocíticos<sup>1</sup>.



**Figura 3.** Se muestra la cristalografía de la Aminopeptidasa N (APN) de humano. CD13 es una glicoproteína dimérica de membrana con 967 residuos. En la figura se observa el dominio citoplasmático en negro, y los dominios I, II, III y IV en azul, verde, magenta y amarillo, respectivamente (tomado de Wong AHM et al.)<sup>32</sup>.



Aunque la actividad enzimática de CD13 es importante en la regulación de diversos péptidos, presenta ciertas funciones que, al menos habitualmente, no son particulares de otras aminopeptidasas. Algunos investigadores describieron funciones de CD13, bloqueando la capacidad enzimática con ciertos anticuerpos o con inhibidores químicos como la bestatina<sup>2,36</sup>. Atribuyeron a este receptor participación en procesos de migración y agregación homotípica que no son dependientes de la actividad enzimática de la molécula. De alguna manera, CD13 no sólo estaba cumpliendo solamente con su función de Aminopeptidasa reportada anteriormente.

Con el tiempo se describieron diversas funciones de CD13 de monocitos en diversos procesos fisiológicos. En 2005 se estudiaron<sup>2</sup> las respuestas de CD13 induciendo la fagocitosis en monocitos y observaron que ésta glicoproteína de membrana se redistribuye hacia los sitios de contacto antes de la fagocitosis entre eritrocitos opsonizados con IgG y los monocitos. Aunado a esto, la coagregación de CD13 con Fc $\gamma$ RI incrementa la capacidad fagocítica de los monocitos. Esto se asocia a una fosforilación de la cinasa Syk de manera más intensa y prolongada que la observada con el solo entrecruzamiento de Fc $\gamma$ RI.

En 2015 se demostró la capacidad intrínseca de esta glicoproteína de membrana. Observaron que no es necesario entrecruzar un Fc $\gamma$ R para que CD13 pueda promover la fagocitosis<sup>1</sup>. En este trabajo, demostraron que CD13 es una molécula capaz de inducir fagocitosis por si sola entrecruzándola con anticuerpos monoclonales en monocitos. También dirige la fagocitosis de eritrocitos teñidos. Aunado a esto, observaron que la fagocitosis a través de CD13 es mediada por una vía de señalización que involucra las cinasas Syk y PI3K, así como la polimerización de actina, fundamentales en el proceso fagocítico.

Una de las pocas funciones publicadas para CD13 en PMNs es la regulación de la apoptosis inducida por TNF $\alpha$  por medio de la inhibición del receptor para TNF<sup>35 37</sup>. TNF $\alpha$  es uno de los pocos ligandos naturales de neutrófilos capaces de inducir apoptosis. Ellos observaron que la inhibición de la APN con bestatina y actinonina aumenta la capacidad de inducción apoptótica de TNF $\alpha$ . También se llega al mismo efecto si se usa el anticuerpo monoclonal para CD13 WM15, el cuál está estudiado que tiene la capacidad de bloquear la capacidad enzimática de CD13. Además observaron que este efecto es inversamente proporcional a la cantidad de CD13 expresado en la membrana de neutrófilos<sup>37</sup>.

A la luz de las evidencias de la actividad de CD13 como receptor en monocitos, es posible que CD13 pueda servir en neutrófilos como un receptor de la inmunidad innata capaz de mediar funciones efectoras en estas células.

## **5. Planteamiento Del Problema**

La aminopeptidasa N (CD 13) es una proteína de membrana que participa en diversas funciones en diferentes tipos celulares. Recientemente, se ha demostrado su participación en la activación de células mieloides como monocitos, macrófagos y células dendríticas.

Nuestro grupo ha demostrado<sup>1,2,38</sup> que CD13 actúa como un receptor fagocítico primario y que su entrecruzamiento puede modular la fagocitosis mediada por otros receptores. En neutrófilos, la expresión de CD13 se ha comprobado pero no se ha explorado lo suficiente. Las pocas funciones reportadas para CD13 en neutrófilos se relacionan con su actividad de peptidasa, regulando la actividad de IL-8 y TNF. Con los resultados mencionados se puede sugerir que CD13 puede funcionar como receptor capaz de mediar funciones efectoras de neutrófilos.

## **6. Hipótesis**

La glicoproteína de membrana CD13 (APN), expresada en la membrana de neutrófilos, es un receptor de la inmunidad innata capaz de mediar funciones efectoras como la agregación homotípica o la NETosis.

## 7. Objetivos

- Determinar si CD13 es capaz de mediar funciones efectoras en neutrófilos humanos.

### 7.1 Objetivos particulares

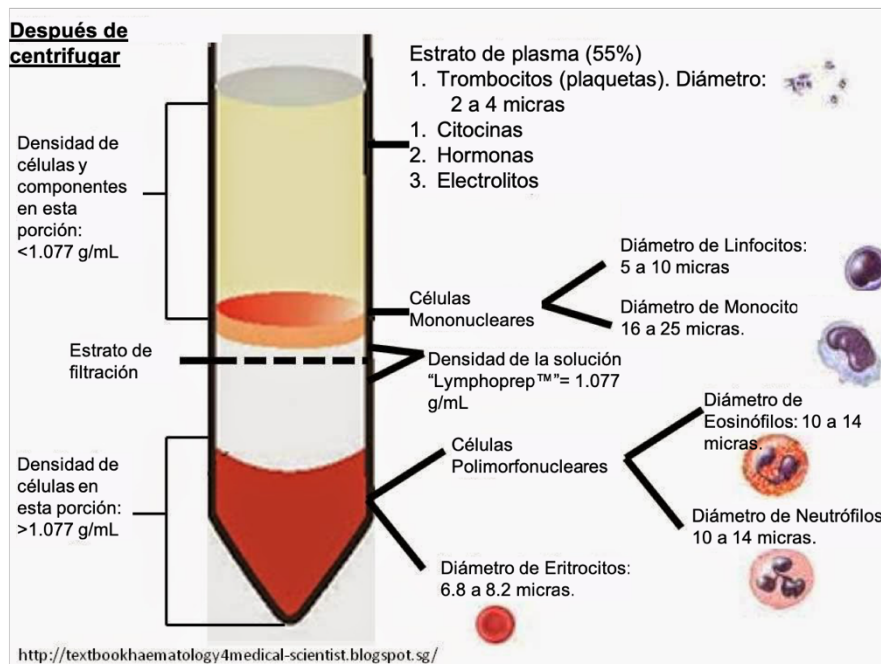
- Determinar la expresión de CD13 en la membrana de neutrófilos humanos antes y después de los estímulos PMA, fMLP e IL-8.
- Determinar si la activación de neutrófilos humanos inducida por PMA, fMLP e IL-8, induce cambios en la expresión de CD13 en la membrana de las células.
- Determinar si el entrecruzamiento de CD13 induce la agregación homotípica de neutrófilos humanos.
- Determinar la activación de los PMNs por el entrecruzamiento de CD13 con los estímulos PMA, fMLP e IL-8 determinando el aumento de la expresión de CD11b en la membrana.
- Determinar si el proceso de NETosis es modificado por el entrecruzamiento de CD13.
- Determinar si el entrecruzamiento de CD13 afecta el proceso de NETosis inducida por PMA, fMLP e IL-8.

## 8. Materiales y Métodos

### 8.1 Purificación de neutrófilos humanos

La purificación de neutrófilos humanos se realizó a partir de sangre periférica de individuos sanos. Se realizó una punción venosa y la sangre (10 mL) se colectó en tubos BD Vacutainer® con Heparina de Litio / Sodio de 10mL (158USP).

El método de purificación se basa en la separación de las células por gradientes de densidad en dos pasos. La sangre colectada se colocó en un tubo cónico de 15mL con 2mL de solución de Dextrán al 6% en PBS. Se dejó sedimentar el paquete de eritrocitos por 45 min a temperatura ambiente. Al terminar este tiempo se tomó el plasma y se colocó en un tubo cónico de 15 ml con 5 mL de Lymphoprep™: Diatrizoato de sodio (1.077 g/mL) a 4°C. El procedimiento se realizó cuidadosamente para lograr estratificar el plasma en la parte superior. Se centrifugó por 20 min a 1600 rpm a 4 °C. La separación se consigue haciendo sedimentar las células en un gradiente de densidad en donde las células descienden hasta alcanzar aquella posición en la que su densidad iguala a la del medio.



**Figura 4.** Separación de las células por densidad en un gradiente de Lymphoprep™: Diatrizoato de sodio (1.077 g/mL). Se forman dos fases delimitadas por la separación del plasma sanguíneo (superior) y el Lymphoprep™ (inferior). Después de la centrifugación los neutrófilos, cuya densidad es mayor a 1.077 g/mL, se ubican al fondo del gradiente. (tomado de <http://textbookhaematology4medical-scientist.blogspot.sg/>).

Se eliminó todo el sobrenadante dejando el botón que se formó en el fondo del tubo y se descompactó el botón formado. Las células del botón se resuspendieron en 10mL de una solución hipotónica (0.2% de NaCl) suplementada con BSA 1%. Después de exactamente 1 min se agregó 10 mL de solución hipertónica (1.2% de NaCl) suplementada con BSA 1%. El tubo se centrifugó por 5 min a 1200 rpm, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 10mL solución de Hanks a 4°C.

## 8.2 Conteo celular

En cada purificación se realizó un conteo celular con dos objetivos principales: cuantificar las células obtenidas y evaluar la viabilidad celular después de la purificación. El conteo se realizó en cámara de Neubauer tomando 2  $\mu$ L de la suspensión final de PMN que se diluyen en 18  $\mu$ L de azul de tripano (dilución 1:10). En el microscopio óptico se hizo el conteo en los cuatro espacios correspondientes para leucocitos. Las células con el núcleo teñido de azul se consideran no viables. Solamente se realizan experimentos cuando la población celular tiene una viabilidad mayor al 95%. Por su parte se evaluó de manera cualitativa la población de neutrófilos tomando en cuenta la forma, tamaño uniforme y sin indicaciones de activación.

## 8.3 Estímulos

Los estímulos usados en los experimentos fueron los siguientes:

- Interleucina 8 (IL-8, 72 a.a., Recombinant Human Interleukin 8; Peprotech). Alícuota reconstituida en solución HBSS sin  $\text{Ca}^{+2}$  ni  $\text{Mg}^{+2}$ , [10  $\mu$ g/mL].
- Forbol-12-Miristato-13-Acetato (PMA; synthetic,  $\geq 98.0\%$ , Sigma). Alícuota en solución HBSS sin  $\text{Ca}^{+2}$  ni  $\text{Mg}^{+2}$  / 0.1% DMSO, [1  $\mu$ M].
- N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP;  $\geq 97\%$ , Sigma) Alícuota en solución HBSS sin  $\text{Ca}^{+2}$  ni  $\text{Mg}^{+2}$  1:10, [10  $\mu$ M]

Las incubaciones de las células con los estímulos fueron realizadas a 37°C en una incubadora con 5% de  $\text{CO}_2$  por los tiempos indicados dependiendo el ensayo.

#### **8.4 Citometría de flujo**

La evaluación de la expresión en membrana de marcadores como CD13 o CD11b se realizó mediante tinciones específicas con anticuerpos monoclonales (mAbs) conjugados con diversos fluorocromos. CD13 se monitoreó haciendo una tinción primaria con un mAb de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Alícuotas de  $2 \times 10^5$  células se lavaron dos veces con buffer de FACS en placas flexibles de 96 pozos. Luego se incubaron con el anticuerpo conjugado (a una dilución de 1:100) por 30 min con agitación ocasional y cubiertos de la luz. Pasado este tiempo, se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 1% durante 30 min. Por último, se leyeron las muestras en el citómetro de flujo (Attune® Acoustic Focusing Cytometer Blue/Violet: 488 nm (20 mW) y 405 nm (50 mW) laser y Attune NxT Flow Cytometer), pertenecientes al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo (LABNALCIT).

#### **8.5 Agregación homotípica**

Se usaron placas Corning de 96 pozos de fondo plano. Se usaron dos pozos, cada uno con 100,000 células en 100  $\mu$ L de medio RPMI suplementado con 2% de SFB. Como control positivo se usaron monocitos humanos de la línea U937. De la misma manera se usaron dos pozos, cada uno con 100,000 células en 100  $\mu$ L de medio RPMI con 2% de SFB. Luego, a un pozo con neutrófilos y a uno con monocitos se les agregó el anticuerpo específico para CD13 (mAb 452) a una concentración final de 5  $\mu$ g/mL. El experimento fue realizado en dos placas con las mismas condiciones, una de las placas fue incubada a 37°C y la otra fue incubada a 4°C, por 3 horas. Trascurrido este tiempo, los pozos fueron observados en un microscopio de campo claro con el objetivo de 10x para evaluar la formación de agregados de células (agregación homotípica).

## 8.6 Cinética de formación de NETs.

Estas estructuras se pueden cuantificar de diferentes maneras, por ejemplo, midiendo la cantidad de DNA liberado al medio o mediante microscopía de fluorescencia. Medir directamente la cantidad de DNA liberado al medio extracelular no discrimina entre el material genético liberado por NETosis y el material genético liberado por otras formas de muerte celular. Por otro lado, la microscopía de fluorescencia está sujeta al análisis subjetivo de cada prueba. Por ende nosotros realizamos ambos; por un lado las cinéticas miden cuantitativamente la liberación de material genético y por otro las inmunofluorescencias comprueban que dicho material genético fue liberado por un proceso de NETosis.

Estos ensayos se realizaron con células incubadas en medio RPMI suplementado con 2% de SFB y SYTOX® Green (InvitroGen™) a una concentración final de 500nM. El SYTOX® Green es una molécula fluorescente con longitudes de onda de excitación y de emisión de 485 y 528nm respectivamente. Cuando el SYTOX Green se encuentra unido a DNA, su fluorescencia aumenta más de 500 veces. Estas características permiten incubar a la célula en el medio con el colorante y aunque este sea excitado por el equipo, no emitirá fluorescencia a menos que esté unido a ADN. El punto específico de unión de SYTOX Green al ADN es aún desconocido. Los estudios más recientes hacen sospechar que se inserta en el surco menor de la hélice. Este colorante tiene dos grandes cualidades: la primera es su incapacidad para atravesar la membrana celular de una célula viable, pero cuando existe muerte celular o la membrana celular se ve comprometida, el colorante entra y puede teñir el material genético de la célula. La segunda es que sólo fluoresce cuando se encuentra unido al ADN.

Para los ensayos se sembraron 100,000 neutrófilos purificados de sangre periférica por triplicado en una placa de 96 pozos con fondo plano (Corning®). Con cada ensayo se lee un blanco por triplicado. El blanco consta de medio RPMI con SFB al 2% - Sytox Green 500nM. Tomando en cuenta que la fluorescencia del Sytox es indetectable a menos que esté unido al ADN, el control negativo marca la validez del experimento; si la fluorescencia en estas células aumenta con el paso del tiempo, entonces el experimento se descarta pues habla de una activación generada por un elemento externo a los estímulos.

Se probó el entrecruzamiento con los fragmentos Fab 452 o el anticuerpo completo mAb 452 sin estímulos o con los activadores PMA, fMLP o IL8. Así como los controles para cada experimento (células sin entrecruzar): Control Negativo, PMA [20nM], fMLP [10 µM] o IL-8 [10 ng/mL] y DMSO. En el caso de usar los fragmentos Fab 452, se completó el entrecruzamiento a CD13 con 10 µg de los fragmentos secundarios GαM F(ab)<sub>2</sub>. Una vez diseñado el experimento y preparada la placa se

deja reposar en obscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de la lectura. y por último se tomaron lecturas de fluorescencia cada 15 min durante 4 horas.

El equipo utilizado para evaluar la fluorescencia del Sytox Green fue el Cytation™ 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader de BioTek.

### **8.7 Inmunofluorescencia (Determinación de NETs por microscopía)**

Se utilizaron 16 cubreobjetos circulares de 13 mm de diámetro, grosor no. 1 marca Heathrow Scientific, LLC. El procedimiento para la formación de NETs se realizó igual al descrito anteriormente usando  $2 \times 10^5$  células por cubre objeto con 100  $\mu$ L de medio RPMI sin Sytox Green. Cada cubreobjetos se asignó a una condición distinta; entrecruzamiento de Fab452, de mAb452 y las combinaciones con los estímulos PMA, fMLP e IL8.

Después de la incubación se retiró el medio RPMI y se fijaron las células con PFA 4% en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. Pasando este tiempo se lavaron 3 veces con PBS frío y se permean las células con Triton x-100 0.2% por 5 minutos y se vuelve a lavar 3 veces con PBS frío.

Después se incuban con buffer de bloqueo durante 30 minutos a 37°C, posteriormente se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario diluido 1:200 para mieloperoxidasa (MPO, ) o elastasa de neutrófilo (NE, abcam; ab68672) en buffer PBS-Tween20-BSA 1%. Finalizado este tiempo se lavaron 3 veces con PBS frío y se incubó con el anticuerpo secundario (Invitrogen; Fit-C No. 62-6511 para la NE y Alexa Fluor® 594; ab150080 para la MPO) con las mismas condiciones y se lavó 3 veces con PBS frío.

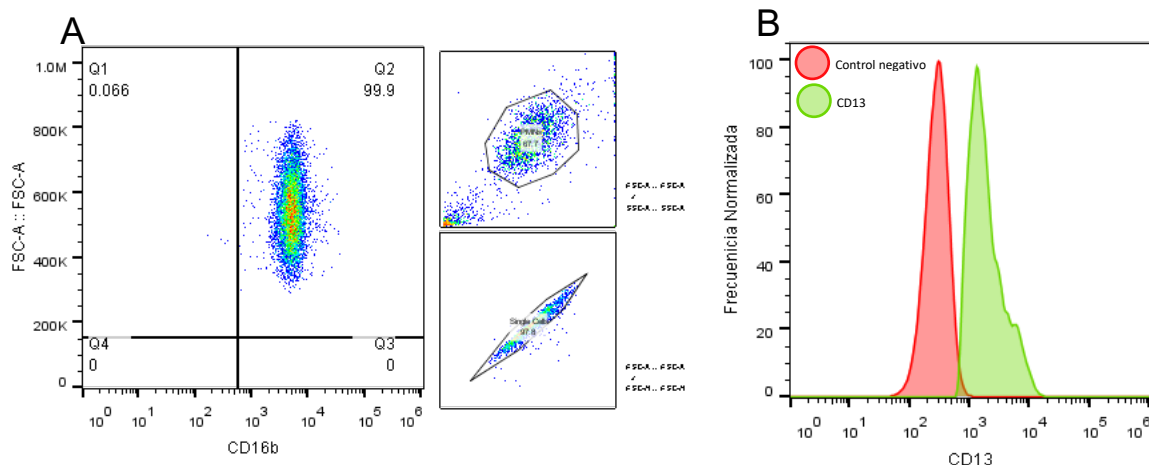
Por último, se incubó con DAPI diluido 1:1000 n PBS y se incubó por 15 minutos en obscuridad. Se lavó 3 veces con PBS frío y se montaron los cubreobjetos con Fluoroshield almacenando a 4°C hasta su observación en el microscopio.



## 9. Resultados

### 9.1 Identificación de neutrófilos y presencia de CD13 y CD11b.

Como primer punto importante se determinó la expresión de CD13 en neutrófilos. El nivel de expresión de CD13 en las células se determinó con anticuerpos monoclonales mediante citometría de flujo asegurando que las células purificadas fueran todas neutrófilos. Esto lo logramos tiñendo el CD16b por citometría de flujo.



**Figura 5.** Expresión de marcadores de Neutrófilos. A) Diagrama de puntos que muestra la pureza de la muestra, dada por la expresión del marcador de membrana CD16b (único en PMNs). B) Muestra un histograma representativo de la expresión basal de CD13 en membrana. Se observa que la fluorescencia aumenta (verde) respecto al control sin teñir (rojo).

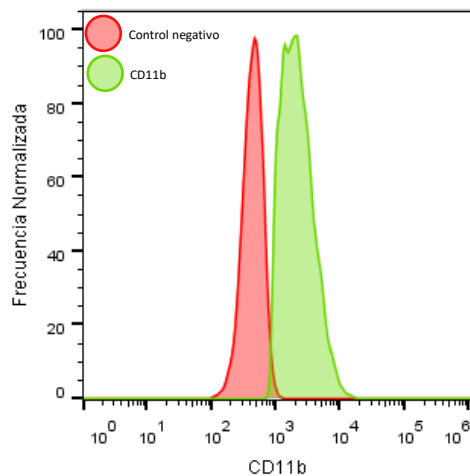
CD16 es un receptor Fc, específicamente FcγRIIIb y solamente es expresado en membrana en los neutrófilos<sup>39</sup>. Como se puede observar en la figura 5, el 99.9% de las células son positivas a este marcador con lo que podemos asegurar que son PMNs.

CD13 ha sido ampliamente estudiado en otras células como monocitos, sin embargo hay muy poco referente a neutrófilos. Ya en diversas publicaciones se demuestra la presencia de CD13 en la membrana de neutrófilos, sin embargo, es importante poder reproducir esto en nuestros experimentos para tener un punto de partida. La figura 5 demuestra la presencia del marcador CD13 en casi la totalidad de las células como ya se había demostrado antes<sup>40,41</sup>. El X% de las células muestra expresión de CD13 en una población de 10,000 unidades. El histograma por su parte nos muestra la fluorescencia emitida por los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a CD13; se observa el aumento de fluorescencia comparado con el control sin teñir.

Los neutrófilos tienen en su haber diferentes formas de activación celular como parte de su función protectora ante antígenos. La mayoría de estas funciones son ocasionadas por proteínas específicas que provocan cambios en la células. La mayoría de investigaciones en fisiología celular relacionan un cambio en el metabolismo con la interacción de diversas proteínas, por ejemplo, proteínas de membrana. Los receptores celulares provocan una cascada de señalizaciones cuyo objetivo es ocasionar la activación de los neutrófilos y, en muchas ocasiones, autorregulando y modificando la expresión de sí mismos; por lo que tiene sentido preguntarse: Si CD13 es un receptor que media funciones celulares, ¿La activación de los neutrófilos cambia la expresión de CD13 en membrana?

Como pudimos observar en las tablas del capítulo 3.1, existen un gran número de receptores en la superficie de los neutrófilos. Todos ellos son capaces de activar a la célula de manera independiente o en conjunto con otros, sin embargo, existen algunos que son distintivos de los PMNs ya sea porque son únicos como el FcγRIIIb (CD16b)<sup>42</sup> o porque les permiten funciones características de la línea celular como es el caso de CD11b.

Nosotros usamos este receptor como marcador de activación de PMNs. De tal suerte que el aumento de este nos indicó la activación de las células después de cierto tratamiento. Por supuesto también comprobamos la presencia y los niveles de expresión de CD11b y cómo se comporta al ser activada la célula (Figura 6).



**Figura 6.** Muestra un histograma representativo de la expresión basal de CD11b. Se puede observar el aumento de fluorescencia (verde) comparado con el control sin teñir (rojo).

CD11b es una molécula muy importante en los PMNs ya que está involucrada con procesos de adhesión<sup>43</sup>. Sus cambios en la expresión de membrana son regulados de acuerdo a la activación de la célula debido a su implicación en procesos de migración<sup>40,41</sup>.

Se sabe que CD13 desencadena diferentes procesos de activación en monocitos por sí solo<sup>1</sup>, sin embargo en PMNs no se sabe si podría. Del mismo modo es bien sabido que los PMNs responden a diversos estímulos que aseguran su activación. Es por esto que decidimos no sólo comparar el efecto en la célula estimulando a CD13, si no también comprobar si este receptor podría tener un efecto sinérgico.

## **9.2 Efecto de los estímulos PMA, fMLP e IL8 sobre la expresión membranal de CD13 y CD11b.**

Los neutrófilos tienen una capacidad de respuesta muy variada y, siendo la primera línea de defensa contra antígenos, reúnen una serie de receptores importantes para realizar sus funciones. Una de las quimiocinas más importantes es la IL8, que está involucrada en procesos de migración a través del receptor CXCL1/2<sup>44</sup> y se sabe que CD13 puede regular su actividad<sup>35</sup>.

Por otro lado se encuentran los péptidos formilados: moléculas que median muchos procesos inflamatorios y, cuyo receptor fMLP-R, reconoce aquellos péptidos iniciados con un grupo funcional formilo característico de la traducción de proteínas de las bacterias. Hoy en día existe la molécula sintética fMLP que se une directamente a este receptor sin necesidad de usar bacterias que puedan generar respuestas inespecíficas.

Por último está la molécula PMA. Siendo una molécula que no se encuentra en el cuerpo no se tiene un receptor característico para esta. Sin embargo funciona como un análogo de diacil glicerol (DAG) que activa directamente a la PKC iniciando un proceso de activación celular. Esta molécula ha sido usada en muchos estudios como control positivo para asegurar la activación de diversos tipos celulares<sup>8,26,28,45</sup>.

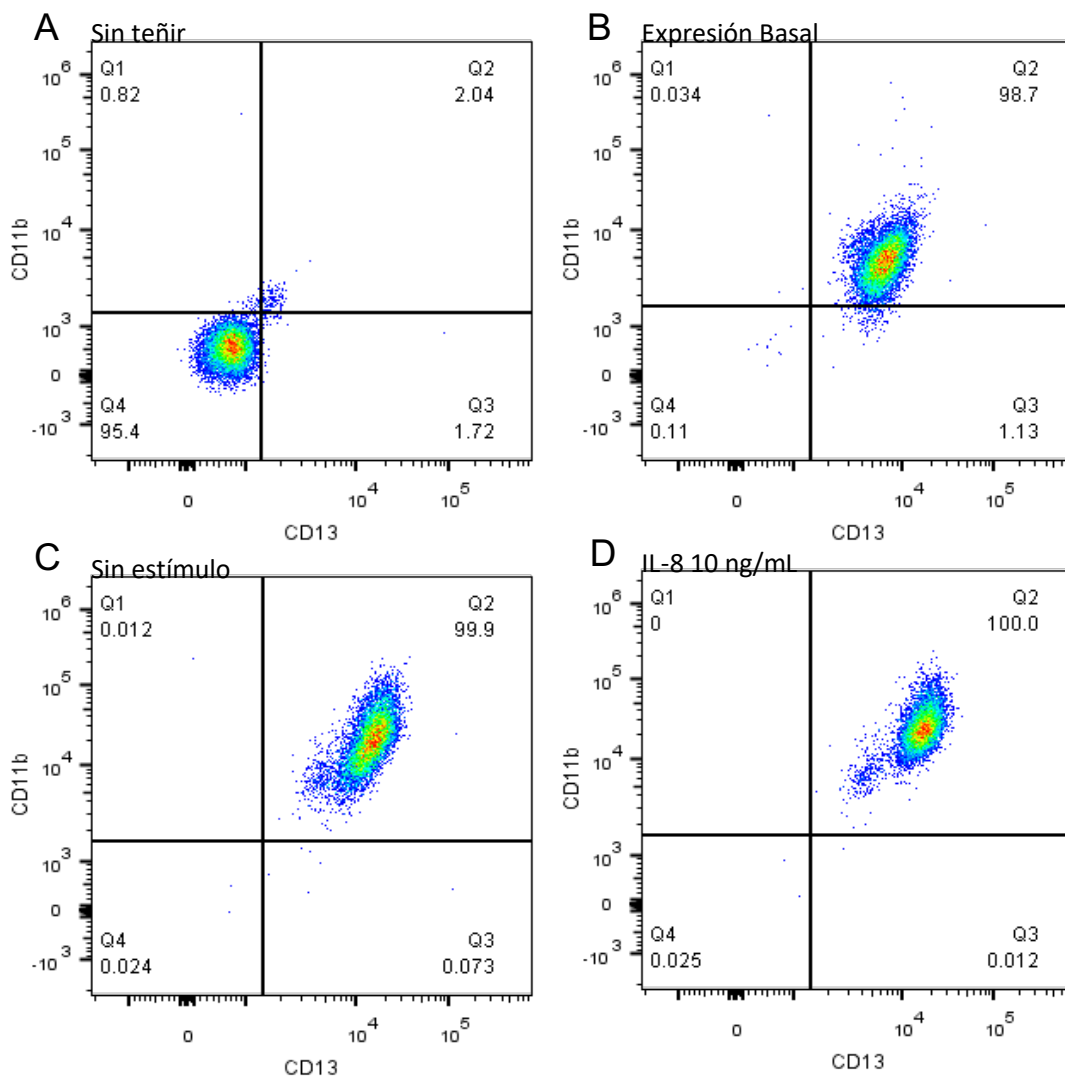
En las siguientes figuras (7-12), se muestran como los marcadores CD13 y CD11b cambian por la respuesta de las células a estos estímulos.

## **9.3 Activación con Interleucina 8 (IL-8)**

La IL-8 es una de las principales interleucinas con acciones sobre los neutrófilos. A través de sus receptores CXCR1/2 en PMNs, la IL-8 (CXCL8) regula diversas funciones en el proceso inflamatorio como el reclutamiento, la adhesión y la diapédesis de PMNs. El efecto de la IL-8 en estos procesos ha sido bien estudiado, y se sabe que IL-8 induce la expresión de diversas moléculas de adhesión como CD11b<sup>46</sup>.

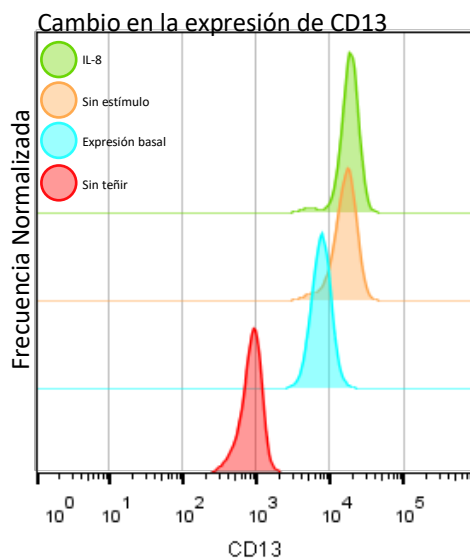
Los cambios en la expresión de CD13 y CD11b en células estimuladas con IL-8 están representados en la figura 7. Las gráficas A y B son de células que se fijaron inmediatamente después de ser purificadas. La figura C y D son de células que se incubaron durante una hora a 37°C.

En la figura D se estimularon a los neutrófilos con 10 ng/mL de IL-8, esto resultó en el aumento de la expresión de CD13 y CD11b comparado con las células de la figura B.



**Figura 7.** Tinción de CD13 y CD11b de membrana. A) Células sin teñir. B) Células doble positivo para CD13 y CD11b teñidas inmediatamente después de purificarlas. C) Células doble positivas incubadas durante 1 hora a 37°C (sin estímulo). D) Células doble positivas activadas con IL-8 10 ng/mL durante 1 hora incubados a 37°C.

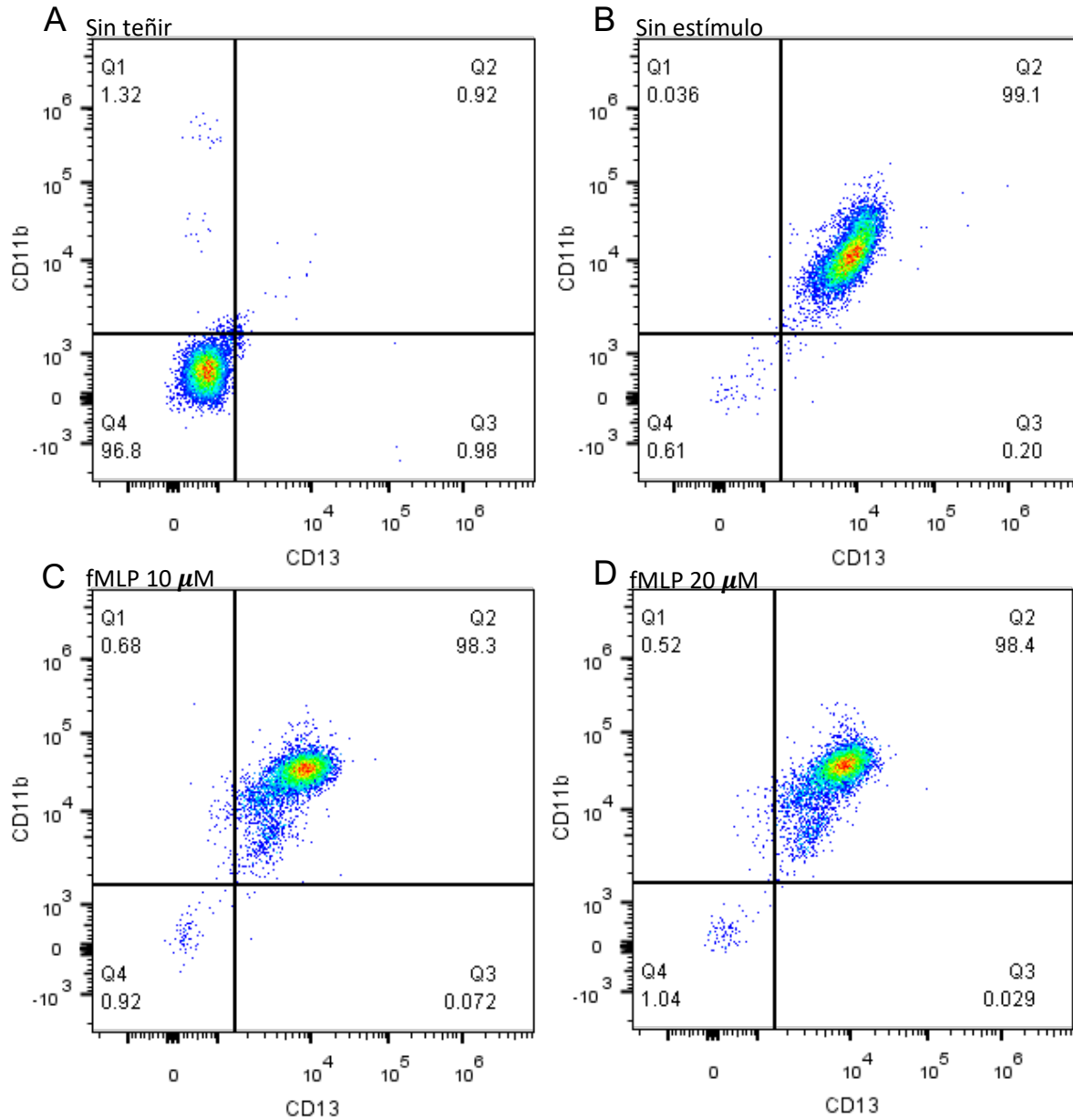
Los histogramas de las Figura 8 muestran con más claridad el aumento de la expresión de CD13 a consecuencia de la incubación a 37°C. La mediana de fluorescencia sin incubación es de 7,170 unidades de fluorescencia (UF). Tras una hora de incubación, esta mediana se elevó hasta 15,411 UF. Por su parte la mediana para la población estimulada con IL-8 fue de 17,429 UF.



**Figura 8.** Los histogramas representan la expresión de CD13 de membrana de PMN estimulados con IL8. El histograma azul representa la expresión de CD13 en células sin incubación, es decir, en seguida de la purificación. El histograma anaranjado representa células que han sido incubadas por 1 hora sin el estímulo (IL-8). Por su parte, el histograma verde representa células incubadas 1 hora a 37°C con el estímulo IL-8.

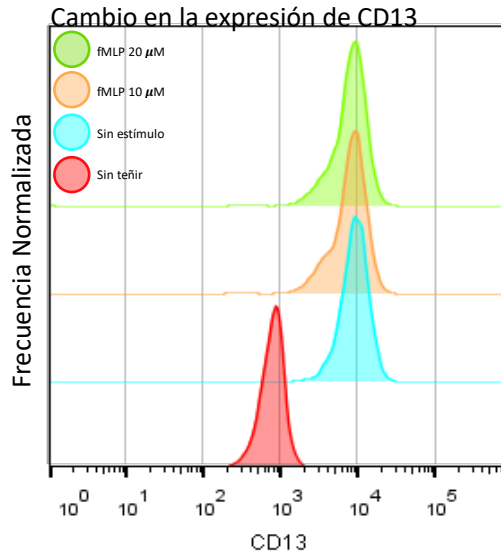
#### 9.4 Activación con N-formil-Met-Leu-Phe (fMLP).

Una cualidad de los PMNs es su capacidad de reconocer péptidos formilados provenientes de la síntesis proteica de procariontes y mitocondrias, uno de los tantos PAMPs que son capaces de reconocer a través de sus PRRs. Determinamos si la activación celular con el péptido formilado fMLP induce cambios en la expresión de CD13. La figura 7 muestra los diagramas de puntos que representan el cambio en la expresión de CD11b y CD13 tras el estímulo. En contraste con la activación celular usando PMA, el estímulo con fMLP no tiene un efecto visual grande sobre la expresión de CD13.



**Figura 9.** Expresión de CD13 y CD11b en membrana de PMNs humanos estimulados con fMLP. A) Células sin teñir. B) Células sin estímulo. C) Células estimuladas con fMLP 10  $\mu$ M durante 1 hora a 37°C. D) Células estimuladas con fMLP 20  $\mu$ M durante 1 hora a 37°C.

Como se observa en la figura 9 el estímulo con fMLP no induce un cambio significativo en la expresión de CD13. Por su parte, la expresión de CD11b (control positivo) si aumentó después de la estimulación con fMLP por una hora.

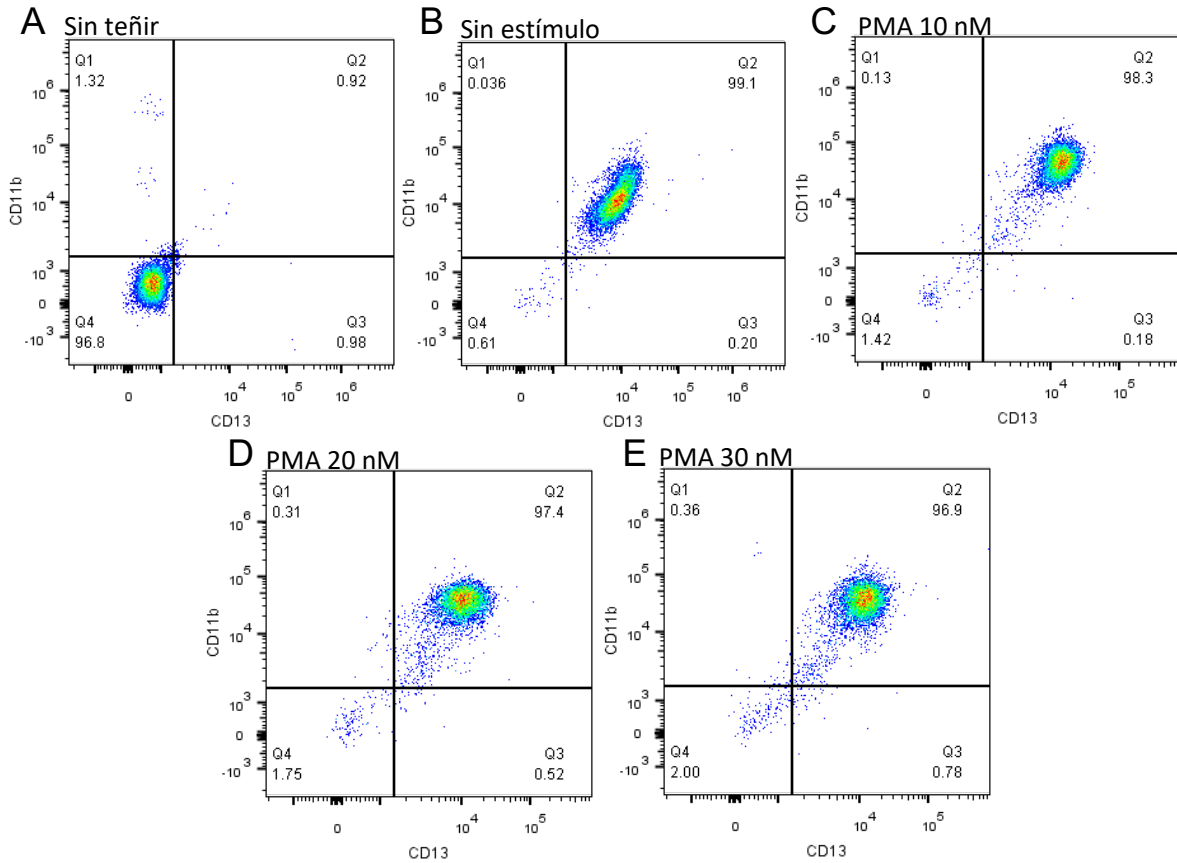


**Figura 10.** Histograma representativo del cambio de la expresión de CD13 en membrana de neutrófilos estimulados con fMLP. Los histogramas de color anaranjado y verde muestran la fluorescencia de células tratadas con concentraciones crecientes de fMLP (10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M respectivamente). El histograma rojo es el control sin teñir, mientras que el histograma azul muestra la fluorescencia de las células sin estímulo teñidas con anti-CD13.

En la figura 10, se muestran los histogramas de la expresión de CD13 en las células tratadas con fMLP. La muestra sin estímulo tiene una media de 8,684, el fMLP1 de 8,380 y fMLP2 de 8,105 mostrando que no hay diferencia en la expresión de CD13.

### 9.5 Activación con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA).

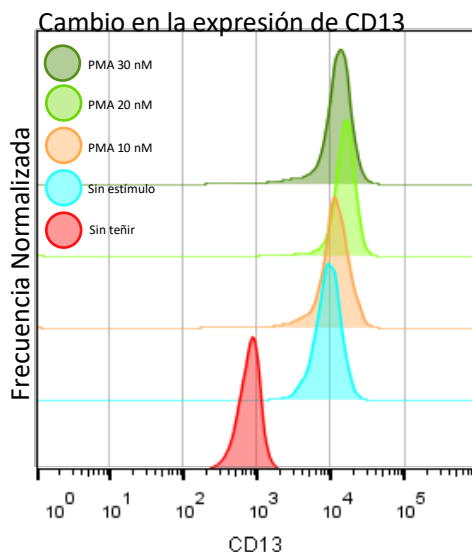
La activación de PMN's con PMA es ampliamente usada y es el control positivo para activación más común en la mayoría de las publicaciones. En los diagramas de puntos de la figura x se muestra la expresión de los marcadores CD13 y CD11b en neutrófilos humanos no estimulados (B) o estimulados con concentraciones crecientes de PMA (10, 20 y 30nM) (C-E). El diagrama A muestra el control negativo sin teñir.



**Figura 11.** Expresión de CD13 y CD11b en la membrana de PMNs humanos. A) Células sin teñir. B) Células no estimuladas teñidas con anticuerpos anti-CD13 y anti-CD11b. C) Células activadas con PMA 10nM durante 1 hora a 37°C y teñidas con anticuerpos anti-CD13 y anti-CD11b. D) Células activadas con PMA 20nM durante 1 hora a 37°C. E) Células activadas con PMA 30nM durante 1 hora a 37°C.

Se observa que el tratamiento con PMA (Figura 11) indujo un aumento en la expresión de CD11b en comparación con la muestra sin estímulo. También hay una modificación en la expresión de CD13, cuyo cambio se aprecia mejor en el histograma de la figura y. Para CD13, las células sin estímulo presentan una mediana de 8,684 UF, con 10nM de PMA la mediana es 10,095 UF, con 20nM de 14,684 UF, y con 30nM de 12,338 UF.



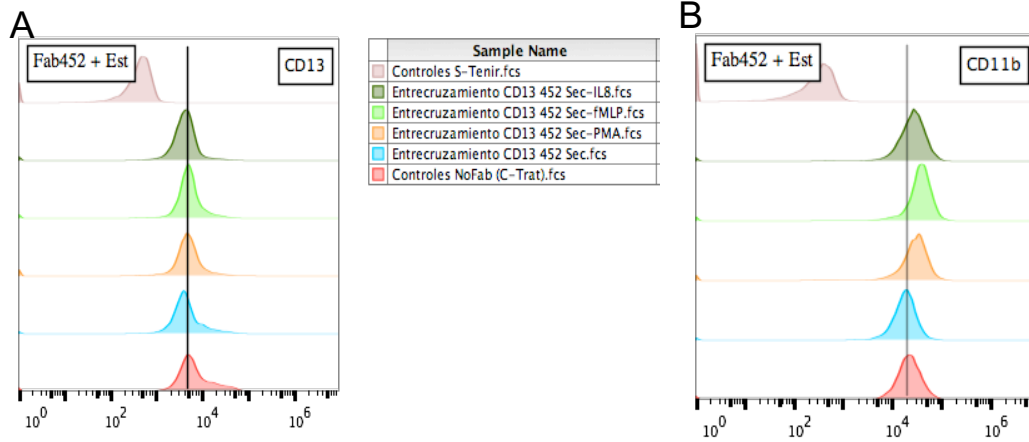


**Figura 12.** Histograma representativo del cambio en la expresión de CD13 en membrana de PMNs estimulados con PMA. Los histogramas de color anaranjado, verde claro y verde fuerte representan la intensidad de fluorescencia dada por la tinción de CD13 en membrana con concentraciones crecientes de PMA (10, 20 y 30nM respectivamente). El histograma de color rojo representa la fluorescencia de células sin teñir y el azul la fluorescencia emitida por la tinción de CD13 en neutrófilos sin estímulo.

### 9.6 Efecto del entrecruzamiento de CD13 en la activación de PMNs.

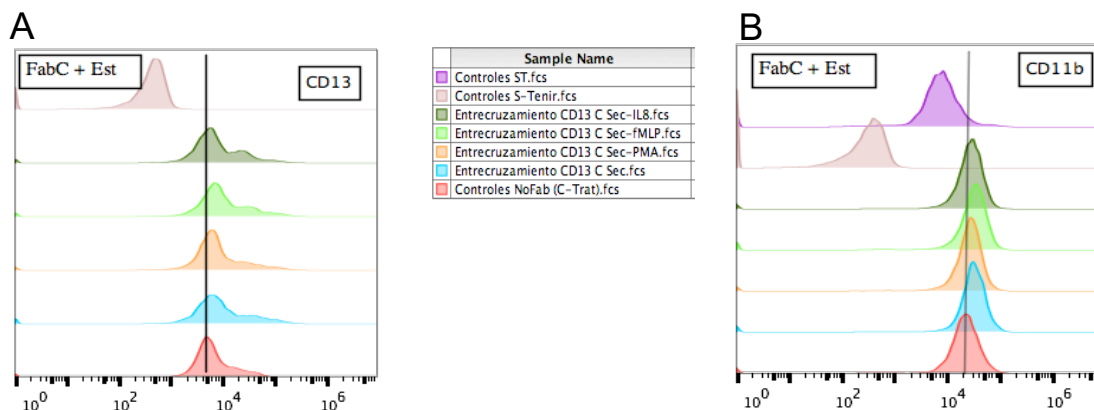
Determinamos ahora si CD13 es capaz de inducir la activación de PMNs, entrecruzamos CD13 con anticuerpos monoclonales y medimos el nivel de expresión tanto de CD13 como de CD11b. Al mismo tiempo, los activamos con los tres distintos estímulos: forbol-miristato-acetato (PMA), el péptido quimiotáctico para neutrófilos fMLP, e interleucina 8 (IL-8). Como control de la activación de las células, monitoreamos la expresión de CD11b en la membrana marcándolo con un anticuerpo monoclonal conjugado a un fluorocromo.

En los histogramas de las figuras 16 y 17 se muestran experimentos representativos de la expresión de CD13 y CD11b después estimular CD13 con fragmentos Fab de anticuerpos anti-CD13 452 (Fab 452) y entrecruzando con fragmentos  $F(ab')_2$  de un anticuerpo secundario (Goat anti-mouse IgG), después de una hora de incubación con los estímulos. Se determinó que el nivel de expresión en CD13 no cambia, mientras que si se observan cambios en la expresión de CD11b.



**Figura 13.** Histogramas de la fluorescencia dada por la expresión de los marcadores CD13 (A) y CD11b (B), después del entrecruzamiento de CD13 con el anticuerpo Fab452 después de una hora de incubación. El histograma rojo muestra la fluorescencia de las células sin Fab, el histograma azul muestra la fluorescencia de las células entrecruzadas con el Fab 452, mientras que el histograma amarillo, verde claro y verde oscuro muestra células entrecruzadas con Fab 452 y activadas con los estímulos PMA, fMLP e IL-8 respectivamente. El histograma de color rosa muestra la fluorescencia basal de las células (células sin teñir).

Existen diferentes anticuerpos monoclonales para CD13 que se ha visto que se unen en diferentes partes de la estructura<sup>34,38</sup>. En los histogramas de la figura 14 se muestra la expresión de CD13 y CD11b después de ser entrecruzadas, pero esta vez con la fracción cristalizable del anticuerpo para CD13 C (Fab C) y un anticuerpo secundario, midiendo la expresión de CD13 con el mAb 452.

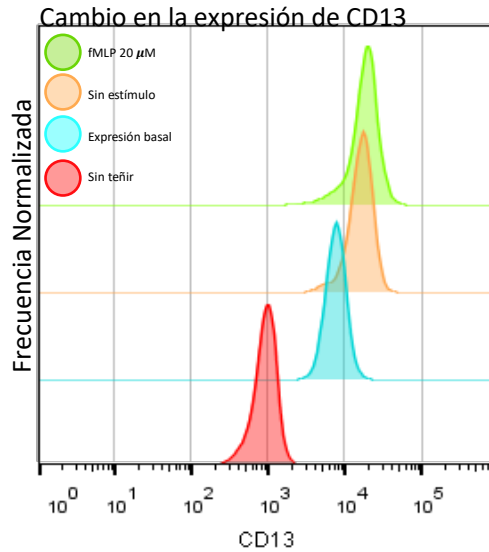


**Figura 14.** Histogramas de la fluorescencia dada por la expresión de los marcadores CD13 (A) y CD11b (B), después del entrecruzamiento de CD13 con el anticuerpo Fab C después de una hora de incubación. El histograma rojo muestra la fluorescencia de las células sin Fab, el histograma azul muestra la fluorescencia de las células entrecruzadas con el Fab C, mientras que los histogramas amarillos, verde claro y verde oscuro muestran células entrecruzadas con Fab C y activadas con los estímulos PMA, fMLP e IL-8 respectivamente. El histograma de color rosa muestra la fluorescencia basal de las células (células sin teñir). En la figura B se observa un histograma más (morado) que representa la expresión de CD11b en células que no sufrieron el tratamiento del experimento, es decir, fueron fijadas y teñidas justo después de la purificación.

En todos los histogramas de la expresión de CD13 en células tratadas con los Fab y los anticuerpos 452 y C se mantienen prácticamente alineados con el control negativo (NoFab; en color rojo), el cual representa células que fueron incubadas durante 60 minutos, pero no se trataron con ningún activador. No así el marcador CD11b, en la figura 14B, cuyo aumento de fluorescencia es observable comparado con la línea de referencia del control sin entrecruzar (histograma rojo). Así pues vemos que, aunque el sólo entrecruzamiento de CD13 (histograma azul de las figuras 16 y 17) no aumenta en gran medida, los otros histogramas tienen un cambio grande.

Es necesario destacar el histograma de color morado de la figura 14B. Este representa una muestra de neutrófilos sin estímulo ni tratamiento, es decir, teñidos después de ser purificados. Es evidente que la expresión de CD11b es menor en estas células.

En nuestros experimentos observamos una gran variabilidad en la respuesta a los estímulos activadores entre células de distintos donadores ya que se ha reportado que los neutrófilos son células sensibles a activarse por las manipulaciones experimentales <sup>26,47</sup>. En la figura 15 se muestran histogramas de la expresión de CD13 en PMNs inmediatamente después de ser purificados, de PMNs incubados por una hora a 37°C en presencia de fMLP, o de PMNs incubados por una hora a 37°C en ausencia de estímulo activador.



**Figura 15.** Histograma que muestra el efecto sobre la expresión de CD13 de la incubación de PMNs por 1 hora a 37°C. El histograma azul representa la tinción de CD13 con células sin haber sido incubadas, es decir, directamente después de la purificación. El histograma de color anaranjado representa células que han sido incubadas sin haberlas estimulado con fMLP. El histograma verde representa la expresión en membrana de CD13 en neutrófilos después de una hora de incubación con fMLP.

La muestra sin incubar presentó una media de fluorescencia de 7,211 UF, la muestra sin estímulo, pero incubada a 37°C presenta una media de 15,427 UF, mientras que la muestra con un estímulo de fMLP se encuentra en 17,238 UF. Este ensayo muestra que la incubación a 37°C cambia la expresión de CD13 en membrana. Aunque no hay algún estímulo aparente, el cambio de temperatura de 4 a 37 °C y su incubación durante una hora repercute en la expresión de CD13. Por otro lado, también se observa un aumento en la expresión de CD13 dado por el estímulo fMLP.

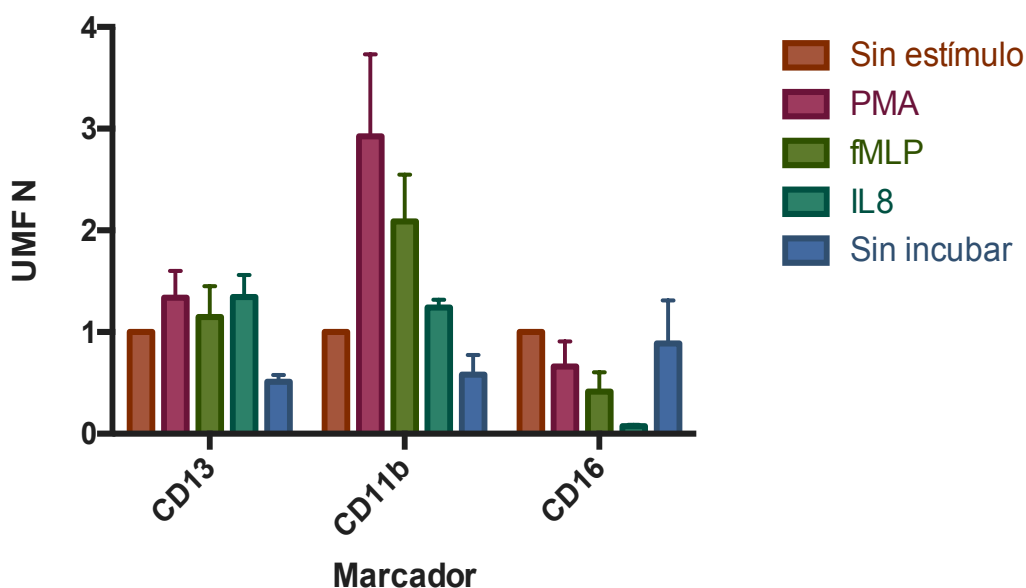
Estos resultados fueron recurrentes y sirvieron para darnos cuenta que en el transcurso del experimento las células se activan por el tratamiento y para cuando son estimuladas podría ser que el cambio en la expresión ya no sea evidente. Este fenómeno interfiere con los cambios de fluorescencia reales por lo que fue necesario idear otra manera más eficaz de medir los cambios en la expresión membranal de ambos marcadores.

Sin embargo, hasta este punto, estos resultados nos brindan información importante; demuestran la presencia de los marcadores CD13 y CD11b, el cambio en la expresión de CD11b dependiente de la activación de la célula, el cambio de la expresión de CD13 también dependiente de la activación de la célula, así como las condiciones que se requieren para demostrar la relación entre CD13 y la activación de neutrófilos.

### 9.7 Cambios en la expresión de CD13 y CD11b de membrana monitoreados a través del tiempo después de ser estimulados.

Con el fin de unificar los experimentos respecto al tiempo de incubación, se determinó realizar las incubaciones con los agentes activadores por 40 minutos. Además, medir la expresión de CD13 y CD11b en las células tras la incubación a 37°C durante 40 minutos con y sin los diferentes activadores.

La figura 16 representa los resultados de la expresión (mostrados en unidad media de fluorescencia normalizada) de CD13, CD11b y CD16 en tres experimentos diferentes.



**Figura 16.** Expresión de marcadores de membrana después de 40 min de incubación en neutrófilos activados con PMA, fMLP e IL8. Se expresa en unidad media de fluorescencia normalizada (UMFN). Los resultados están normalizados con respecto a la fluorescencia media de la condición “Sin estímulo” (café) de células incubadas a 37°C en ausencia de estímulos. Las células fueron incubadas con los estímulos PMA [20 nM] (violeta), fMLP [10 µM] (verde) e IL-8 [10 ng/mL] (turquesa) a 37°C. La barra azul representa la expresión basal de los marcadores en las células medidos inmediatamente después de la incubación.

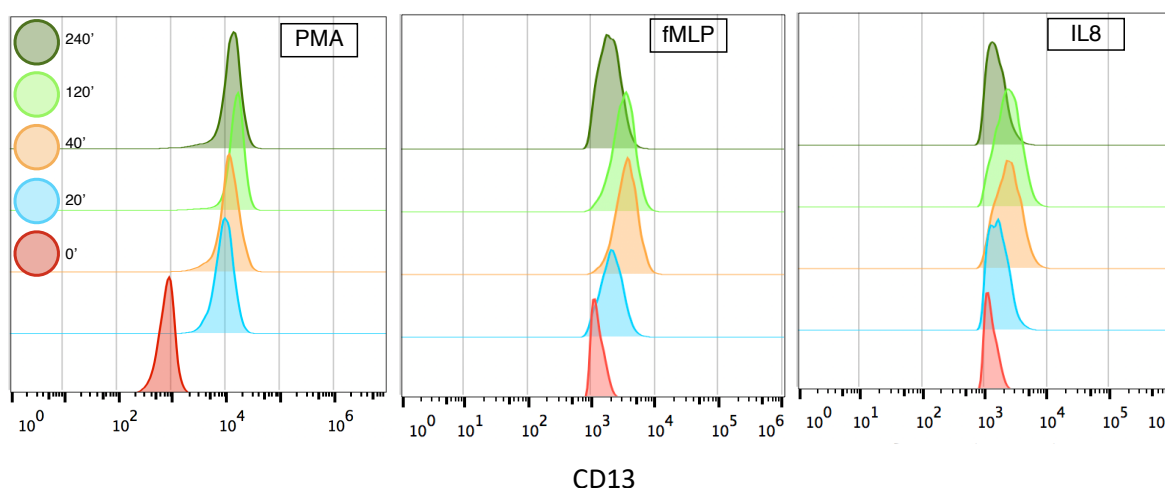
Los promedios de las medianas de fluorescencia para los marcadores CD13, CD11b y CD16 están representados en la figura 16, en neutrófilos no incubados o incubados por 40 minutos sin estímulos o con PMA, fMLP o IL-8. Los valores fueron normalizados con los las medianas de fluorescencia de las células sin estímulo con valor máximo de 1, es por esto que el primer grupo del gráfico (color café) tiene un valor de 1. En general, la expresión de CD11b muestra un cambio considerable

cuando las células son activadas, mientras que el cambio en la expresión de CD13 es menor respecto a éste y constante con los diferentes estímulos.

Estos resultados condensan una buena parte de los resultados obtenidos en las secciones anteriores, sin embargo, era mucho más interesante medir no sólo la respuesta de los PMNs a los 40 minutos sino en diferentes tiempos. Este experimento resolvería las variaciones de activación por temperatura dado que se ocuparon células del mismo donador.

Es decir, de un solo donador se midieron las células incubadas con o sin los estímulos en diferentes tiempos: expresión de CD13 y CD11b basal a los 0 minutos, expresión a los 20 minutos, a los 40 minutos, a los 120 minutos y a los 240 minutos. Además de medir estos marcadores, también se mediría viabilidad para excluir cambios de expresión de CD13 o Cd11b dados por procesos de muerte celular.

La figura 17 muestra el cambio en la expresión de CD13 en la membrana de células tratadas con los 3 estímulos diferentes, está vez medido en diferentes tiempos de incubación (0, 20, 40, 120 y 240 minutos) a 37°C.

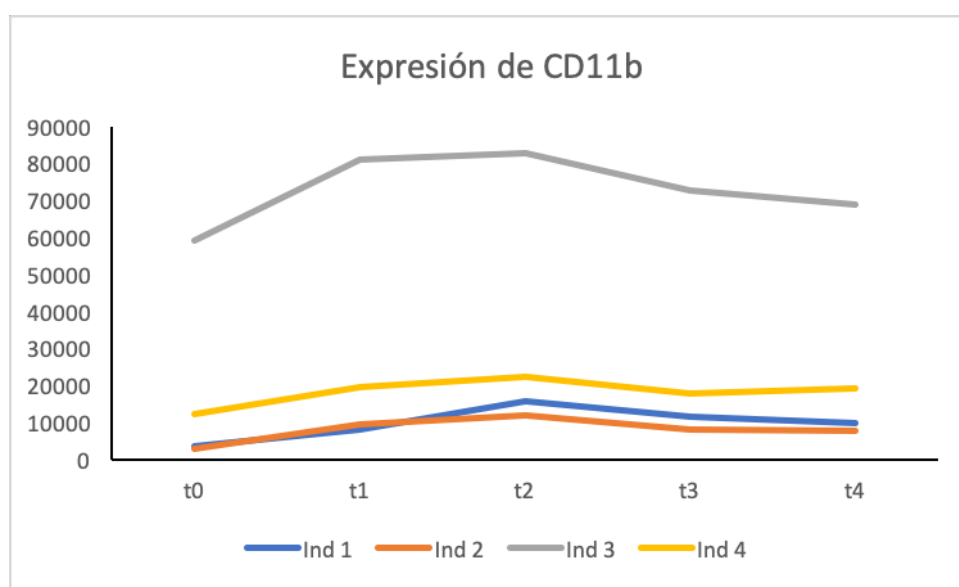


**Figura 17.** Cinética de expresión de CD13 de membrana usando los estímulos PMA, fMLP e IL-8. Histograma representativo de n=5 de la tinción de CD13 se hizo después de incubar a los neutrófilos a 37°C por 0, 20, 40, 120 y 240 minutos (representado por los histogramas rojo, azul, amarillo, verde claro y verde oscuro respectivamente).

Esta cinética de activación monitorea el cambio en la expresión de CD13 en la membrana de PMNs después de la activación con PMA, fMLP e IL-8. Tomando en cuenta la fluorescencia basal (0 minutos, rojo), CD13 aumenta claramente después de activar a las células para luego disminuir en tiempos más tardíos (240 minutos, verde oscuro). Los tres activadores tienen respuestas similares, siendo el PMA el estímulo que induce el cambio más grande.

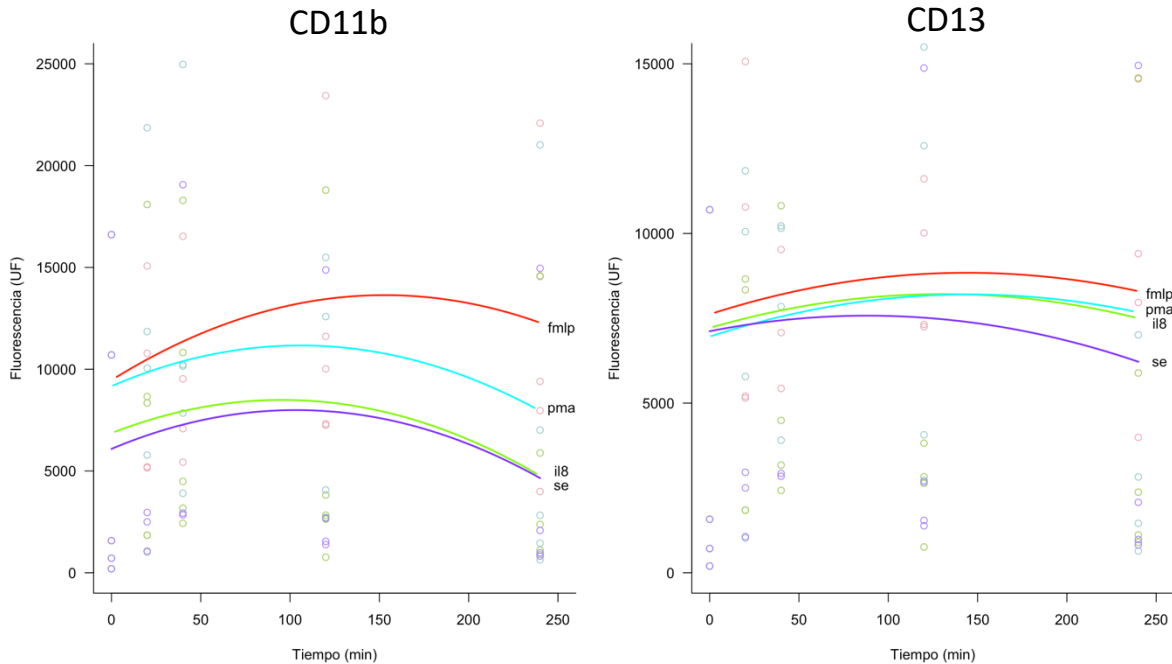
La figura 17 representa el comportamiento de los marcadores ya mencionados. Sin embargo, al repetir los experimentos con células de individuos distintos observamos que las variaciones de expresión mostraban comportamientos similares, pero con diferentes intensidades de respuesta. De tal suerte que obtuvimos muchos resultados que mantenían una tendencia muy parecida entre sí pero con intensidades de fluorescencia distintas.

Se puede observar en la figura 18 que la expresión basal de CD11b en las células de los individuos 1 y 2 es muy parecida, no así la del individuo 3 y 4, siendo mucho mayor la del individuo 3. Es claro que el comportamiento del marcador a lo largo de la cinética es similar en los 4 individuos, sube en los tiempos 1 y 2 para después descender en los tiempos 3 y 4.



**Figura 18.** Cinética de expresión de CD11b en la membrana de neutrófilos. Muestra el cambio en la expresión del marcador en respuesta a fMLP en neutrófilos de 4 individuos diferentes. El tiempo 0 es la expresión basal de las células antes de agregar el estímulo.

Para evitar que el ruido generado por las respuestas individuales en el análisis estadístico sea muy grande, se hizo un ensayo más completo con más individuos ( $n=8$ ). Se usaron los 3 activadores (PMA, fMLP e IL-8) en una cinética de activación que incluye la medición basal y la expresión a los 20, 40, 120 y 240 minutos. La figura 19 muestra el análisis de la base de datos resultante del experimento. Se usó un modelo lineal mixto con variables aleatorias que nos permite analizar el comportamiento de los marcadores de membrana en el tiempo y con los distintos estímulos tomando en cuenta la variabilidad de mediciones entre individuos. El análisis conlleva la formulación de diferentes hipótesis (modelos) que deben probarse matemáticamente y que están descritos en el Apéndice 1.



**Figura 19.** Modelo Lineal Mixto del comportamiento de los marcadores CD11b y CD13 en el tiempo y en cuatro condiciones: sin estímulo (morado), PMA 20nM (azul), fMLP 10uM (rojo) e IL-8 10 ng/mL (verde).

Este modelo explica la relación entre la expresión CD11b y CD13, así como su relación con las variables explicativas tiempo y estímulo. Muestra un aumento en la expresión de ambos marcadores desde los 100 hasta los 150 minutos, seguido de un descenso en la fluorescencia en todos los casos. El estímulo de PMNs con PMA, fMLP e IL-8 activa a las células argumentado por el aumento de la expresión de CD11b, y de la misma manera, incrementa la expresión de CD13.

El experimento tiene 4 variables; 3 variables predictoras que son el tiempo, el estímulo y **el individuo**, y la cuarta variable que es la variable de respuesta, en este caso, la fluorescencia (que se relaciona con el nivel de expresión del marcador).

Para empezar a hacer este análisis se plantean varias hipótesis; una nula que plantea que no hay relación alguna entre la variable de respuesta (fluorescencia) y las variables explicativas (tiempo y estímulo) y diversas hipótesis alternas que relacionan de formas distintas dos, tres o las cuatro variables a la vez. Todos estos modelos con la variable aleatoria "individuo" incluida. Esta variable es aleatoria porque no podemos controlar la expresión de marcadores en las células en cada individuo. Como vimos en la figura 18, el nivel de expresión de CD11b o de CD13 varía de acuerdo a una causa individual en cada donador de neutrófilos. Si nosotros intentamos promediar estos datos para sacar una media de  $n$  individuos, se obtiene un error muy grande que puede arrojar una conclusión errónea.



En total se probaron 11 modelos a los cuales se les calcula el Criterio de Información de Akaike (AIC) mostrado en la Tabla 8. Este valor representa el ajuste de los datos por cada modelo probado, es decir, que tanta variabilidad de los datos se explica con un modelo específico. En la tabla 8 se muestran los valores obtenidos de AIC de acuerdo a los datos de fluorescencia del marcador CD11b.

<b>AIC de los modelos usados para explicar la fluorescencia de CD11b</b>		
<b>No. modelo</b>	<b>AIC</b>	<b>Delta AIC</b>
<b>1</b>	1782.286	129.38905
<b>2</b>	1779.244	126.34801
<b>3</b>	1712.098	59.20195
<b>4</b>	1709.217	56.32043
<b>5</b>	1743.068	90.17129
<b>6</b>	1691.490	38.59387
<b>7</b>	1691.490	38.59387
<b>8</b>	1742.863	89.96613
<b>9</b>	1670.878	17.98171
<b>10</b>	1704.751	51.85405
<b>11</b>	1652.896	0.00000
<b>Marginal: 0.09351521</b>		
<b>Condicional: 0.9411716</b>		

**Tabla 8.** Valores de AIC calculados a partir de los datos de fluorescencia de CD11b obtenidos por citometría de flujo, aplicados a los diferentes modelos (Apéndice 1) que explican la interacción de las variables (fluorescencia, tiempo, estímulo). El Delta AIC resta cada AIC al valor menor para poder apreciar fácilmente la diferencia entre cada modelo. El valor marginal representa el porcentaje de ajuste de los datos sin tomar en cuenta la variable aleatoria. El valor condicional representa el porcentaje de la variabilidad en los datos que es explicada con este modelo.

En esta tabla se debe prestar atención al Delta AIC que es igual a 0. Después de formular 11 modelos, fue este último (con valor 0) el que más explica la variabilidad de datos dados por el cambio en la expresión de CD11b en la membrana de neutrófilos a través del tiempo.

El AIC se calcula a partir de la complejidad del modelo probado y la verosimilitud de los datos ajustados a ese modelo. No tiene unidades y su valor es dependiente de los datos y sus modelos propios. El valor estadístico viene de comparar los AIC de los modelos generados contra el de la hipótesis nula, en este caso el modelo 1. La regla es; el AIC cuya diferencia sea menor a 2 unidades, como mínimo, de la hipótesis nula, se rechaza<sup>48</sup>. En este caso generamos un Delta AIC simplemente restando cada valor de AIC al AIC más bajo que corresponde al modelo 11. Así es más fácil observar las diferencias con cada modelo probado y es posible analizar más a fondo la interacción de cada variable. El modelo 11 relaciona la variable tiempo y estímulo de manera independiente, así como su interacción en respuesta a la fluorescencia. Este modelo tiene el valor de AIC menor, lo que significa que esta interacción es la que mejor explica el comportamiento de la variable de respuesta.

Una vez elegido el modelo se calcularon dos parámetros muy importantes: El valor marginal y el valor condicional. El valor marginal indica el porcentaje de varianza explicada por los datos sin incluir la variable aleatoria explicados por el modelo 11. La condicional por su parte indica el porcentaje de la variabilidad de datos explicados por el modelo 11 incluyendo en el análisis la variable aleatoria.

Para el caso de CD13 se probaron los mismos modelos anteriormente descritos pero con los resultados de fluorescencia de este marcador. Su tabla de AIC (Tabla 9) es como sigue.

<b>AIC de los modelos usados para explicar la fluorescencia de CD13</b>		
<b>No. modelo</b>	<b>AIC</b>	<b>Delta AIC</b>
<b>1</b>	1593.209	84.27784
<b>2</b>	1591.638	82.70716
<b>3</b>	1552.787	43.85630
<b>4</b>	1551.215	42.28392
<b>5</b>	1579.847	70.91628
<b>6</b>	1540.005	31.07419
<b>7</b>	1540.005	31.07419
<b>8</b>	1560.797	51.86612
<b>9</b>	1520.215	11.28400
<b>10</b>	1548.677	39.74571
<b>11</b>	1508.931	0.00000
<b>Marginal: 0.004987422</b>		
<b>Condicional: 0.9411716</b>		

**Tabla 9.** Valores de AIC calculados a partir de los datos de fluorescencia de CD13 obtenidos por citometría de flujo, aplicados a los diferentes modelos (Apéndice 1) que explican la interacción de las variables (fluorescencia, tiempo, estímulo). El Delta AIC resta cada AIC al valor menor para poder apreciar fácilmente la diferencia entre cada modelo. El valor marginal representa el porcentaje de ajuste de los datos sin tomar en cuenta la variable aleatoria. El valor condicional representa el porcentaje de la variabilidad en los datos que es explicada con este modelo.

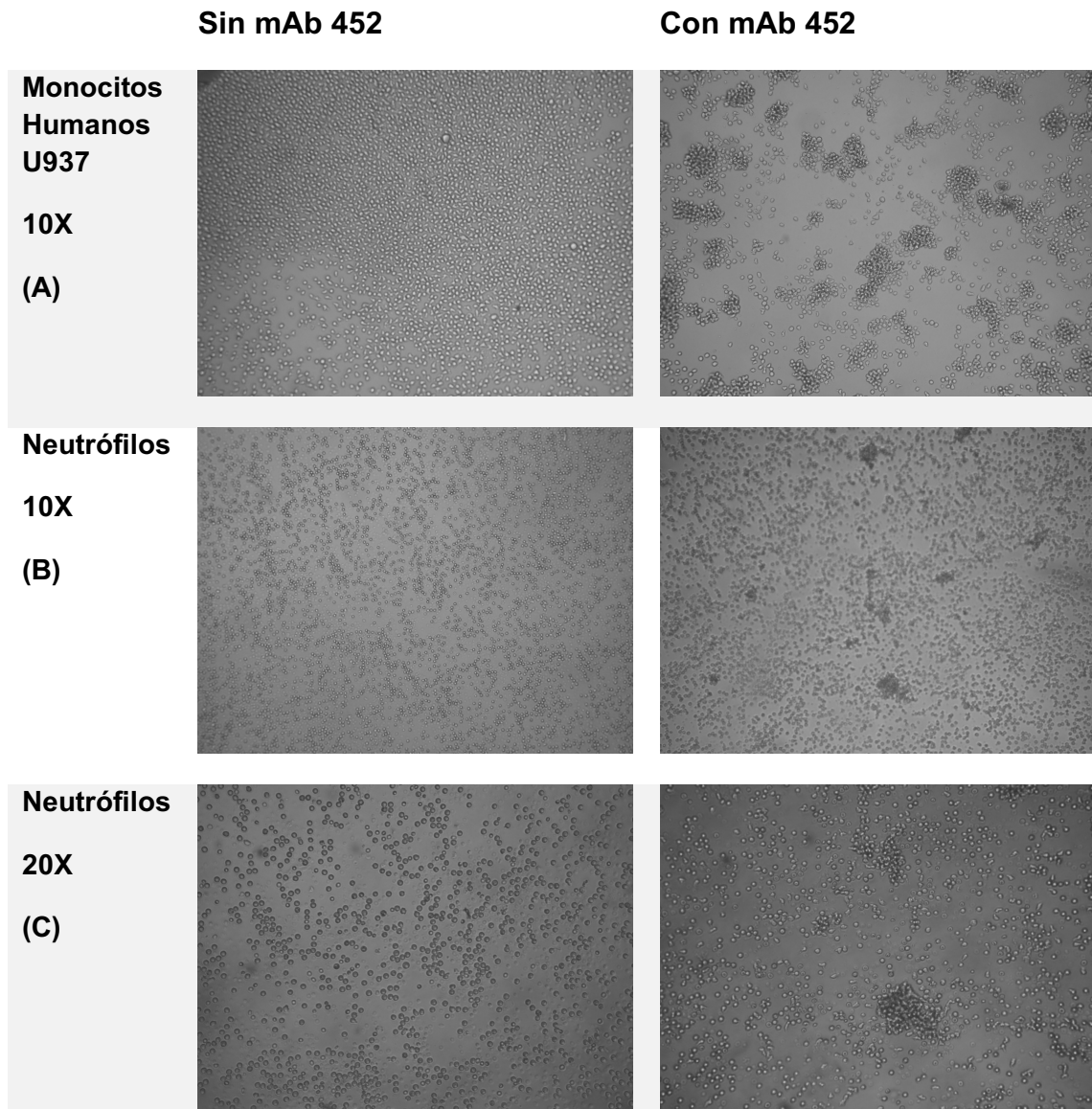
De nuevo, el modelo 11 relaciona las dos variables explicativas y su interacción. Se separa 84 unidades de la hipótesis nula y su valor condicional es de 94%. Es decir, el 94% de la variación de los datos está explicada por este modelo que incluye la variable individuo. Por lo que se puede afirmar que la expresión de CD13 en la membrana de neutrófilos cambia con el tiempo y es diferente con cada estímulo. CD13 aumenta la expresión de membrana en los neutrófilos hasta los 120 minutos, estimulado por la activación a través de PMA, fMLP e IL8, comparados con el control de PMNs sin estímulos.

No obstante, estos resultados también demuestran que la incubación de neutrófilos a 37°C activa a la célula sin la presencia de algún estímulo. Los PMNs aumentan la expresión de ambos marcadores hasta los 120 minutos, CD13 en menor medida que CD11b. Esto último puede deberse a la cantidad de cada marcador presente en los neutrófilos.

Este resultado nos brindó información importante de como se comporta CD13 con la activación celular, pero falta retomar la pregunta ya abordada anteriormente. ¿Es CD13 capaz de iniciar una respuesta efectora propia de la célula?

### **9.8 Agregación Homotípica**

En células monocíticas, se ha demostrado que el entrecruzamiento de CD13 con el anticuerpo monoclonal 452 induce la agregación homotípica de las células (37). Este proceso es propio de diversas líneas celulares del sistema inmunológico como parte de sus procesos efectores en sitios de inflamación. Con el objetivo de determinar si se presenta un proceso similar en neutrófilos que involucre a CD13, incubamos PMNs en presencia del anticuerpo monoclonal 452 por 3 horas a 37°C. En la Tabla 8 se muestran imágenes representativas en donde se puede observar la agregación homotípica de neutrófilos inducida por el anticuerpo 452.



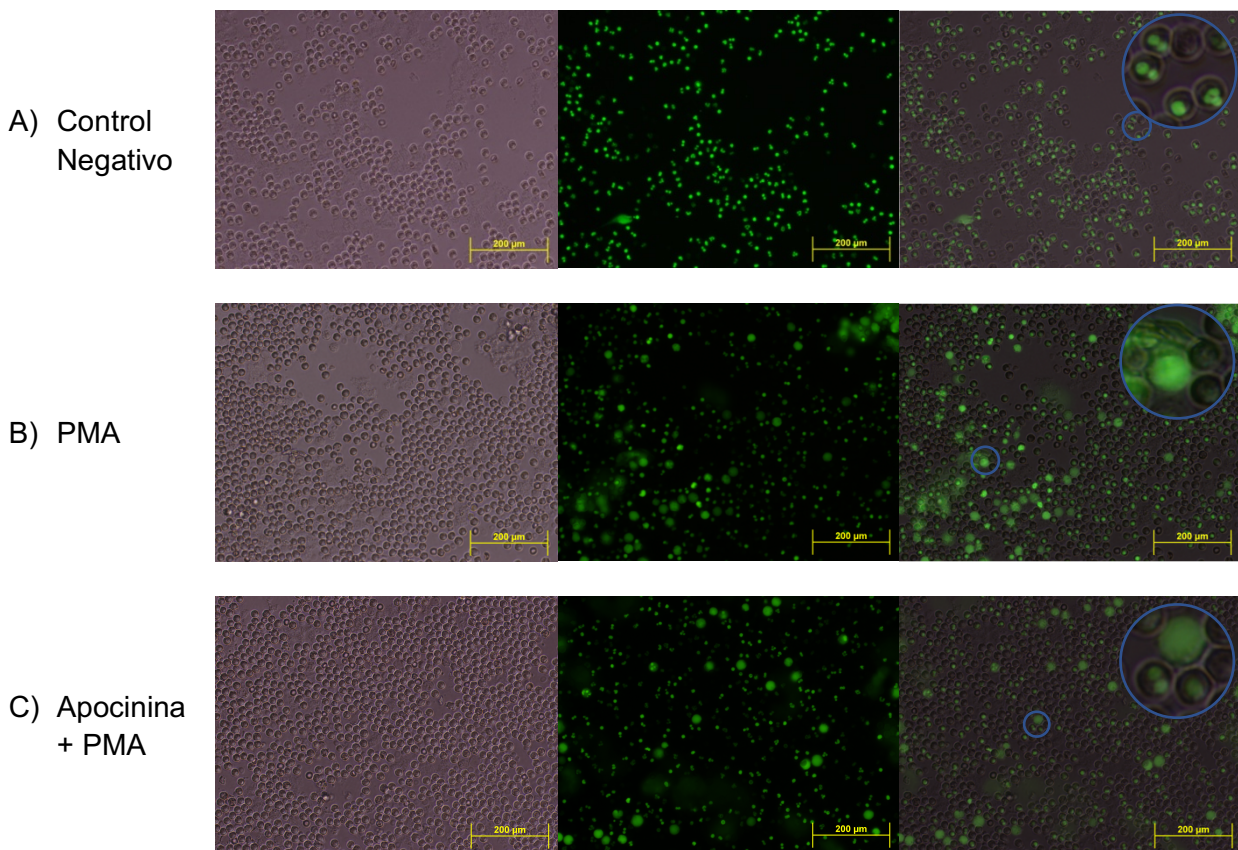
**Figura 20.** Micrografías representativas de la agregación homotípica inducida por el entrecruzamiento de CD13 por el anticuerpo mAb 452 en monocitos de la línea U937 y en neutrófilos de sangre periférica. Las 4 imágenes superiores muestran el campo observado con el objetivo 10x y las dos inferiores observadas con un objetivo 20x.

En la figura 20 los monocitos de la sección A forman agregados al incubarlos a 37°C con el anticuerpo 452. Comparados con este control positivo, los neutrófilos de la sección B pueden verse agregados comparados con su control sin mAb 452 en el que no se observan dichas formaciones.

La sección C es una micrografía del mismo campo con objetivo 20X en la que se puede observar más de cerca la agregación homotípica. Este resultado nos brindó indicios rápidos de la actividad de CD13 y su participación en procesos inmunológicos de los PMNs.

### 9.9 CD13 en la formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs).

La formación de Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) es un proceso característico de los PMNs y hasta el momento se desconoce si la estimulación de CD13 puede inducir el proceso de NETosis. Por esto se realizaron ensayos de formación de NETs cuantificando la fluorescencia emitida por el ADN liberado de las células después de inducir el proceso de NETosis. Para esto se utilizó Sytox-Green; un colorante de alta afinidad por el material genético que no cruza la membrana de células vivas. El experimento consistió en estimular a los neutrófilos con PMA, fMLP o IL-8 para inducir la formación de redes extracelulares en medio con Sytox-Green, con o sin entrecruzamiento de CD13, y leyendo la fluorescencia emitida a diferentes tiempos. En la figura 18 se muestran microfotografías que ilustran la liberación de ADN al medio estimulando a las células por 4 horas con PMA. Se observa la formación de NETs a partir de la estimulación con PMA y la inhibición de las mismas con apocinina.



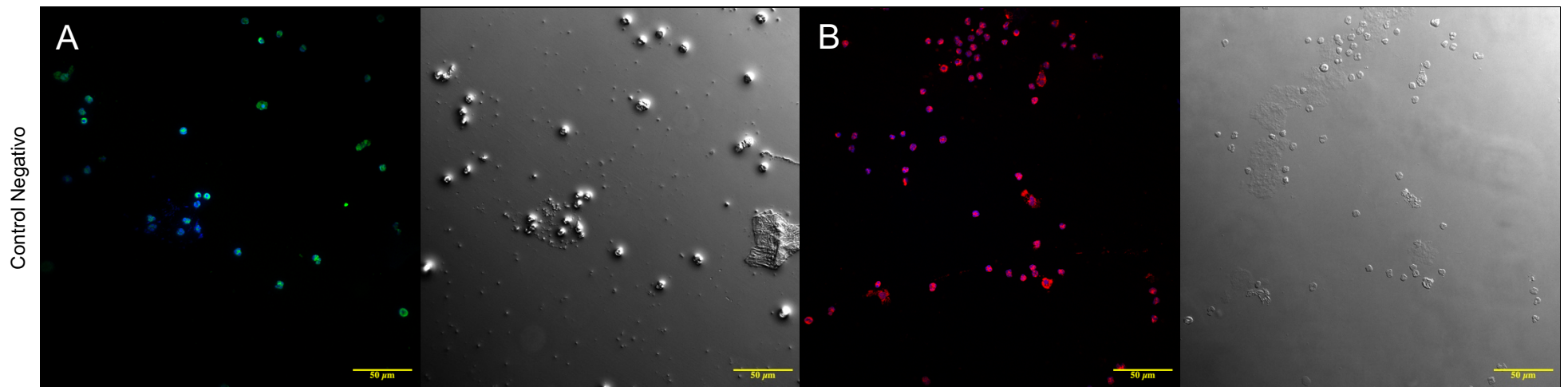
**Figura 21.** Se muestran el material genético liberado (verde) después de 4 horas de incubación. Cada fila es el mismo campo del microscopio. La primera imagen de izquierda a derecha es el campo claro, la segunda está tomada con fluorescencia, mientras que la tercera imagen muestra las dos fotos anteriores sobrepuestas.

La liberación de material genético se puede apreciar claramente en la fila correspondiente a PMA (fila B). Después de más de 4 horas de incubación a 37°C en medio RPMI sin ningún estímulo, las células difícilmente seguirán con vida. Es por esto que el Sytox-Green tiñe al ADN en el control negativo y se pueden ver los núcleos verdes definidos de las células. Sin embargo, la diferencia entre las dos formas de muerte celular es lo que vale la pena distinguir; mientras que el control negativo muestra núcleos lobulados y condensados propios de un neutrófilo, la estimulación de PMA muestra núcleos en forma de “nubes” propios de un proceso de descondensación de cromatina orquestado por la NETosis.

En el proceso de NETosis participa el complejo enzimático NADPH oxidasa, involucrado en el estallido respiratorio. La apocinina es un inhibidor de este complejo enzimático que suprime la translocación de dos componentes citosólicos esenciales, el p47-*phox* y el p67-*phox*, a la membrana donde se ensambla el complejo<sup>49</sup>. En la fila C de la figura 21 se muestra la liberación de ADN inducido por PMA pero con células incubadas con apocinina. Se puede apreciar como la cantidad “nubes” es menor y la mayoría de los núcleos teñidos aún tienen forma lobulada por el efecto inhibitorio de la apocinina sobre la NETosis.

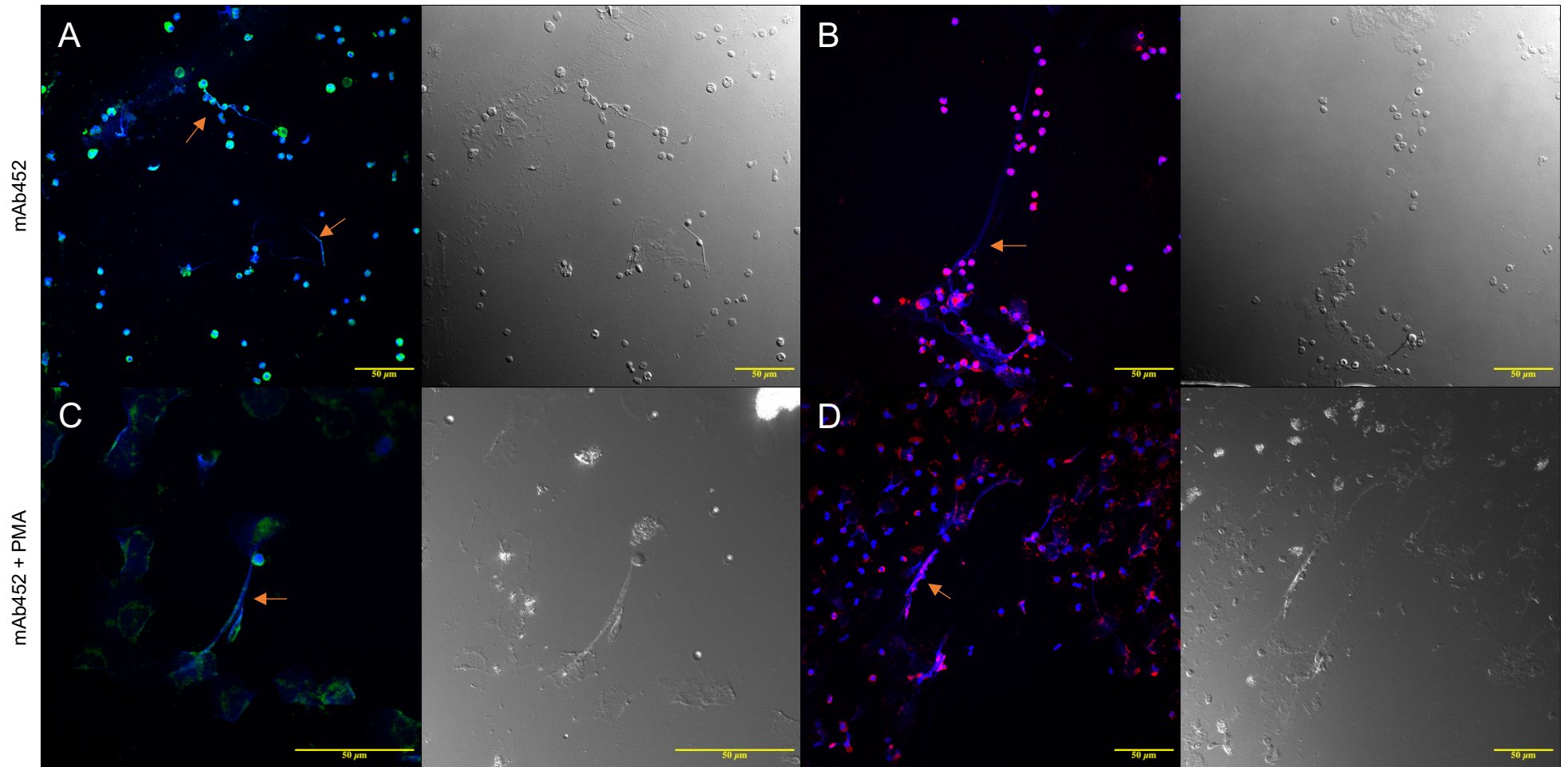
Aunque la liberación de ADN al medio extracelular sugiere la liberación de NETs, es importante visualizar la colocalización del ADN con otros componentes proteicos de las redes extracelulares de neutrófilos (NETs). Para esto, realizamos estudios de microscopía usando anticuerpos monoclonales específicos para algunas de las proteínas distintivas de este proceso. Para tomar las siguientes micrografías (Figura 2-28) se usaron tres anticuerpos: Anti-Elastasa de Neutrófilo (EN), Anti-Mieloperoxidasa (MPO) y Hoechst 33342 como tinción de contraste dirigida a ADN.

El Hoechst 33342 es una molécula que emite fluorescencia de color azul y que se une a los surcos del ADN. Los demás componentes que se quieren identificar se localizan usando anticuerpos específicos que deben ser revelados usando otro anticuerpo secundario conjugado a una molécula fluorescente. Ya que el anticuerpo anti-MPO y el anti-EN que usamos fueron hechos en ratón, esto no permite que sean visualizados en la misma tinción y se tengan que hacer dos experimentos con el mismo estímulo. Es por esto que se presentan dos micrografías con cada condición; en una se presenta la tinción para EN (Figura 22-26 A) y en la otra la tinción para MPO (Figura 22-26 B). Todas las fotografías son de neutrófilos incubados por 4 horas en medio RPMI suplementado con 2% BSA. En azul está teñido el DNA, en verde la elastasa de neutrófilo (NE), en rojo la mieloperoxidasa (MPO).

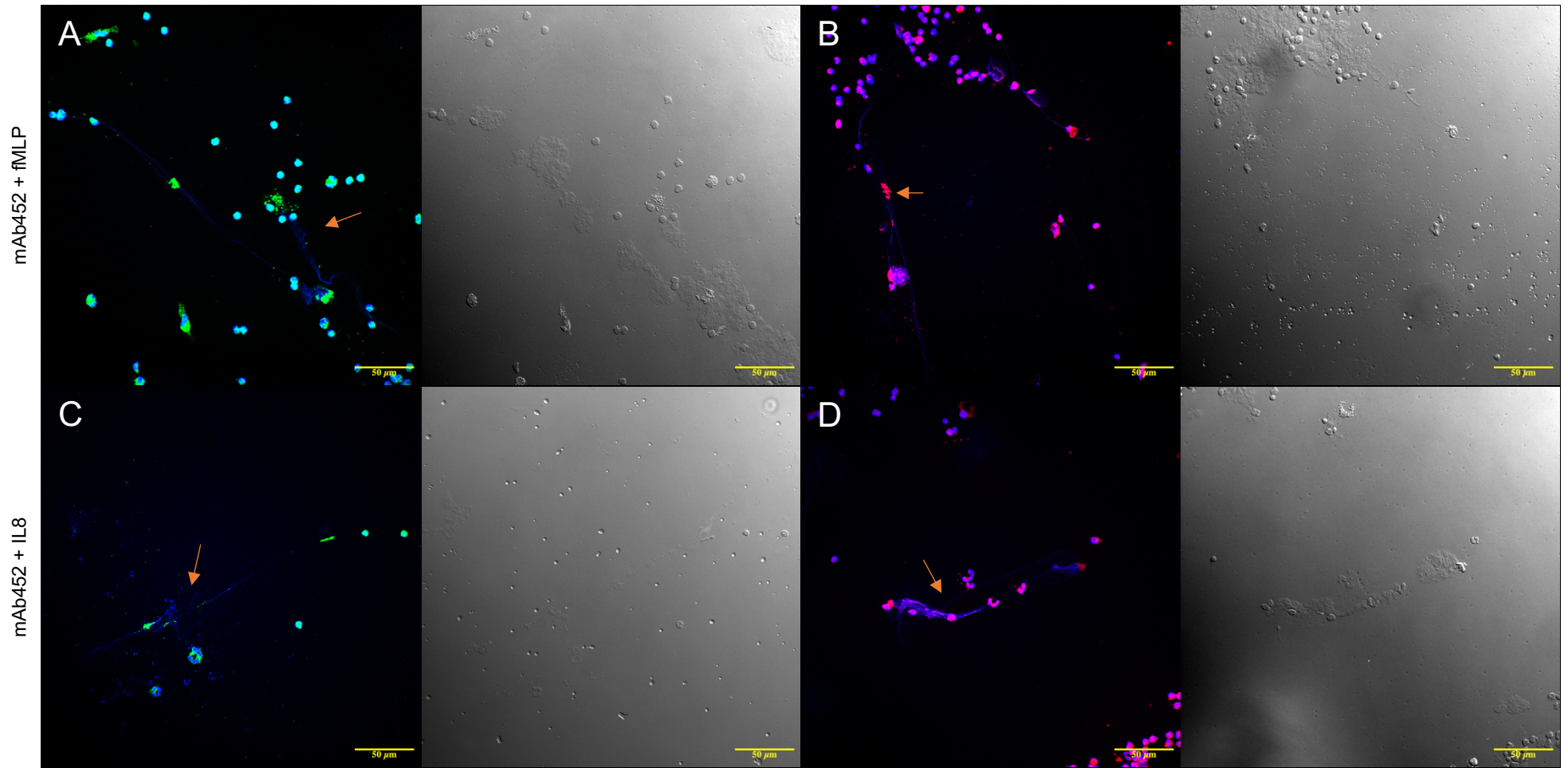


**Figura 22.** Control negativo (Objetivo 40X). Se muestran neutrófilos sin estímulos incubados durante 4 horas a 37°C. A) Tinción de elastasa de neutrófilo (NE; verde) y ADN (azul). B) Tinción de mieloperoxidasa (MPO; rojo) y ADN (azul). Se muestra la inmunofluorescencia y su respectivo campo claro.

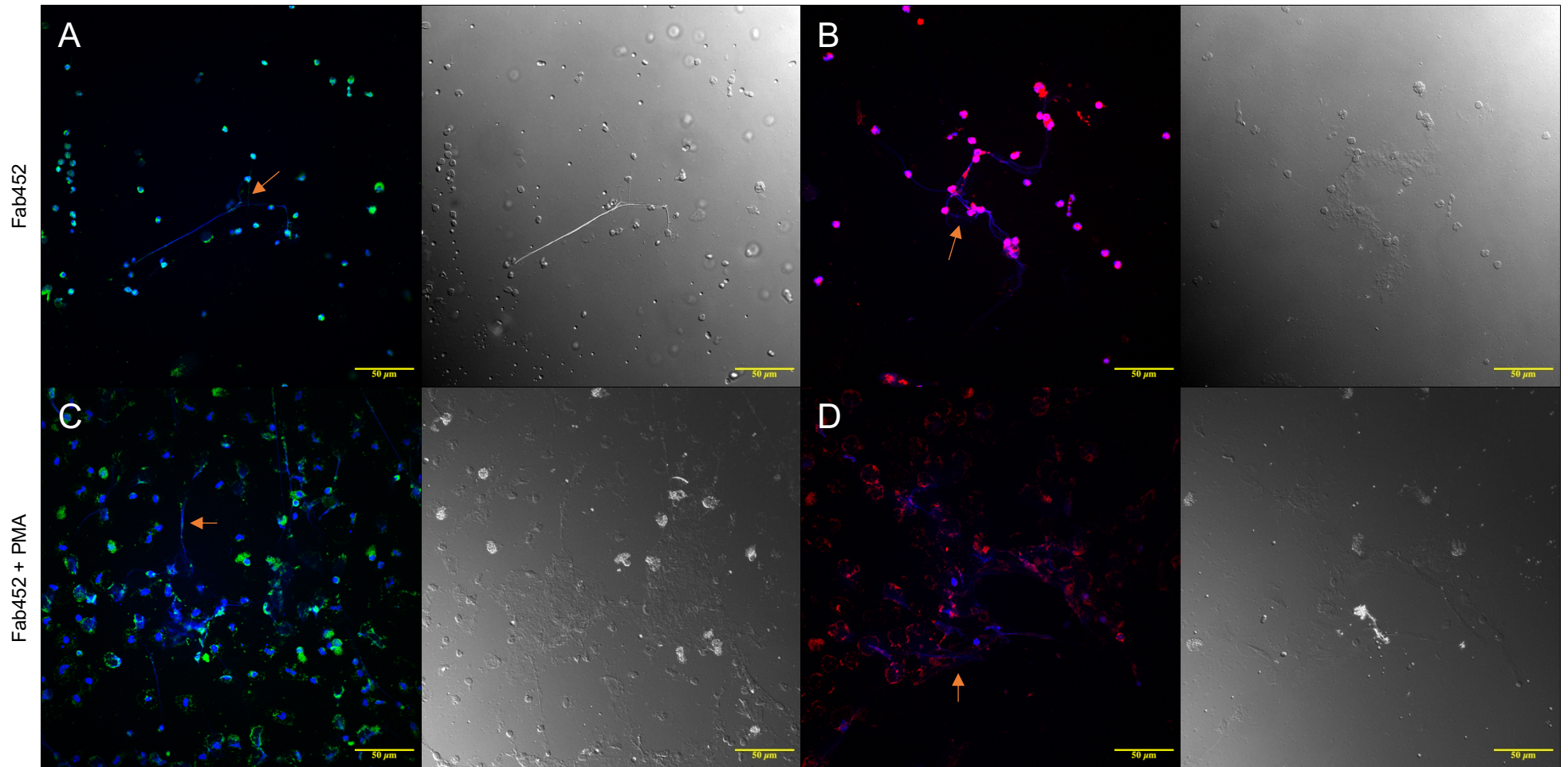




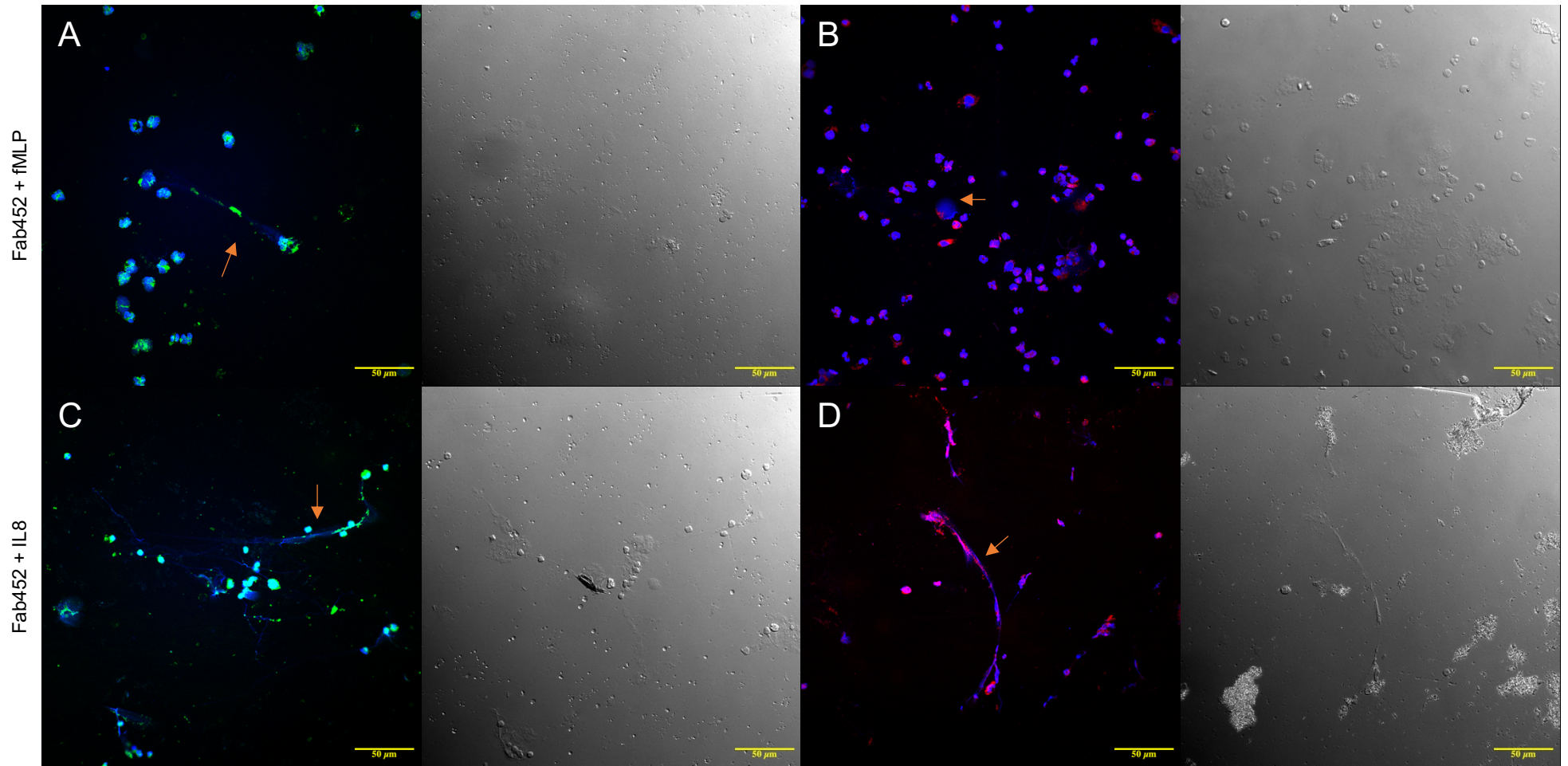
**Figura 23.** Entrecruzamiento de CD13 usando mAb 452 en neutrófilos estimulados por el entrecruzamiento de CD13 incubados durante 4 horas a 37°C (Objetivo 40X). Se muestra la inmunofluorescencia y su respectivo campo claro. A) Tinción de elastasa de neutrófilo (NE; verde) y ADN (azul) entrecruzando CD13. B) Tinción de mieloperoxidasa (MPO; rojo) y ADN (azul) entrecruzando CD13. C) Tinción de elastasa de neutrófilo (NE; verde) y ADN (azul) entrecruzando CD13 y estimulando con PMA [20 nM]. D) Tinción de mieloperoxidasa (MPO; rojo) y ADN (azul) entrecruzando CD13 y estimulando con PMA [20 nM].



**Figura 24.** Entrecruzamiento de CD13 usando mAb 452 en neutrófilos estimulados por el entrecruzamiento de CD13 incubados durante 4 horas a 37°C (Objetivo 40X). Se muestra la inmunofluorescencia y su respectivo campo claro. A) Tinción de elastasa de neutrófilo (NE; verde) y ADN (azul) entrecruzando CD13 y estimulando con fMLP [40  $\mu$ M]. B) Tinción de mieloperoxidasa (MPO; rojo) y ADN (azul) entrecruzando CD13 y estimulando con fMLP [40  $\mu$ M]. C) Tinción de elastasa de neutrófilo (NE; verde) y ADN (azul) entrecruzando CD13 y estimulando con IL8 [10 ng/mL]. D) Tinción de mieloperoxidasa (MPO; rojo) y ADN (azul) entrecruzando CD13 y estimulando con IL8 [10 ng/mL].



**Figura 25.** Entrecruzamiento de CD13 usando Fab 452 en neutrófilos estimulados por el entrecruzamiento de CD13 incubados durante 4 horas a 37°C (Objetivo 40X). Se muestra la inmunofluorescencia y su respectivo campo claro. A) Tinción de elastasa de neutrófilo (NE; verde) y ADN (azul) entrecruzando CD13. B) Tinción de mieloperoxidasa (MPO; rojo) y ADN (azul) entrecruzando CD13. C) Tinción de elastasa de neutrófilo (NE; verde) y ADN (azul) entrecruzando CD13 y estimulando con PMA [20 nM]. D) Tinción de mieloperoxidasa (MPO; rojo) y ADN (azul) entrecruzando CD13 y estimulando con PMA [20 nM].



**Figura 26.** Entrecruzamiento de CD13 usando Fab 452 en neutrófilos estimulados por el entrecruzamiento de CD13 incubados durante 4 horas a 37°C (Objetivo 40X). Se muestra la inmunofluorescencia y su respectivo campo claro. A) Tinción de elastasa de neutrófilo (NE; verde) y ADN (azul) entrecruzando CD13 y estimulando con fMLP [40 µM]. B) Tinción de mieloperoxidasa (MPO; rojo) y ADN (azul) entrecruzando CD13 y estimulando con fMLP [40 µM]. C) Tinción de elastasa de neutrófilo (NE; verde) y ADN (azul) entrecruzando CD13 y estimulando con IL8 [10 ng/mL]. D) Tinción de mieloperoxidasa (MPO; rojo) y ADN (azul) entrecruzando CD13 y estimulando con IL8 [10 ng/mL].

La figura 22 muestra un control negativo. Estas células fueron incubadas a 37°C en medio RPMI suplementado sin ningún otro estímulo. En las imágenes se pueden observar los núcleos condensados y lobulados de las células teñidos de azul. Tanto en la figura 22 A como en la B no se observa algún proceso que comprometa la estructura del núcleo. Por otro lado se pueden observar los gránulos en el citoplasma tanto de elastasa como de mieloperoxidasa.

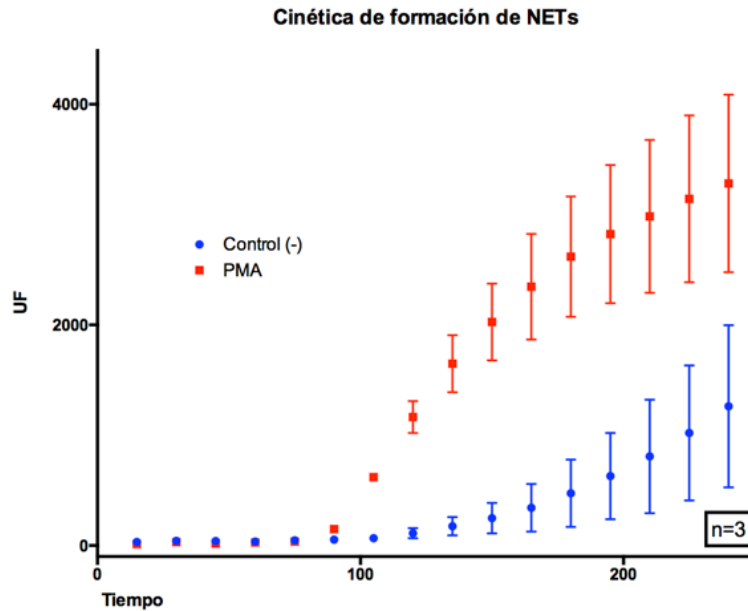
Tanto la figura 23 A y B, como la figura 25 A y B son uno de los resultados más importantes de este trabajo. En ellas se observa como el entrecruzamiento con el mAb 452 y el Fab 452 respectivamente promueven la formación de trampas extracelulares de neutrófilos. En ambas figuras se pueden ver las estructuras alargadas características de estas formaciones teñidas de azul. Esto indica que están hechas de material genético y las proteínas elastasa (Figura 23 y 25 A, verde) y mieloperoxidasa (Figura 23 y 25 B, rojo) forman parte de su composición a lo largo su estructura. La combinación de los colores generan que en aquellas zonas donde colocalizan la elastasa y el ADN se observe verde brillante, mientras que donde colocalizan la mieloperoxidasa y el ADN se observa rosado.

La formación de NETs a través de los estímulos PMA, fMLP e IL8 ya se ha documentado antes <sup>45,50,51</sup>. En nuestro caso las redes estimuladas por el PMA se pueden ver a la perfección en la figura 23 C y D con CD13 entrecruzado con mAb 452 y en la figura 25 C y D con CD13 entrecruzado con Fab 452. Mientras en las figuras 24 y 26 se puede observar el efecto de los estímulos fMLP e IL8.

En este trabajo la estimulación de neutrófilos con fMLP no generó una respuesta significativa en la formación de NETs, al menos, a la concentración que se usó. Mientras que la IL8 forma redes que se pueden verse claramente y con la colocalización de elastasa y mieloperoxidasa (Figuras 24 C-D y 26 C-D).

Aún cuando es importante observar la fluorescencia dada por el Sytox Green o las inmunofluorescencias que colocalizan las proteínas convencionales de las NETs, resulta importante cuantificar la respuesta de tal manera que nos pueda brindar resultados objetivos. Para lo cual se realizaron ensayos de formación de NETs que fueron cuantificados midiendo la fluorescencia con un lector de placas.

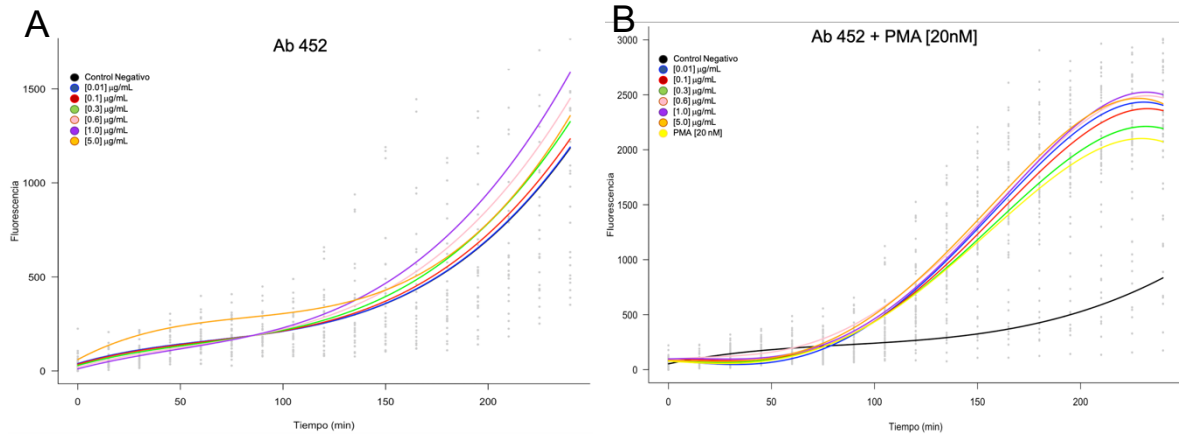
La figura 27 muestra el comportamiento temporal de la fluorescencia de Sytox-Green en suspensiones de neutrófilos incubados o no con PMA, durante 4 horas (240 minutos). Es posible observar el aumento en la fluorescencia a partir de 90 minutos dado por el estímulo, comparado con el control negativo.



**Figura 27.** Cinética de formación de NETs. Los puntos de color azul representan la fluorescencia del Sytox-Green de una suspensión de células que no fueron estimuladas PMA (control negativo). Los puntos en color rojo representan la fluorescencia de la suspensión de células que fueron estimuladas con PMA (20 nM).

En los siguientes experimentos se estimuló a CD13 entrecruzándolo con un anticuerpo monoclonal mAb 452, monitoreando si el entrecruzamiento promueve y/o potencia la respuesta NETotica estimulada por PMA, fMLP o IL8.

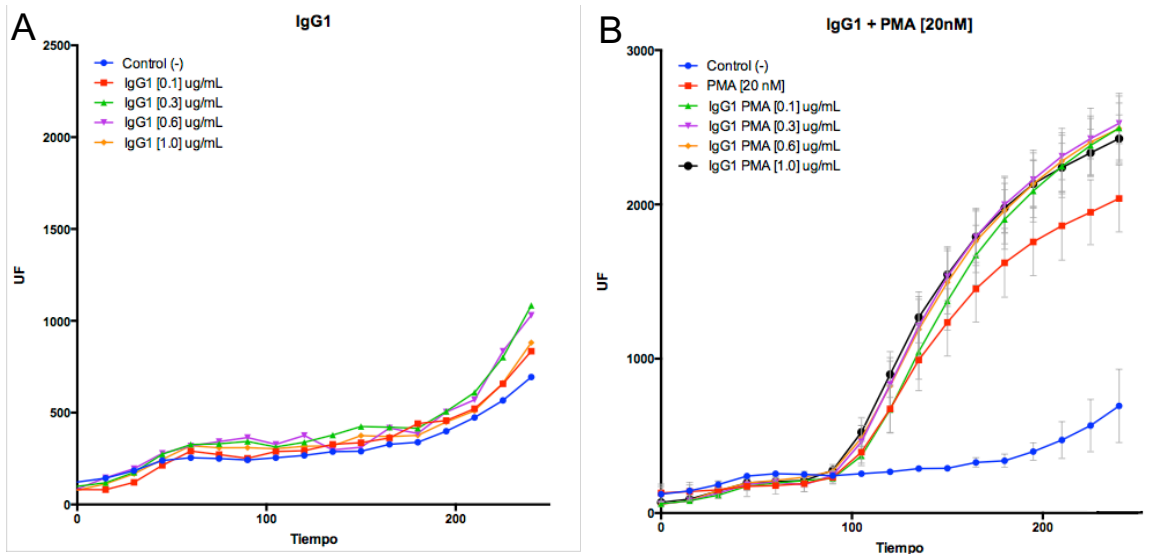
Se hicieron ensayos en placas de 96 pozos, como se describió anteriormente para la figura 27 pero agregando dos condiciones más: células tratadas con mAb 452 y células tratadas con mAb 452 y estimuladas con PMA. La figura 28 muestra los resultados de la respuesta de liberación de NETs por el entrecruzamiento de CD13.



**Figura 28.** Cinética de formación de NETs entrecruzando CD13. Se muestran (A) los valores de fluorescencia de células en las que se entrecruzó CD13 con el mAb 452 ( $R^2c=0.67$ ) y (B) células en que se entrecruzó CD13 con el mAb 452 y fueron estimuladas con PMA [20 nM] ( $R^2c=0.92$ ).

La figura 28 A muestra un aumento en la fluorescencia desde tiempos tempranos de la cinética. La liberación de ADN es mayor comparada con el control negativo con las concentraciones de mAb452 de 0.6 y 1.0  $\mu\text{g/mL}$  (Rosado y Violeta respectivamente). La liberación de ADN con la concentración más baja (0.01  $\mu\text{g/mL}$ ; azul) es prácticamente igual al control negativo y con la concentración de 0.1  $\mu\text{g/mL}$  (roja) no tiene un cambio significativo comparado con el control negativo. La figura 28 B muestra el comportamiento de los neutrófilos cuando se entrecruza CD13 con mAb 452 en células estimuladas con PMA [20 nM]. Los resultados muestran que la liberación de ADN es mayor en aquellas células en las que se entrecruzó CD13 y fueron estimuladas con PMA (0.6, 1.0 y 5.0  $\mu\text{g/mL}$ , rosa, violeta y anaranjado respectivamente), respecto a aquellas que sólo fueron estimuladas con PMA (amarilla). Las tres concentraciones más altas de anticuerpo muestran un aumento significativo en la fluorescencia.

Dado que el anticuerpo mAb 452 es una inmunoglobulina G, podría estar uniéndose a los receptores  $\text{Fc}\gamma$  de los neutrófilos. Los neutrófilos expresan tanto  $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$  como  $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$  (CD16), los cuales podrían estar mediando la activación de la vía de NETosis. Como control de isotipo se hizo una cinética de formación de NETs usando un anticuerpo IgG1 no específico.

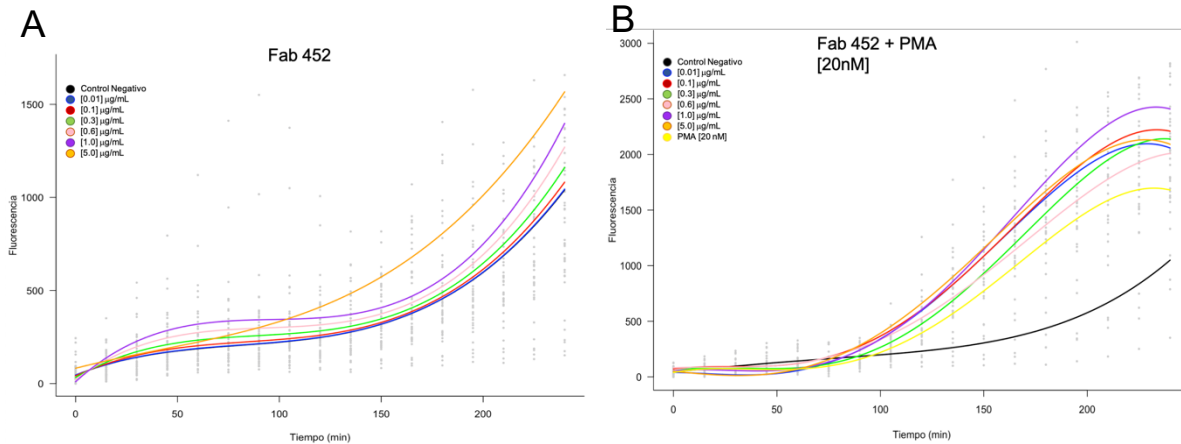


**Figura 29.** Cinética de formación de NETs. A) Se muestra la fluorescencia emitida por la liberación ADN en presencia de un anticuerpo IgG1 en diferentes concentraciones: 0.1, 0.3, 0.6 y 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (rojo, verde, violeta y anaranjado respectivamente). B) Fluorescencia generada a partir de la liberación de ADN estimulada por PMA [20 nM] en presencia de un anticuerpo del isotipo IgG1.

La figura 29 A representa la respuesta de los neutrófilos incubados con diferentes concentraciones de IgG1. Se observa que no hay cambios significativos en la emisión de fluorescencia. Sin embargo, en la sección B, en donde hay cambios significativos comparados al control de PMA (rojo) y el control negativo (azul). Sin embargo, no existen cambios entre las diversas concentraciones probadas: 0.1, 0.3, 0.6 y 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (verde, violeta, anaranjado y negro respectivamente)

Tomando en cuenta lo anterior, también realizamos el entrecruzamiento uniendo fragmentos Fab del anticuerpo anti-CD13 452 a los neutrófilos e induciendo el entrecruzamiento con fragmentos  $\text{F}(\text{ab}')_2$  de un anticuerpo secundario (Goat anti-mouse IgG) (Figura 30).

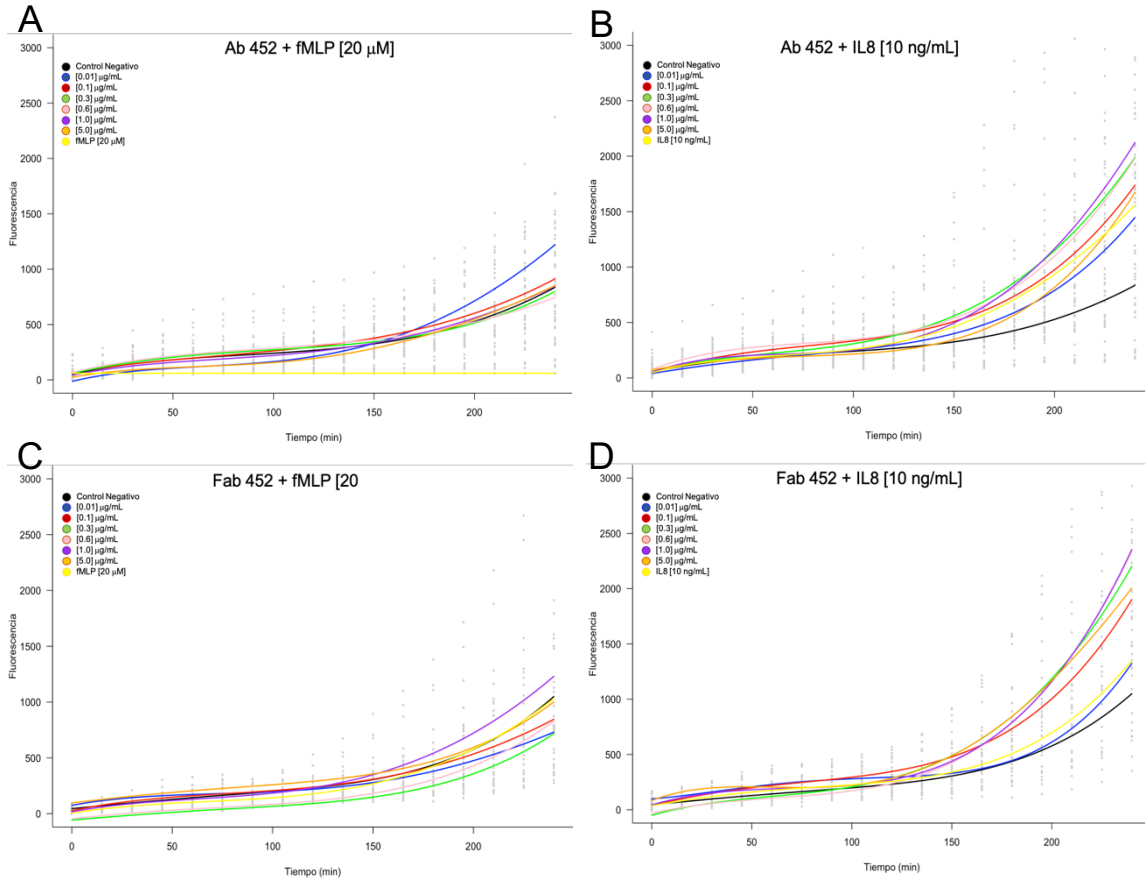




**Figura 30.** Cinética de formación de NETs con entrecruzamiento de CD13. Se muestran los valores de fluorescencia obtenidos por la liberación de ADN en células cuyo CD13 fue entrecruzado<sup>o</sup> utilizando fragmentos Fab del anticuerpo 452 (Fab 452) y un anticuerpo secundario. La figura A muestra el efecto del entrecruzamiento con diferentes concentraciones de Fab 452 (0.01, 0.1, 0.3, 0.6, 1.0 y 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $R^2\text{c}=0.81$ ). En la figura B se observa el efecto del entrecruzamiento con diferentes concentraciones del anticuerpo Fab 452 (0.01, 0.1, 0.3, 0.6, 1.0 y 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en células estimuladas con PMA [20 nM] y comparadas contra un control positivo (amarillo) y uno negativo (negro)( $R^2\text{c}=0.90$ )

La figura 30 A muestra un aumento significativo en la fluorescencia comparado con el control negativo con la concentración de 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Fab 452. Las concentraciones de 0.1, 0.3, 0.6 y 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no muestran efectos diferentes entre sí y tampoco muestran cambio significativo respecto al control negativo. En la figura 30 B se muestra en rojo el comportamiento de la liberación de NETs con el estímulo de PMA [20 nM] y hay un aumento significativo en la fluorescencia entrecruzando CD13 a una concentración de 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Fab 452.

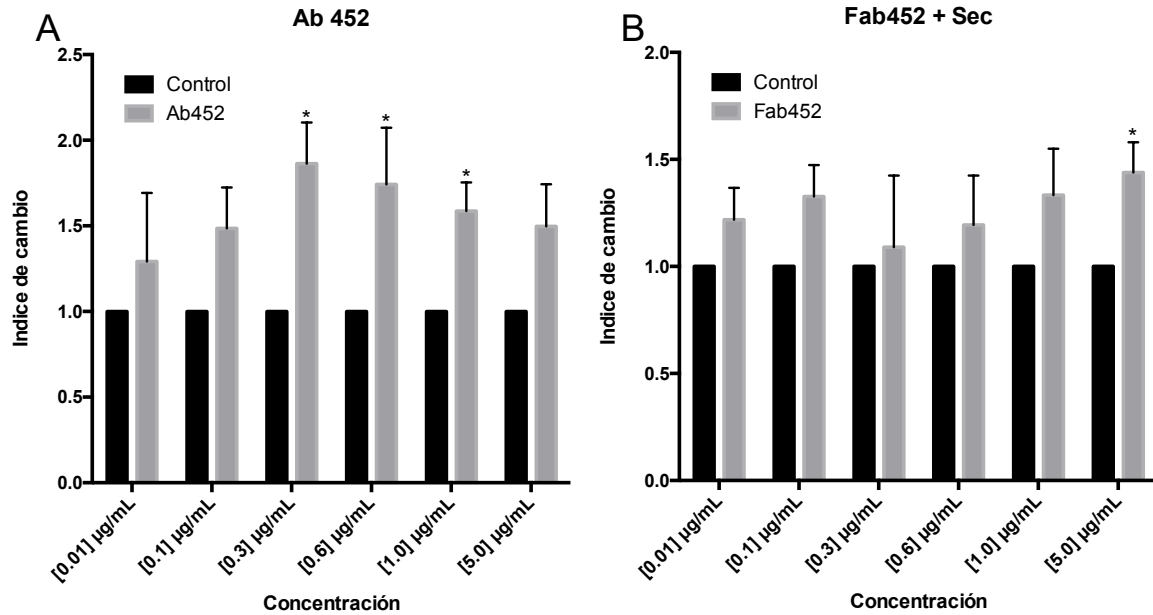
El PMA es un excelente activador de diversas vías celulares, sin embargo, no es un estímulo fisiológico y siguiendo con la lógica del proyecto se probaron también los estímulos fMLP e IL-8. En la figura 31 se muestra el comportamiento en la liberación de NETs entrecruzando a CD13 con mAb 452 y Fab 452, esta vez con los estímulos fMLP [20 nM] e IL-8 [10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ].



**Figura 31.** Cinética de formación de NETs con entrecruzamiento de CD13. Se muestran los valores de fluorescencia obtenidos por la liberación de ADN por células cuyo CD13 fue entrecruzado utilizando el monoclonal anti-CD13 452 (mAb 452; superior) o fragmentos Fab del anticuerpo 452 (Fab 452) y fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpos IgG G<sub>α</sub>M (inferior). Las concentraciones usadas de los anticuerpos mencionados fueron: 0.01, 0.1, 0.3, 0.6, 1.0 y 5.0 µg/mL. La figura A muestra la fluorescencia dada por células con CD13 entrecruzado usando mAb 452 y estimuladas con fMPLP [20 µM] (sin significancia estadística). La figura B muestra la fluorescencia dada por células con CD13 entrecruzado usando mAb 452 y estimuladas con IL-8 [10 µg/mL] ( $R^2c=0.79$ ). La figura C muestra la fluorescencia dada por células con CD13 entrecruzado usando Fab 452 y estimuladas con fMPLP [20 µM] (sin significancia estadística). La figura D muestra la fluorescencia dada por células con CD13 entrecruzado, usando Fab 452 y estimuladas con IL-8 [10 µg/mL] ( $R^2c=0.89$ ).

En el caso del fMLP no se obtuvieron diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia después de 4 horas de incubación con el entrecruzamiento usando mAb 452 (Figura 31 A) ni con el entrecruzamiento usando Fab 452 (Figura 31 C). De hecho, el AIC de la figura A y C para el modelo nulo fue 0. Es decir, la fluorescencia del Sytox Green no se modifica por la presencia de fMLP. Por su parte la intensidad de fluorescencia tiene un aumento significativo con el estímulo IL-8. La liberación de ADN aumenta significativamente con el entrecruzamiento de CD13 usando mAb 452 (Figura 23 B) en las concentraciones 0.6 y 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en células estimuladas con IL-8. De la misma manera, el entrecruzamiento de CD13 en células estimuladas con IL-8 aumenta significativamente la liberación de ADN usando los fragmentos Fab 452 en concentraciones de 0.3, 0.6 y 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  comparadas con un control negativo (azul) y un control positivo de IL-8 (rojo). En las diversas cinéticas y como se logra apreciar en la misma figura, el estímulo fMLP no indujo la formación de NETs en las condiciones y concentraciones probadas en este trabajo.

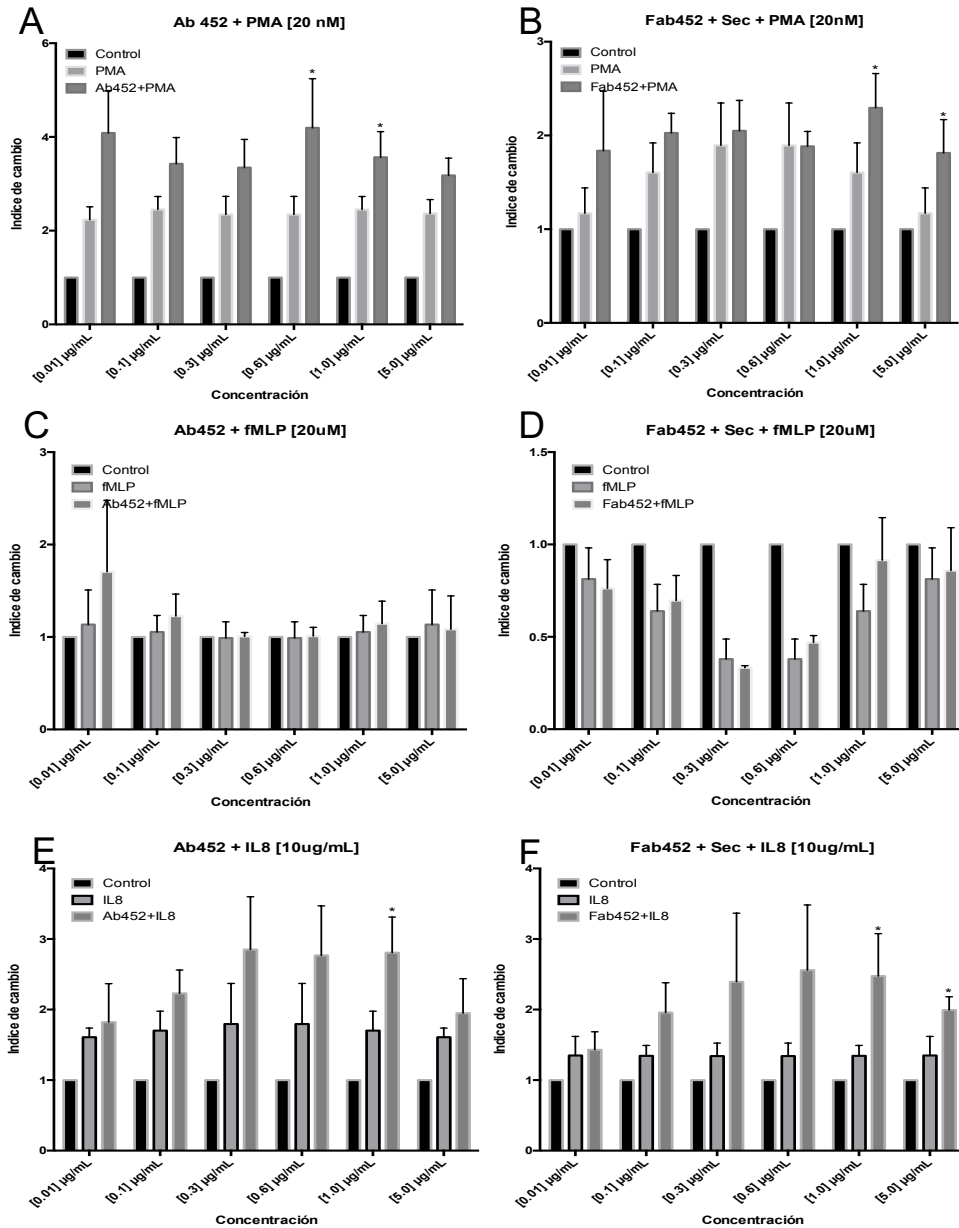
El cambio en la intensidad de fluorescencia por la liberación de ADN se aprecia mejor al final de la cinética. Los cambios más grandes de fluorescencia están registrados en tiempos tardíos de la misma. Las siguientes figuras (figura 32-33) muestran el cambio en la intensidad de fluorescencia solamente en el tiempo 240 minutos. Como se puede observar en la figura 32, las células tratadas con el anticuerpo mAb 452 tienen un aumento en la fluorescencia significativamente mayor que el control, en las concentraciones de 0.3, 0.6 y 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mientras que el entrecruzamiento de CD13 con Fab 452 y anticuerpo secundario induce un incremento de fluorescencia significativo en la concentración de 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Figura 32.** Análisis de intensidad de fluorescencia de NETs en 240 minutos. Las figuras muestran la diferencia de fluorescencia emitida por el ADN liberado por células estimuladas por el entrecruzamiento de CD13 en diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 0.3, 0.6, 1.0 y 5.0 µg/mL). En la figura A se muestra las diferencias entre la fluorescencia emitida por células tratadas con mAb 452, mientras que el gráfico B muestra el cambio en la fluorescencia por células tratadas con fragmentos Fab del mAb 452 y un anticuerpo secundario. Prueba T student con una prueba post hoc Holm – Sidak  $\alpha=5\%$ .

Si comparamos la liberación de NETs en dos condiciones: entrecruzamiento de CD13 y entrecruzamiento de CD13 más estímulo, podemos observar en la figura 33 y 34 que es mayor el cambio con entrecruzamiento de CD13 mas estímulo que por el entrecruzamiento de CD13 únicamente. Esto podría hablar de CD13 como un potenciador de la respuesta NETotica.

Las figura 33 muestra el análisis de la fluorescencia emitida por células estimuladas con PMA, fMLP e IL-8 y entrecruzadas con CD13 utilizando los fragmentos Fab 452 y el anticuerpo mAb 452.



**Figura 33.** Análisis de intensidad de fluorescencia de NETs a los 240 minutos. Las figuras muestran la diferencia de fluorescencia emitida por el ADN liberado por células estimuladas con los estímulos PMA, fMLP e IL8 y el entrecruzamiento de CD13. La figura A muestra la fluorescencia emitida por células en las que CD13 se entrecruzó con diferentes concentraciones de mAb 452 y la B con concentraciones de Fab 452 más anticuerpo secundario. La figura C muestra la fluorescencia emitida por células en las que CD13 se entrecruzó con diferentes concentraciones de mAb 452 y la figura D con diferentes concentraciones de Fab 452 más anticuerpo secundario. La figura D muestra la fluorescencia emitida por células en las que se entrecruzó CD13 con mAb 452 y la E con Fab 452, ambos en diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 0.3, 0.6, 1.0 y 5.0 µg/mL). Prueba T student con una prueba post hoc Holm – Sidak  $\alpha=5\%$ .

Respecto al comportamiento con fMLP (figura 33 C y D), se puede observar una disminución de la fluorescencia en las diversas concentraciones de entrecruzamiento de CD13 usando Fab 452. Si pensamos en el entrecruzamiento de CD13 como una forma de activación celular podría explicar la disminución de la fluorescencia de la siguiente forma: al estimular CD13 se logra la liberación de material genético siempre y cuando sea un estímulo lo suficientemente fuerte, de este modo la estimulación estaría promoviendo la activación de la célula, esta acción prolongaría la vida de los PMNs. Bajo esta hipótesis los gráficos demostrarían que lo que promueve CD13 al ser entrecruzado es la estimulación de vías de supervivencia y activación de neutrófilos y sólo si el estímulo es lo suficientemente fuerte se llegaría a disparar la NETosis.

Los gráficos están elaborados a partir de la fluorescencia generada por la unión del reactivo Sytox Green al ADN extracelular. Este reactivo tiene ciertas particularidades: no genera fluorescencia a menos que esté unido al ADN y, por otro lado, no es permeable a la membrana celular. Esto quiere decir que este reactivo sólo va a generar fluorescencia por material genético liberado al medio. Asumiendo que todo el material genético liberado al medio proviene de un proceso de NETosis podemos concluir que la fluorescencia medida por el equipo es directamente proporcional a la cantidad de NETs formadas.

En lo que respecta a las células estimuladas con IL-8 (figura 33 E y F), el entrecruzamiento con 1.0  $\mu\text{g/mL}$  de mAb 452 aumenta la intensidad de fluorescencia significativamente, mientras que los fragmentos Fab 452 lo hacen en las concentraciones 1.0 y 5.0  $\mu\text{g/mL}$ . Tomando esto en consideración, parece que el entrecruzamiento de CD13 es más efectivo a una concentración de 1.0  $\mu\text{M}$ .

## 10. Discusión

### 10.1 Expresión de CD13 en membrana

CD13 ha sido estudiado en diversas líneas celulares demostrando un amplio rango de actividades. Hoy en día esta peptidasa multifuncional de membrana tiene muchas más funciones que la descrita originalmente de escindir aminoácidos neutros de péptidos. Los procesos a los que está relacionada, desde la agregación homotípica hasta la interacción con diversos ligandos como  $\text{TNF}\alpha$  o IL-8<sup>52</sup>, han sugerido que la molécula está ampliamente regulada. CD13 está expresada en diferentes cantidades a lo largo de la diferenciación de células mieloides incluso siendo considerado como un marcador de células mielomonocíticas<sup>52</sup>. En neutrófilos solo se había visto modificada su expresión en las etapas tempranas de la apoptosis<sup>53</sup>. Nuestros datos aportan evidencia del efecto de la temperatura sobre el cambio en la expresión de CD13 en membrana de neutrófilos. Como se puede ver en la figura 14 B, al comparar la expresión de CD13 justo después de la purificación y después de la incubación a 37°C durante 1 hora, se pudieron notar cambios en el nivel de expresión en membrana, posiblemente dado por el efecto de la temperatura q. Por este motivo también hicimos los experimentos con la condición “sin estímulo” (SE) que mide el comportamiento de las células sin la presencia de los activadores PMA, fMLP e IL-8.

Los valores de fluorescencia en los ensayos que miden la expresión de CD13, por citometría de flujo, mostraron intensidades muy variables entre individuos. Esta variación tan grande en la fluorescencia está dada por un efecto individual y no nos permite hacer un análisis convencional de los datos. Dado que la variable fluorescencia es la que nos indica el efecto del activador sobre la expresión de la proteína de membrana de la célula, nos dimos a la tarea de analizar nuestros datos mediante modelos mixtos de afecto aleatorio.

En un análisis estadístico convencional sólo se consideran efectos fijos relacionados con la variable de respuesta. Pero, en ocasiones, no todas las variables predictoras son de efectos fijos. Si los valores de la variable son identificativos y se encuentran valores distintos que no pueden ser controlados por el experimentador o si el estudio se repitiera en diferentes circunstancias, se habla de una variable de efectos aleatorios, en los que se asume una relación entre las observaciones realizadas en la misma clase.

En el caso de nuestro estudio, la variable “individuo” brinda valores relacionados con la variable de respuesta; es decir, la expresión de CD13 sobre las células de cada individuo responden al tiempo y al estímulo, lo que se puede notar por los cambios en la intensidad de fluorescencia. Pero si el estudio se repite con otro

individuo, los valores pueden ser considerablemente distintos, aunque se logra apreciar una tendencia y una relación en las mediciones hechas cada vez. De acuerdo a los objetivos de este estudio, nos interesa responder si la expresión de CD13 en la membrana de neutrófilos cambia o no cuando son activados, por el momento no es de nuestro interés conocer un valor de impacto poblacional.

En estas circunstancias, no es correcto simplemente ignorar la variable “individuo” porque las desviaciones de los datos son lo suficientemente grandes para que no haya significancia estadística en un análisis convencional. Un análisis estadístico denominado “Modelos lineales de efectos mixtos” se plantea justo ante esta problemática. En este, el efecto de la variable aleatoria no es ignorado, lo que evita incurrir en un error estadístico donde se podría rechazar la hipótesis nula falsamente.

Para realizar este análisis es necesario desarrollar diversos modelos que expliquen el comportamiento de los resultados. Puede ser explicado cómo desarrollar diversas hipótesis (una hipótesis nula y diversas alternas) en un lenguaje matemático y compararlas entre ellas. Para poder comparar estas “hipótesis” (modelos) se utiliza un parámetro de discriminación llamado AIC. El AIC o “criterio de información de Akaike” es una medida de la calidad de un modelo estadístico para un conjunto de datos. Relaciona la bondad de ajuste del modelo y la complejidad del modelo y nos indica si existe diferencia entre nuestros distintos modelos y cuál de ellos es el que explica mejor los datos. Después se escoge el modelo que mejor describa el comportamiento y la variabilidad de los datos. Este modelo es una ecuación matemática a la que se le puede aplicar una regresión lineal que calcule diferentes puntos. Estos puntos se grafican y la figura resultante predice el comportamiento real de los datos.

La aplicación de este análisis a los datos del efecto de la activación de los neutrófilos sobre la expresión de CD13 y CD11b muestra un comportamiento matemático cuadrático, en que inicialmente se observa un aumento de ambos marcadores, llega a un punto máximo alrededor de los 140 a 150 minutos y luego empieza a descender conforme pasa el tiempo. También es claro el efecto del estímulo para CD13. Como se ha demostrado antes<sup>35</sup>, la expresión en membrana de esta proteína aumenta al ser estimulada por IL8 hasta 120 minutos por IL8 seguido por una disminución de la expresión. En la figura 19 la línea morada representa la población sin estímulo por lo que sólo estamos observando cómo afecta la temperatura a la expresión de CD13 en las células incubándolas a 37°C. Los estímulos fMLP, PMA e IL-8 promueven cambios adicionales en la expresión de CD13 en membrana. Por su parte CD11b parece tener una respuesta temprana leve ante el estímulo IL-8 pero claramente tiene una respuesta mayor dependiente del tiempo con los estímulos PMA y fMLP.



Estos resultados muestran que CD13 se expresa en mayor cantidad después de la activación del neutrófilo. Esta activación está dada por la temperatura de incubación, por PMA, fMLP o IL-8. Con el paso del tiempo se llega a un máximo de expresión y después empieza a descender la expresión en membrana. Este comportamiento podría estar dado por la internalización del receptor o la degradación del mismo en la membrana.

## **10.2 Agregación Homotípica**

Una de las peculiaridades del anticuerpo monoclonal 452, específico para CD13, es interesante destacar que este fenómeno no es inducido por otros anticuerpos monoclonales específicos para CD13, como el mAb C.

La agregación homotípica juega un papel imprescindible en diversos procesos fisiológicos como embriogénesis, angiogénesis, procesos inmunológicos, patológicos y cáncer<sup>38</sup>. Se sabe que una de las peculiaridades del anticuerpo monoclonal 452, específico para CD13, es su capacidad de inducir agregación homotípica de células monocíticas humanas<sup>38</sup> y que solo se lleva a cabo este fenómeno con este anticuerpo y no con otros como el mAb C.

La agregación homotípica de monocitos inducida por el entrecruzamiento de CD13 es independiente de la actividad enzimática de CD13. Como se muestra en las micrografías de la tabla 7, el entrecruzamiento de CD13 con el mAb 452 induce el mismo tipo de agregación en neutrófilos humanos. Aunque el tamaño y la cantidad de agregados celulares de neutrófilos son menores a los observados en monocitos, es posible que esto se deba a la cantidad de CD13 que está expresado en la membrana de ambos tipos celulares. Los monocitos usados como control positivo son de la línea U-937 cuya expresión de CD13 en membrana es mayor que la de neutrófilos aislados de sangre periférica.

El estudio de CD13 como molécula de adhesión es un tema poco estudiado y al que se le ha puesto poco interés. Sin embargo, el diseño de este experimento nos ayudó a comparar las similitudes de la molécula y su función en las diferentes estirpes celulares. Al observar la falta de agregación homotípica incubando las células a 4°C sugiere una implicación del inicio de la transducción de señales. El proceso iniciado por el entrecruzamiento de CD13, de alguna manera necesita la temperatura fisiológica para que este fenómeno ocurra de manera óptima. Así, estos datos son congruentes con la idea de considerar a CD13 como un receptor y no sólo como una Aminopeptidasa. Como se ha demostrado<sup>54</sup>, en el proceso de agregación homotípica, los receptores entrecruzados llevan a cabo un proceso de señalización dependiente de PI3K y ERK 1/2 con el uso de los anticuerpos WM-15 y MY7. Sin

embargo no existen evidencias para afirmar esto con el anticuerpo 452 en neutrófilos.

La agregación homotípica como proceso fisiológico es importante para la extravasación y reclutamiento de neutrófilos en los tejidos. CD13 podría estar regulando este proceso por la unión de moléculas pro-inflamatorias o estabilizando y prolongando la agregación homotípica de células en sitios de inflamación<sup>54</sup>.

### **10.3 CD 13 induce la formación de redes extracelulares de neutrófilos**

Considerando la capacidad de CD13 como enzima y como receptor fagocítico en monocitos y macrófagos, es importante determinar si la activación de este receptor en neutrófilos podría desencadenar la NETosis. En este contexto planteamos la hipótesis de que el entrecruzamiento (activación) del receptor CD13 incrementa la liberación de redes extracelulares de neutrófilos.

Desde el descubrimiento de las NETs mucho se ha investigado al respecto tomando en cuenta ser un proceso llamativo y de cierta forma violento para las células. Idealizar a los PMNs como defensores del organismo determinados a darlo todo por el bienestar común ha sido atractivo para muchos investigadores sin mencionar las increíbles estructuras y micrografías que se pueden obtener. Hasta la fecha se han caracterizado diferentes receptores capaces de inducir NETs<sup>8,55</sup>, el mecanismo de formación de las NETs<sup>26,28,56,45</sup>, como actúan en la respuesta inmune<sup>26,57</sup> así como las vías de señalización que están involucradas en su formación<sup>56</sup>. Sin embargo, la APN no ha sido estudiada en este contexto con lo que resulta importante poner énfasis en nuestros resultados que demuestran la capacidad de CD13 para inducir NETs y potenciar la respuesta NETotica.

Los neutrófilos fueron enfrentados a diferentes estímulos que han sido reportados como inductores de trampas extracelulares de neutrófilos. El PMA es uno de los estímulos más populares en la formación de NETs. Funciona como un análogo de diacilglicerol (DAG), lo que activa a la proteína cinasa C (PKC)<sup>8,45</sup>. Por otro lado, el estímulo fMLP no está bien caracterizado respecto a su capacidad de inducir NETs. Su participación se debe a que es productor de especies reactivas de oxígeno (ROS) en neutrófilos, y la producción de NETs está asociada a la formación de ROS<sup>58</sup>. La concentración de fMLP que se ha usado para inducir la formación de NETs es considerablemente más grande que las usadas en este trabajo<sup>59</sup>, sin embargo, la concentración usada en este trabajo es la necesaria para activar diversas vías de señalización en neutrófilos y la necesaria para cambiar la expresión en membrana de CD13. La IL-8 ha sido una citocina usada para inducir NETs<sup>8,60</sup>.

El CXCR1/2, receptor de la IL-8 está acoplado a proteína G y activas vías a través de la cinasa de fosfatidil inositol (PI3K) y a la proteína Ras<sup>44</sup>.

En nuestros experimentos, solamente se formaron redes bajo los estímulos de PMA e IL-8 y su respuesta fue necesaria para compararla con el efecto del entrecruzamiento de CD13. Es importante resaltar que el sólo entrecruzamiento del receptor CD13 es suficiente para iniciar una respuesta en las dos concentraciones más altas. De acuerdo a los resultados obtenidos se promueve la liberación de material genético a partir de los 40 minutos aproximadamente, sin la coestimulación con PMA, fMLP o IL-8. Sin embargo, también logramos determinar que la estimulación de NETosis generada por PMA o IL-8 es potenciada a través de CD13. Hasta donde sabemos, el PMA no tiene relación directa con CD13. En muchos experimentos, la activación generada en las células por esta molécula genera cambios en la expresión de CD13 en diversas líneas celulares. Estos resultados sugieren que CD13 es importante en procesos inflamatorios. Sin embargo aquí se desarrolla de forma contraria. Por si solo, CD13 es capaz de activar a la célula y potenciar la respuesta NETotica si ya fue iniciada por PMA. Es poco probable que el PMA estimule de alguna forma a CD13 directamente pero si puede ser que exista una relación en la vía de señalización de ambos procesos. El caso de IL-8 es similar, aunque es necesario recordar que esta citocina si tiene afinidad directa con la APN, que es capaz de cortarla y regular la actividad de esta proteína en los neutrófilos.

## 11. Conclusiones

En este trabajo demostramos la capacidad de CD13 para mediar funciones efectoras de los leucocitos polimorfonucleares. Tomando en cuenta los resultados mostrados se determinó que el entrecruzamiento con el anticuerpo monoclonal 452 para CD13 induce la agregación homotípica de neutrófilos humanos.

También se demostró que la activación de neutrófilos, medida a través del aumento en la expresión de CD11b de membrana, modifica la expresión de CD13 en membrana. Usando los activadores PMA, fMLP e IL-8 aumenta la expresión en tiempos tempranos de la activación (hasta 150 minutos) para luego disminuir en tiempos tardíos.

Se determinó que el entrecruzamiento de CD13 con el anticuerpo monoclonal 452 (completo: mAb452 y con fragmentos: Fab 452 y F(ab)<sub>2</sub>) induce la formación de redes extracelulares de neutrófilos (NETs), además que las inducidas por PMA e IL-8 es mayor cuando CD13 está entrecruzado con el anticuerpo monoclonal 452.

El conjunto de experimentos y pruebas obtenidas en este trabajo confirman que CD13 es un receptor de la inmunidad innata y demuestran que es capaz de mediar funciones efectoras en neutrófilos humanos. Los diversos estudios realizados en torno a esta proteína han ayudado a observar que la aminopeptidasa N es más que la enzima que se pensaba hace algunos años. CD13 un receptor de la inmunidad innata que es capaz de mediar diversas funciones celulares en procesos inflamatorios. Ahora sabemos que además de suceder en monocitos también ocurre en neutrófilos, los leucocitos más abundantes en el sistema inmunológico.

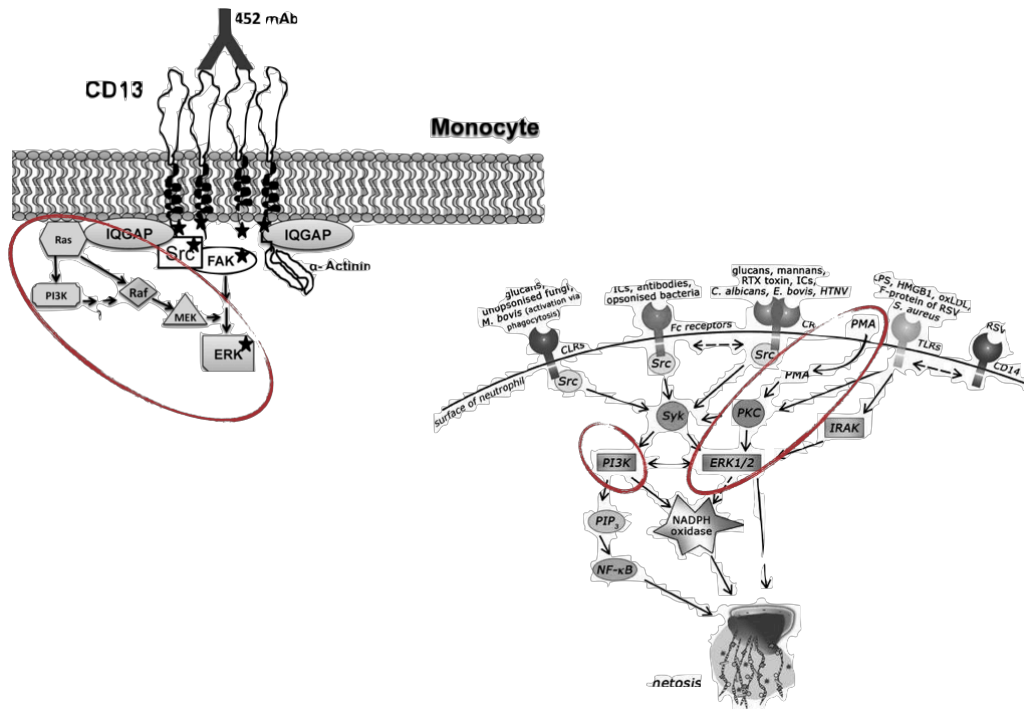
## 12. Perspectivas

En el transcurso de este trabajo se generaron resultados que permitieron dar continuidad al estudio de las funciones y regulación de CD13 en el neutrófilo. Para que en un futuro se pueda regular la respuesta inmune a través de este tipo celular y de esta proteína se deben describir algunas preguntas importantes. Sin ir más lejos, ¿cuál es el ligando natural de esta proteína en el organismo?. Los trabajos citados y los resultados obtenidos muestran como el entrecruzamiento resulta en procesos efectores de las células, sin embargo seguimos en la controversia de que esta activación está dada de manera artificial y “forzada”.

En general, un receptor de membrana cambia su expresión cuando es regulado por la célula, esto se hace para modular la función de dicho receptor de acuerdo a las condiciones de inflamación o respuesta inmunológica. CD13 muestra un cambio en la expresión de los neutrófilos que puede estar sujeto a la regulación de su actividad. Saber a dónde se va CD13 después de la activación celular puede dar indicios de la importancia de la molécula en el organismo. Si es que se elimina de la membrana, ¿qué proceso fisiológico requiere que CD13 no esté presente?. En otro escenario, en el que CD13 se internalice a la célula, habrá que preguntarse: ¿cuál es la función que cumple dentro del organismo?. Ya algunos autores han demostrado la presencia de CD13 intracelular en otras líneas celulares como linfocitos T<sup>61</sup> o células mieloides en procesos cancerígenos<sup>52,62</sup>. Sin embargo la internalización de esta metaloproteasa transmembranal en neutrófilos no está completamente estudiada.

No existen muchos estudios que vinculen a los neutrófilos con CD13 en un proceso celular. Hasta la fecha solamente sabemos su vinculación con la agregación homotípica y la inhibición del proceso apoptótico inducido por TNF $\alpha$ <sup>37</sup>. Ninguno de estos contiene resultados que sugieran que sucede dentro de la célula a lo largo de la respuesta de la APN.

La liberación de ADN con PMA o IL-8 resulta en una intensidad fluorescencia reproducible en los experimentos. Al entrecruzar CD13 en la membrana de las células, hay un aumento significativo de la fluorescencia que es mayor a la obtenida sólo por los estímulos. Este resultado sugiere un punto en el que converjan la señalización del proceso de NETosis y la activación de CD13 provocando una potenciación en la respuesta. La figura 37 muestra las vías de señalización sugeridas de la activación de CD13<sup>63</sup> y NETosis<sup>56</sup>.



**Figura 34.** Vías de señalización de CD13 y NETosis. La figura A muestra la posible vía de señalización de CD13 sugerida por Subramani et al. La figura B muestra las vías de señalización más relevantes para la formación de NETs de acuerdo a la publicación de Zawrotniak et al. Las elipses marcadas de color rojo muestran un posible punto de intersección en ambas vías de señalización.

El entrecruzamiento de CD13 resulta en la agregación de esta glicoproteína, paso crucial para la activación de receptores. Después de su activación se cree que sigue la vía de Ras a través de Src. Esta vía utiliza PI3K hasta llegar a ERK. Una sugerencia que involucra a CD13 con el proceso de NETosis está marcada en la figura 34. Las cinasas PI3K y ERK pueden estar compartidas para ambos procesos y el estudio de la vía de señalización de CD13 en neutrófilos podría ayudar a esclarecer la importancia de este receptor en otros procesos efectoros del sistema inmunológico.

## 13. Bibliografía

1. Licona-Limón I, Garay-Canales CA, Muñoz-Paletta O, Ortega E. CD13 mediates phagocytosis in human monocytic cells. *J Leukoc Biol.* 2015;98(1):85-98. doi:10.1189/jlb.2a0914-458r
2. Mina-Osorio P, Ortega E. Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcγRs in human monocytes. *J Leukoc Biol.* 2005;77(6):1008-1017. doi:10.1189/jlb.1204714
3. Kindt TJ, Goldsby R. *Inmunología de Kuby.* 6ª. Madrid: McGraw Hill; 2007.
4. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(4):253-268. doi:10.1038/nri3175
5. Terstappen LW, Safford M, Loken MR. Flow cytometric analysis of human bone marrow. III. Neutrophil maturation. *Leukemia.* 1990;4(9):657-663.
6. Condliffe AM, Singh N, Chilvers ER, Summers C, Peters AM, Rankin SM. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 2010;31(8):318-324. doi:10.1016/j.it.2010.05.006
7. Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A, Amulic B. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu Rev Immunol.* 2012;30(1):459-489. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074942
8. Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science (80- ).* 2004;303(5663):1532-1535. doi:10.1126/science.1092385
9. Murphy K, Travers P, Walport M. *Inmunobiología de Janeway.* CDMX: McGraw Hill; 2004.
10. Akira S. Toll-like Receptor Signaling. *J Biol Chem.* 2003;278(40):38105-38108. doi:10.1074/jbc.R300028200
11. Krisztina Futosi, Szabina Fodor, Attila Mócsai. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol.* 2013;17:638-650. doi:doi: 10.1016/j.intimp.2013.06.034
12. van Kooyk Y. C-Type Lectin Receptors on Dendritic Cells. In: *Animal Lectins.* ; 2010. doi:10.1201/9781420006971.ch24
13. Ekman A-K, Cardell LO. The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. *Immunology.* 2010;130(1):55-63. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03212.x
14. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev Y V. CD68/macrosialin: Not just a histochemical marker. *Lab Invest.* 2017;97(1):4-13. doi:10.1038/labinvest.2016.116
15. Migeotte I, Communi D, Parmentier M. Formyl peptide receptors: A promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17(6):501-519. doi:10.1016/j.cytogfr.2006.09.009
16. Lacy P. The role of Rho GTPases and SNAREs in mediator release from granulocytes. *Pharmacol Ther.* 2005;107(3):358-376. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.03.008

17. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 2003;5(14):1317-1327. doi:10.1016/j.micinf.2003.09.008
18. Miller R, Geisow M, Segal AW, Garcia R, Harper A. The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature.* 2004;290(5805):406-409. doi:10.1038/290406a0
19. Firestein G, Budd R, Gabriel S, McInnes I. *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology.*; 2016. doi:10.1016/c2013-1-19259-3
20. Detmers PA, Zhou D, Powell D, Lichenstein H, Kelley M, Pironkova R. Endotoxin receptors (CD14) are found with CD16 (Fc gamma RIII) in an intracellular compartment of neutrophils that contains alkaline phosphatase. *J Immunol.* 1995;155(4):2085-2095.
21. Segal AW. How Neutrophils Kill Microbes. *Annu Rev Immunol.* 2005;23(1):197-223. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653
22. Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol.* 2004;16(1):42-47. doi:10.1016/j.coi.2003.12.001
23. Quinn MT, Gauss KA. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol.* 2004;76(4):760-781. doi:10.1189/jlb.0404216
24. Zhou Y, An L-L, Chaerkady R, et al. Evidence for a direct link between PAD4-mediated citrullination and the oxidative burst in human neutrophils. *Sci Rep.* 2018;8(1):15228. doi:10.1038/s41598-018-33385-z
25. Belohradsky BH, Marcos V, Wiedenbauer E-M, et al. CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nat Med.* 2010;16(9):1018-1023. doi:10.1038/nm.2209
26. Díaz-Godínez C, Carrero JC. The state of art of neutrophil extracellular traps in protozoan and helminthic infections. *Biosci Rep.* 2018;39(1):BSR20180916. doi:10.1042/bsr20180916
27. McGreal EP, Davies PL, Powell W, et al. Inactivation of IL-6 and soluble IL-6 receptor by neutrophil derived serine proteases in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2010;1802(7-8):649-658. doi:10.1016/j.bbdis.2010.04.005
28. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010;191(3):677-691. doi:10.1083/jcb.201006052
29. Danielsen EM. The Enzymes of the Enterocyte PLasma Membrane. In: *Molecular and Cellular Basis of Digestion.* ; 1986:335-365.
30. Semenza G. Anchoring and Biosynthesis of Stalked Brush Border Membrane Proteins: Glycosidases and Peptidases of Enterocytes and Renal Tubuli. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;2(1):255-313. doi:10.1146/annurev.cellbio.2.1.255



31. Matsas R, Kenny AJ, Turner AJ. The metabolism of neuropeptides. The hydrolysis of peptides, including enkephalins, tachykinins and their analogues, by endopeptidase-24.11. *Biochem J.* 1984;223(2):433-440. doi:10.1042/bj2230433
32. Wong AHM, Zhou D, Rini JM. The x-ray crystal structure of human aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing. *J Biol Chem.* 2012;287(44):36804-36813. doi:10.1074/jbc.M112.398842
33. Wickström M, Larsson R, Nygren P, Gullbo J. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Sci.* 2011;102(3):501-508. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01826.x
34. Ashmun RA, Look AT. Metalloprotease activity of CD13/aminopeptidase N on the surface of human myeloid cells. *Blood.* 1990;75(2):462-469. <http://www.bloodjournal.org/content/75/2/462.short>. Accessed February 22, 2019.
35. Kanayama N, Kajiwara Y, Goto J, et al. Inactivation of interleukin-8 by aminopeptidase N (CD13). *J Leukoc Biol.* 1995;57(1):129-134. doi:10.1002/jlb.57.1.129
36. Rokudai A, Kuniyoshi R, Hatake K, et al. Continuous treatment of bestatin induces anti-angiogenic property in endothelial cells. *Cancer Sci.* 2007;98(3):364-372. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00393.x
37. Sobolewski A, Murray J, Bradley JR, et al. Aminopeptidase N (CD13) Regulates Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -induced Apoptosis in Human Neutrophils. *J Biol Chem.* 2006;281(18):12458-12467. doi:10.1074/jbc.m511277200
38. Mina-Osorio P. CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells. *J Leukoc Biol.* 2006;79(4):719-730. doi:10.1189/jlb.0705425
39. Daëron M. Fc RECEPTOR BIOLOGY. *Annu Rev Immunol.* 2002;15(1):203-234. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.203
40. Kuijpers TW, Tool AT, van der Schoot CE, et al. Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation. *Blood.* 1991;78(4):1105 LP-1111.
41. Tarek Elghetany M. Surface Antigen Changes during Normal Neutrophilic Development : A Critical Review. *Blood Cells, Mol Dis.* 2002;28(2):260-274. doi:10.1006/bcmd.2002.0513
42. Fifadara N, Nagarajan S, Selvaraj P, Wang G, Cimino A. Functional Regulation of Human Neutrophil Fc  $\gamma$  Receptors. *Immunol Res.* 2004;29(1-3):219-230. doi:10.1385/ir:29:1-3:219
43. Detmers PA. Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med.* 1990;171(4):1155-1162. doi:10.1084/jem.171.4.1155
44. Campbell LM, Maxwell PJ, Waugh DJJ. ( *CXCL8* ) *Signaling in Cancer.*; 2013. doi:10.3390/ph6080929

45. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007;176(2):231-241. doi:10.1083/jcb.200606027
46. Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci.* 2007;13(13):2400. doi:10.2741/2853
47. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(8):519-531. doi:10.1038/nri3024
48. Akaike H. A New Look at the Statistical Model Identification. *IEEE Trans Automat Contr.* 1974;19(6):716-723. doi:10.1109/TAC.1974.1100705
49. Stolk J, Hiltermann TJ, Dijkman JH, Verhoeven AJ. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994;11(1):95-102. doi:10.1165/ajrcmb.11.1.8018341
50. Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ.* 2011;18(4):581-588. doi:10.1038/cdd.2011.1
51. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber ANR, et al. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathog.* 2015;11(3):1-22. doi:10.1371/journal.ppat.1004651
52. Riemann D, Kehlen A, Langner J. CD13 - Not just a marker in leukemia typing. *Immunol Today.* 1999;20(2):83-88. doi:10.1016/S0167-5699(98)01398-X
53. Hart SP, Ross JA, Ross K, Haslett C, Dransfield I. Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophils: Implications for functional downregulation and recognition by phagocytes. *Cell Death Differ.* 2000;7(5):493-503. doi:10.1038/sj.cdd.4400680
54. Cowburn AS, Murphy G, Parfrey H, et al. The Aminopeptidase CD13 Induces Homotypic Aggregation in Neutrophils and Impairs Collagen Invasion. Gaggar A, ed. *PLoS One.* 2016;11(7):e0160108. doi:10.1371/journal.pone.0160108
55. Alemán OR, Mora N, Cortes-Vieyra R, Uribe-Querol E, Rosales C. Differential Use of Human Neutrophil Fc  $\gamma$  Receptors for Inducing Neutrophil Extracellular Trap Formation. *J Immunol Res.* 2016;2016. doi:10.1155/2016/2908034
56. Zawrotniak M, Kozik A, Rapala-Kozik M. Neutrophil Extracellular Traps in Infectious Human Diseases. In: *Role of Neutrophils in Disease Pathogenesis.* ; 2017. doi:10.5772/intechopen.68443
57. Desai J, Mulay SR, Nakazawa D, Anders HJ. Matters of life and death. How neutrophils die or survive along NET release and is "NETosis" = necroptosis? *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(11-12):2211-2219. doi:10.1007/s00018-016-2195-0
58. Cherry A, Kahr WHA, Licht C, et al. NETosing Neutrophils Activate Complement Both on Their Own NETs and Bacteria via Alternative and Non-alternative Pathways. *Front Immunol.* 2016;7. doi:10.3389/fimmu.2016.00137

59. Tillack K, Breiden P, Martin R, Sospedra M. T Lymphocyte Priming by Neutrophil Extracellular Traps Links Innate and Adaptive Immune Responses. *J Immunol*. 2012;188(7):3150-3159. doi:10.4049/jimmunol.1103414
60. Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Gebhardt S, Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum Immunol*. 2005;66(11):1146-1154. doi:10.1016/j.humimm.2005.11.003
61. Riemann D, Schwachula A, Hentschel M, Langner J. Demonstration of CD13/Aminopeptidase N on Synovial Fluid T Cells from Patients with Different Forms of Joint Effusions. *Immunobiology*. 1993;187(1-2):24-35. doi:10.1016/S0171-2985(11)80243-3
62. Schneider C, Bayerl M, Boyer C, Desai R, Claxton D, Van de Louw A. Increased CD13 Expression in Acute Myeloid Leukemia-associated Early Acute Hypoxic Respiratory Failure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;196(8):1077-1080. doi:10.1164/rccm.201701-0080LE
63. Rezaul K, Subramani J, Shapiro LH, et al. Tyrosine Phosphorylation of CD13 Regulates Inflammatory Cell-Cell Adhesion and Monocyte Trafficking. *J Immunol*. 2013;191(7):3905-3912. doi:10.4049/jimmunol.1301348

## 14. Apéndices

### 14.1 Modelos lineales de efectos mixtos usados para el análisis de la expresión de CD13 en membrana

#### Respuestas lineales

Modelo nulo:

```
cd13.1 <- lme (fluo ~ 1, random = ~ 1 | ind, data = bd [which (bd$marcador == "cd13"), ], na.action = na.exclude)
```

Sólo interacción con el tiempo:

```
cd13.2 <- lme (fluo ~ tiempo, random = ~ 1 | ind, data = bd [which (bd$marcador == "cd13"), ], na.action = na.exclude)
```

Sólo interacción con el estímulo:

```
cd13.3 <- lme (fluo ~ est, random = ~ 1 | ind, data = bd [which (bd$marcador == "cd13"), ], na.action = na.exclude)
```

Estímulo y Tiempo sin interacción entre sí, pero con injerencia en la fluorescencia:

```
cd13.4 <- lme (fluo ~ tiempo + est, random = ~ 1 | ind, data = bd [which (bd$marcador == "cd13"), ], na.action = na.exclude)
```

```
cd13.5 <- lme (fluo ~ tiempo + tiempo:est, random = ~ 1 | ind, data = bd [which (bd$marcador == "cd13"), ], na.action = na.exclude)
```

```
cd13.6 <- lme (fluo ~ est + tiempo:est, random = ~ 1 | ind, data = bd [which (bd$marcador == "cd13"), ], na.action = na.exclude)
```

```
cd13.7 <- lme (fluo ~ tiempo + est + tiempo:est, random = ~ 1 | ind, data = bd [which (bd$marcador == "cd13"), ], na.action = na.exclude)
```

#### Respuestas cuadráticas

Sólo interacción con el tiempo

```
cd13.8 <- lme (fluo ~ poly (tiempo, 2), random = ~ 1 | ind, data = bd [which (bd$marcador == "cd13"), ], na.action = na.exclude)
```

## Respuestas cuadráticas (asimétricos)

Estímulo y tiempo con interacción:

```
cd13.9 <- lmer (fluo ~ poly (tiempo, 2) + est + (1 | ind), data = bd [which (bd$marcador == "cd13"), ], na.action = na.exclude)
```

```
cd13.10 <- lmer (fluo ~ poly (tiempo, 2) + tiempo:est + (1 | ind), data = bd [which (bd$marcador == "cd13"), ], na.action = na.exclude)
```

```
cd13.11 <- lmer (fluo ~ poly (tiempo, 2) + est + tiempo:est + (1 | ind), data = bd [which (bd$marcador == "cd13"), ], na.action = na.exclude)
```

## 14.2 Modelos lineales de efectos mixtos usados para el análisis de la expresión de CD11b en membrana

### Respuestas lineales

Modelo Nulo:

```
cd11.1 <- lme (fluo ~ 1, random = ~ 1 | ind, data = bd [which (bd$marcador == "cd11b"), ], na.action = na.exclude)
```

Sólo interacción con el tiempo:

```
cd11.2 <- lme (fluo ~ tiempo, random = ~ 1 | ind, data = bd [which (bd$marcador == "cd11b"), ], na.action = na.exclude)
```

Sólo interacción con el estímulo:

```
cd11.3 <- lme (fluo ~ est, random = ~ 1 | ind, data = bd [which (bd$marcador == "cd11b"), ], na.action = na.exclude)
```

Estímulo y Tiempo sin interacción entre sí, pero con injerencia en la fluorescencia:

```
cd11.4 <- lme (fluo ~ tiempo + est, random = ~ 1 | ind, data = bd [which (bd$marcador == "cd11b"), ], na.action = na.exclude) # Modelo est y tiempo sin interacci??n
```

```
cd11.5 <- lme (fluo ~ tiempo + tiempo:est, random = ~ 1 | ind, data = bd [which (bd$marcador == "cd11b"), ], na.action = na.exclude) # Modelo est y tiempo sin interacci??n
```

```
cd11.6 <- lme (fluo ~ est + tiempo:est, random = ~ 1 | ind, data = bd [which (bd$marcador == "cd11b"), ], na.action = na.exclude) # Modelo est y tiempo sin interacci??n
```

```
cd11.7 <- lme (fluo ~ tiempo + est + tiempo:est, random = ~ 1 | ind, data = bd [which (bd$marcador == "cd11b"), ], na.action = na.exclude) # Modelo est y tiempo sin interacci??n
```

## Respuestas cuadráticas

Sólo interacción con el tiempo

```
cd11.8 <- lme (fluo ~ poly (tiempo, 2), random = ~ 1 | ind, data = bd [which  
(bd$marcador == "cd11b"), ], na.action = na.exclude)
```

## Respuestas cuadráticas (asimétricos)

Estímulo y tiempo con interacción:

```
cd11.9 <- lmer (fluo ~ poly (tiempo, 2) + est + (1 | ind), data = bd [which (bd$marcador  
== "cd11b"), ], na.action = na.exclude) # Modelo est y tiempo sin interacci??n
```

```
cd11.10 <- lmer (fluo ~ poly (tiempo, 2) + tiempo:est + (1 | ind), data = bd [which  
(bd$marcador == "cd11b"), ], na.action = na.exclude) # Modelo est y tiempo sin  
interacci??n
```

```
cd11.11 <- lmer (fluo ~ poly (tiempo, 2) + est + tiempo:est + (1 | ind), data = bd [which  
(bd$marcador == "cd11b"), ], na.action = na.exclude) # Modelo est y tiempo sin  
interacci??n
```

### 14.3 Modelos lineales de efectos mixtos usados para el análisis de la formación de NETs entrecruzando a CD13 con mAb452 o Fab452

Comparación de Modelos

Modelo Nulo:

```
fit0 <- lmer (Fluo ~ poly (Tiempo, 3) + (1 | Ind))
```

Modelos Lineales:

```
fit1 <- lmer (Fluo ~ poly (Tiempo, 3) + Conc + (1 | Ind))
```

```
fit2 <- lmer (Fluo ~ poly (Tiempo, 3) * Conc + (1 | Ind))
```

Modelos Cuadráticos:

```
fit3 <- lmer (Fluo ~ poly (Tiempo, 3) + poly (Conc, 2) + (1 | Ind))
```

```
fit4 <- lmer (Fluo ~ poly (Tiempo, 3) * poly (Conc, 2) + (1 | Ind))
```

Modelos Cúbicos:

```
fit5 <- lmer (Fluo ~ poly (Tiempo, 3) + poly (Conc, 3) + (1 | Ind))
```

```
fit6 <- lmer (Fluo ~ poly (Tiempo, 3) * poly (Conc, 3) + (1 | Ind))
```



#### 14.4 Modelos lineales de efectos mixtos usados para el análisis de la formación de NETs entrecruzando a CD13 con mAb 452 o Fab452 y algún estímulo (PMA, fMLP o IL8)

\*Se presentan los modelos para la formación de redes estimulando a los PMNs con PMA y entrecruzando con mAb452. Sin embargo, las demás combinaciones con Fab 452, fMLP e IL8 usaron los mismos modelos con sus respectivas bases de datos.

Modelo Nulo:

```
fit0 <- glmer (Fluo + 300 ~ poly (Tiempo, 3) + mAb + PMA + (1 | Ind), family = Gamma, data = data)
```

Modelos Lineales:

```
fit1 <- glmer (Fluo + 300 ~ poly (Tiempo, 3) + Conc + mAb + PMA + (1 | Ind))
```

```
fit2 <- glmer (Fluo + 300 ~ poly (Tiempo, 3) * Conc + mAb + PMA + (1 | Ind))
```

Modelos Cuadráticos:

```
fit3 <- glmer (Fluo + 300 ~ poly (Tiempo, 3) + poly (Conc, 2) + mAb + PMA + (1 | Ind))
```

```
fit4 <- glmer (Fluo + 300 ~ poly (Tiempo, 3) * poly (Conc, 2) + mAb + PMA + (1 | Ind))
```

```
fit5 <- glmer (Fluo + 300 ~ poly (Tiempo, 3) + poly (Conc, 3) + mAb + PMA + (1 | Ind))
```

Modelos Cuadráticos:

```
fit6 <- glmer (Fluo + 300 ~ poly (Tiempo, 2) * poly (Conc, 3) + mAb + PMA + (1 | Ind), family = gaussian(link = "identity"), data = data)
```

```
fit7 <- glmer (Fluo + 300 ~ poly (Tiempo, 2) * Trat + Conc + (1 | Ind), family = gaussian (link = "identity"), data = data)
```

```
fit8 <- glmer (Fluo + 300 ~ poly (Tiempo, 2) * Conc + (1 | Ind), family = gaussian (link = "identity"), data = data)
```

```
fit9 <- glmer (Fluo + 300 ~ poly (Tiempo, 2) * poly (Conc,2) + (1 | Ind), family = gaussian (link = "identity"), data = data)
```

```
fit10 <- glmer (Fluo + 300 ~ poly (Tiempo, 2) * poly (Conc,3) + (1 | Ind), family = gaussian (link = "identity"), data = data)
```

Modelos Cúbicos:

```
fit11 <- glmer (Fluo + 300 ~ poly (Tiempo, 3) * poly (Conc, 3) + mAb + PMA + (1 | Ind), family = gaussian(link = "identity"), data = data)
```

```
fit12 <- glmer (Fluo + 300 ~ poly (Tiempo, 3) * Trat + (1 | Ind), family = gaussian (link = "identity"), data = data)
```

```
fit13 <- glmer (Fluo + 300 ~ poly (Tiempo, 3) * Conc + (1 | Ind), family = gaussian (link = "identity"), data = data)
```

```
fit14 <- glmer (Fluo + 300 ~ poly (Tiempo, 3) * poly (Conc,2) + (1 | Ind), family = gaussian (link = "identity"), data = data)
```

```
fit15 <- glmer (Fluo + 300 ~ poly (Tiempo, 3) * poly (Conc,3) + (1 | Ind), family = gaussian (link = "identity"), data = data)
```

Modelos Polinomiales:

```
fit16 <- glmer (Fluo + 300 ~ poly (Tiempo, 4) * poly (Conc, 3) + mAb + PMA + (1 | Ind), family = gaussian(link = "identity"), data = data)
```

```
fit17 <- glmer (Fluo + 300 ~ poly (Tiempo, 4) * Trat + Conc + (1 | Ind), family = gaussian (link = "identity"), data = data)
```

```
fit18 <- glmer (Fluo + 300 ~ poly (Tiempo, 4) * Conc + (1 | Ind), family = gaussian (link = "identity"), data = data) # C??bico
```

```
fit19 <- glmer (Fluo + 300 ~ poly (Tiempo, 4) * poly (Conc,2) + (1 | Ind), family = gaussian (link = "identity"), data = data)
```

```
fit20 <- glmer (Fluo + 300 ~ poly (Tiempo, 4) * poly (Conc,3) + (1 | Ind), family = gaussian (link = "identity"), data = data)
```