



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Posgrado en Ciencias Biológicas

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Biología Experimental

Neutrófilos de baja densidad de donadores sanos muestran un fenotipo activado

TESIS

Que para optar por el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

Biol. José Carlos Blanco Camarillo

Director de tesis: Dr. Carlos Rosales Ledezma

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Comité tutor: Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés, UBIMED FES Iztacala, UNAM

Dra. Gladis del Carmen Fragoso González, Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
UNAM

Ciudad Universitaria, CD.MX. Diciembre de 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.





# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Posgrado en Ciencias Biológicas

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Biología Experimental

Neutrófilos de baja densidad de donadores sanos muestran un fenotipo activado

TESIS

Que para optar por el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

Biol. José Carlos Blanco Camarillo

Director de tesis: Dr. Carlos Rosales Ledezma

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Comité tutor: Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés, UBIMED FES Iztacala, UNAM

Dra. Gladis del Carmen Fragosó González, Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
UNAM

Ciudad Universitaria, México CD.MX. Diciembre de 2019

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

OFICIO CPCB /1226/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

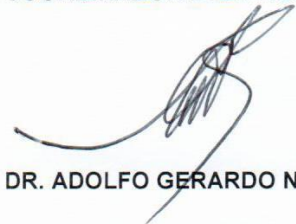
Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de octubre de 2019 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **BLANCO CAMARILLO JOSÉ CARLOS** con número de cuenta **309049197** con la tesis titulada **“NEUTRÓFILOS DE BAJA DENSIDAD DE DONADORES SANOS MUESTRAN UN FENÓTIPO ACTIVADO”**, realizada bajo la dirección del **DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES  
Vocal: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
Secretario: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ  
Suplente: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ  
Suplente: DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**  
**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 12 de noviembre del 2019

COORDINADOR DEL PROGRAMA



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



Este trabajo de tesis de maestría se realizó en el departamento de inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la dirección del **Dr. Carlos Rosales Ledezma**, con apoyo del **proyecto 254434** otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca No. 817515 que me otorgó para mis estudios de posgrado. También agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), UNAM, por el apoyo que me otorgó para asistir al congreso XXXII Congreso Nacional de Bioquímica, Guerrero.

A mi tutor, Dr. Carlos Rosales Ledezma por brindarme apoyo, guía y confianza en la elaboración de mi tesis. Su conocimiento me motivo e impulso en mi formación, lo admiro mucho.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Gladis Del Carmen Fragosó González y Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés por su ayuda y sus valiosos consejos durante mi posgrado.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por brindarme la hermosa oportunidad de formar parte de su comunidad para estudiar y desarrollarme profesionalmente.

Al **Dr. Carlos Rosales Ledezma** por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de laboratorio, por la confianza, paciencia y el apoyo académico para la realización de esta tesis. Por sus sabios consejos, muchas gracias.

A la **M. en IBB. Nancy Yorley Mora Pérez** por todo su apoyo como técnico de laboratorio que me otorgó durante la realización de esta tesis.

Al **M. en C. Omar Rafael Alemán Muñoz** por guiarme durante mi desarrollo de la maestría y su amistad.

Al **Sr. Osvaldo Martínez Garay** por su apoyo como laboratorista

A todas las personas que me donaron sangre, fueron indispensables para la realización de mis experimentos



## DEDICATORIA

A mis padres, Jacqueline Camarillo e Hilario Blanco por ser mis pilares de apoyo en todo momento, por siempre estar a mí lado en las buenas y en las malas. Gracias por toda la confianza que me han brindado, todas sus enseñanzas, regaños y consejos los tengo presentes pues me han formado como la persona soy ahora, son los mejores papás. Muchas gracias por todo, saben que los admiro demasiado y los amo mucho.

A mi hermano y mi mejor amigo Juan, la persona más responsable y dedicada que conozco, gracias por ser siempre mi ejemplo, por tan buenos consejos que siempre me has brindado y por darme ánimos para seguir adelante. Por tantas risas y vivencias juntos. Te quiero mucho gordillo, te prometo que siempre serás mi chavo en todos los videojuegos.

A Patito, tu ayuda ha sido fundamental. Gracias por que siempre me motivas y ayudas con todas tus palabras y consejos, no solo para el desarrollo de mi tesis, sino también para mi vida; eres mi inspiración y mi motivación. Te amo Carolina.

A mi Tía Rita, mi abuelito Toño y a mi segundo hermano Luis por siempre estar ahí con su apoyo incondicional. A Alan, Zoe, Emi y Ángel por su alegría y risas. A mis Abuelitos Juan y Bertha por todo su cariño y sus consejos. A Todos mis tíos y primos.

A mis amigos: Flex Torres, Benja Moya, Tona Villanueva, Marco Reza, Lalo Vega, Jonny Muñoz, Michelle Becerril, Eva Solares, Brownie Lombardo, Pera Torres y Richi Soriano, gracias por todas esas anécdotas juntos, su amistad y compañía. A mis amigos de la universidad: Jorge Flores, Sandy Guadarrama, Itzelita Cadena, Deivid Avilés, el feo de Humberto Medina, Ferry Lozoya, Cris Martínez, a mi bro Iván Carranza, Efraín Olguín. Cada uno de ustedes formó parte de lo que soy ahora, Gracias por su amistad y apoyo.

A mis amigos del laboratorio: Rafa Alemán, Vale Eliosa, Julio Rojas, Zayda Fonseca, Alan Izalde, Nancy Mora, Martín Arcique, Alan Osegueda, Fabi, Devi, Fer, Nath, Cindy Dany y Anita; muchas gracias por todo su apoyo dentro y fuera del laboratorio, por hacer más ameno el trabajo de laboratorio.

***A mis padres y a mi hermano  
son mi ejemplo y mi admiración.***

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>I. ABREVIATURAS</b> .....	14
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	15
1. Neutrófilos.....	15
2. Reclutamiento de neutrófilos.....	19
3. Activación de neutrófilos.....	23
4. Mecanismos de acción.....	24
4.1. Fagocitosis.....	25
4.2. Estallido respiratorio.....	26
4.3. Degranulación.....	28
4.4. Trampas extracelulares de neutrófilos.....	29
5. Neutrófilos, una población heterogénea.....	31
5.1. Neutrófilos de baja densidad.....	32
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	36
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	36
<b>V. OBJETIVO GENERAL</b> .....	36
<b>VI. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	37
<b>VII. METODOLOGÍA</b> .....	37
1. Obtención de sangre.....	37
2. Separación de células por gradiente de densidad.....	36
3. Tinción directa por moléculas de superficie.....	38
4. Ensayo de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	39
5. Separación celular (cell sorting) por citometría de flujo.....	40

6. Ensayo de producción de NETs.....	40
7. Opsonización de microperlas.....	41
8. Ensayo de fagocitosis.....	41
VIII. <b>RESULTADOS</b> .....	43
1. Caracterización de los neutrófilos de baja densidad.....	43
2. Los neutrófilos de baja densidad tienen aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno.....	52
3. Los neutrófilos de baja densidad tienen mayor capacidad de fagocitosis que los neutrófilos.....	55
4. Los neutrófilos de baja densidad son capaces de producir trampas extracelulares de neutrófilos (NET).....	63
IX. <b>DISCUSIÓN</b> .....	65
X. <b>CONCLUSIONES</b> .....	74
XI. <b>PERSPECTIVAS</b> .....	75
XII. <b>REFERENCIAS</b> .....	76

## RESUMEN

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en el torrente sanguíneo y corresponden al rededor del 50-70% de los leucocitos. Los neutrófilos son las primeras células que migran a los sitios de infección o inflamación para eliminar patógenos y remover restos celulares. Los mecanismos que emplean los neutrófilos para eliminar patógenos incluyen fagocitosis, degranulación, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). La purificación de neutrófilos se realiza tradicionalmente separando los leucocitos en un gradiente de densidad con Ficoll. En estas condiciones los neutrófilos aparecen en el fondo del gradiente y las células mononucleares (MNC) en la parte alta de baja densidad.

Sin embargo, recientemente se ha reportado que en ratones con cáncer hay neutrófilos junto con las MNC. A estos neutrófilos se les ha denominado neutrófilos de baja densidad (LDN) y también se han observado en personas con ciertas patologías como lupus, artritis reumatoide, psoriasis, infección con VIH, malaria y tuberculosis. Actualmente se desconoce si los neutrófilos de baja densidad se encuentran únicamente bajo ciertas patologías o si se podrían encontrar en personas sanas y de ser así, si podrían tener diferencias funcionales con los neutrófilos.

En este trabajo se detectó la presencia de neutrófilos de baja densidad en donadores sanos, los LDN correspondieron al  $5,549 \pm 0,7479\%$  del total de las MNC. También se evaluó la producción de ROS de los LDN por citometría de flujo y se observó que los neutrófilos de baja densidad al ser estimulados con PMA son capaces de producir ROS más de dos veces en comparación con los neutrófilos, además, los LDN tienen un mayor porcentaje de células fagocíticas de  $81.38 \pm 3.297\%$  a diferencia de los neutrófilos con  $69.52 \pm 1.082\%$  de células fagocíticas. Asimismo, los LDN tienen la capacidad de producir NETs de manera similar a los neutrófilos clásicos. Estos datos muestran que en individuos sanos existe una subpoblación de neutrófilos de baja densidad con un fenotipo previamente activado.

## ABSTRACT

Neutrophils, also known as polymorphonuclear cells (PMN), are the most abundant leukocytes in human blood and comprise around 50%-70%. PMN are the first cells to migrate into sites of infection or inflammation, in order to eliminate microbial pathogens. The antimicrobial mechanisms of neutrophils include phagocytosis, degranulation, production of reactive oxygen species (ROS), and the release of neutrophil extracellular traps (NETs). Traditionally, neutrophils are purified from blood by a density gradient with Ficoll. In this method, neutrophils appear at the bottom of the gradient, while mononuclear cells (MNC) appear above in a lower density layer.

Nevertheless, recent reports indicate that in cancer mouse models there are neutrophils that co-purify with MNC in the low density part of the gradient. These neutrophils have been named "low-density neutrophils" (LDN). These low-density neutrophils are not exclusive of cancer, in fact LDN have been found in patients with certain pathologies such as systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, psoriasis, HIV infection, malaria, and tuberculosis. It is not known whether these low-density neutrophils are found in sick patients or are also present in healthy individuals

In order to determine the presence of low-density neutrophils in healthy people, and to evaluate their functional phenotype, neutrophils were purified by density gradient and the MNC layer was analyzed for the presence of neutrophils. Low-density neutrophils were found in healthy donors, comprising  $5,549 \pm 0,7479\%$  of all cells in the MNC layer. The phagocytic activity and capacity to produce reactive oxygen species (ROS) was measured by flow cytometry. Low-density neutrophils when stimulated with PMA produced ROS more than twice than neutrophils, low-density neutrophils have more phagocytic cells around of  $81.38 \pm 3.297\%$  able to phagocytize antibody-opsonized while neutrophils have  $69.52 \pm 1.082\%$  of phagocytic cells. Also, the LDN can produce NETs like classic neutrophils. These data show that low-density neutrophils in healthy individuals are a subpopulation on neutrophils with an activated phenotype.

## I. ABREVIATURAS

Antígeno asociado a función de linfocito-1.....	(LFA-1)
Células mononucleares.....	(MNC)
Elastasa del neutrófilo.....	(NE)
Especies reactivas de oxígeno.....	(ROS)
Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ .....	(TNF- $\alpha$ )
Factor derivado de células estromales.....	(SDF)
Factor estimulante de colonias granulosa.....	(G-CSF)
Granulocitos de baja densidad.....	(LDG)
Interleucina.....	(IL)
Ligando de E-selectina-1.....	(ESL-1)
Ligando glicoproteico de P-selectina-1.....	(PSGL-1)
Mieloperoxidasa.....	(MPO)
Miristato acetato de forbol.....	(PMA)
Molécula de adhesión intracelular-1.....	(ICAM-1)
Molécula de adhesión selectiva a célula endoteliales.....	(ESAM)
Moléculas de adhesión de unión.....	(JAM)
Neutrófilos de baja densidad.....	(LDN)
Patrones moleculares asociados a daño.....	(DAMPs)
Patrones moleculares asociados a patógenos.....	(PAMPs)
Polimorfonucleares.....	(PMN)
Precusores de granulocitos/monocitos.....	(PGM)
Receptor de lectina tipo C.....	(CLR)
Receptor de macrófago-1.....	(MAC-1)
Receptor de poliovirus.....	(PVR)
Receptor de tipo Toll.....	(TLR)
Receptor para G-CSF.....	(G-CSFR)
Receptores de reconocimiento de patrones.....	(PRRs)
Trampas extracelulares de neutrófilos.....	(NETs)

## II. INTRODUCCIÓN

### 1. Neutrófilos

El sistema inmunológico tiene como función fisiológica proteger al huésped de infecciones. Esta función se manifiesta cuando existe la presencia de patógenos o tejidos dañados (Selders et al., 2017). Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en circulación sanguínea y la primera línea de defensa reclutada del torrente sanguíneo hacia los tejidos donde hay inflamación o infección (Nathan, 2006; Yang et al., 2017).

Los neutrófilos, nombrados así por Paul Ehrlich por su capacidad de retener los colorantes neutros (Amulic et al., 2012), también fueron descritos como polimorfonucleares (PMN) por Elie Metchnikoff debido a la morfología multi-lobulada de sus núcleos (Kumar and Sharma, 2010). De hecho recientemente se ha propuesto que su núcleo multilobulado facilita mejor la migración de los neutrófilos de torrente sanguíneo hacia los tejidos en comparación con células que poseen núcleo esférico (Carvalho et al., 2015; Hoffmann et al., 2007). Asimismo, los neutrófilos están incluidos dentro del grupo de los granulocitos (leucocitos granulares), junto con los eosinófilos y los basófilos, ya que se caracterizan por tener un citoplasma rico en gránulos (Amulic et al., 2012). Los gránulos se desarrollan durante la maduración de los neutrófilos en médula ósea como varios compartimientos intracelulares que almacenan proteínas con efecto microbicida y proinflamatorio (Mócsai, 2013). Estos gránulos se clasifican en primarios



(azurófilos), secundarios (específicos), terciarios (gelatinasa) y vesículas secretoras (Borregaard, 2010).

En circulación el porcentaje de neutrófilos respecto al total de leucocitos se encuentra alrededor del 50-70% en el humano, mientras que el porcentaje es del 10-25% en el ratón (Wang and Arase, 2014). La vida media del neutrófilo en circulación es aproximadamente de 8-12 horas en el humano y de 1.5 horas en el ratón (Adrover et al., 2016; Kolaczowska and Kubes, 2013). Debido a la corta vida de los neutrófilos, se requiere una producción constante de estas células en la médula ósea y una liberación continua de neutrófilos al torrente sanguíneo. Durante la producción de neutrófilos en la médula ósea, las células pasan por diferentes etapas de maduración denominadas: mieloblasto, promielocito, mielocito, metamielocito, células en banda y finalmente neutrófilos maduros (Borregaard, 2010). Se estima que en el humano hay una producción diaria de más de  $10^{11}$  neutrófilos (Döhrmann et al., 2016; Soehnlein et al., 2017).

El desarrollo de neutrófilos inicia en médula ósea con las células madre hematopoyéticas (CMH) en un ambiente que se caracteriza por tener poco flujo de sangre y bajos niveles de oxígeno (Winkler et al., 2010). En este nicho las células madre pierden su potencial de auto-renovación y dan lugar a un precursor multipotencial que puede diferenciarse a cualquier célula del linaje sanguíneo ya sea progenitores linfomiéloides o eritromiéloides (Görgens et al., 2013). Los precursores multipotenciales necesitan de altos niveles del factor de transcripción PU.1 para generar progenitores linfomiéloides, los cuales a su vez dan lugar a precursores de granulocitos/monocitos (PGM). En los precursores de granulocitos,

el factor de transcripción C/EBP- $\alpha$  es esencial para regular la expresión de proteínas necesarias para la diferenciación de los PGM a neutrófilos. Si la expresión de C/EBP- $\alpha$  es más baja que la expresión de PU.1, los precursores de granulocitos se diferencian a monocitos (Radomska et al., 1998). Cuando C/EBP- $\alpha$  se expresa mucho en los precursores de granulocitos, a estas células se les conoce como mieloblastos (Bardoel et al., 2014).

La regulación de la granulopoesis normalmente es controlado por células dendríticas y macrófagos al fagocitar neutrófilos en apoptosis en tejidos, esto provoca que las células dendríticas y macrófagos produzcan interleucina (IL)-23 (Nauseef and Borregaard, 2014). La IL-23 induce la producción de IL-17 por las células CD4<sup>+</sup> Th17 que resulta en la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés) para estimular la diferenciación de neutrófilos (von Vietinghoff and Ley, 2008). Por otro lado, en estados de granulopoesis de emergencia causado durante infecciones microbianas, se producen citocinas proinflamatorias y G-CSF que induce liberación de neutrófilos (Hirai et al., 2006).

Los neutrófilos maduros se mantienen en médula ósea por la acción del SDF-1 (stromal cell-derived factor 1, por sus siglas en inglés), también conocido como quimiocina CXCL12, que funciona como un factor de retención al unirse al receptor CXCR4 (Furze and Rankin, 2008; Lapidot, 2003). La liberación de neutrófilos maduros a circulación se da en respuesta a señales transmitidas a través de CXCR2, receptores de tipo toll (TLRs) o del receptor para G-CSF (G-CSFR) (Borregaard, 2010). Las señales a partir de estos receptores inhiben la expresión

de CXCR4 y con ello reducen la señal de retención del SDF-1 (Semerad et al., 2002; Soehnlein et al., 2017).

Se ha reportado que hay un incremento en el número de neutrófilos durante algunas infecciones y se ha observado que los neutrófilos pueden controlar un amplio rango de patógenos (Summers et al., 2010). Los pacientes con enfermedades relacionadas a desordenes en los niveles de neutrófilos muestran infecciones severas (Lakshman and Finn, 2001). Durante el proceso inflamatorio los neutrófilos se activan y su periodo de vida puede aumentar varias veces, de esta manera se asegura la presencia de neutrófilos con un fenotipo “preparado” en los sitios de inflamación e infección (Summers et al., 2010).

Los neutrófilos tienen diferentes mecanismos para eliminar patógenos intra o extracelulares incluyendo fagocitosis, degranulación, formación de especies reactivas de oxígeno y la formación de trampas extracelulares (Nathan, 2006). Cuando los neutrófilos llegan al tejido infectado, su principal función es la fagocitosis. En este proceso, los neutrófilos ingieren a los microorganismos para degradarlos en su interior. El microorganismo es introducido en una vesícula formada por la membrana celular denominada fagosoma. Este fagosoma posteriormente se fusiona con gránulos del citoplasma especialmente lisosomas. La vesícula resultante se denomina fagolisosoma y es donde el microorganismo es destruido por la acción de las sustancias microbicidas contenidas en los gránulos (Rosales and Uribe-Querol, 2017). En algunos casos, los neutrófilos también pueden expulsar las proteínas microbicidas de sus gránulos al exterior de las células, en un proceso denominado degranulación. Asimismo, los neutrófilos

pueden activar enzimas para generar y liberar especies reactivas de oxígeno que son muy dañinas para los microorganismos (Borregaard, 2010; Kolaczkowska and Kubes, 2013). Otro mecanismo antimicrobiano es la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET, por sus siglas en inglés Neutrophil Extracellular Traps). Las NET son fibras de DNA descondensado, adornado con histonas y proteínas de los gránulos. Las NET son capaces de inmovilizar patógenos para evitar su diseminación y facilitar la fagocitosis de estos. Las NET además pueden directamente dañar y eliminar microorganismos patógenos por las proteínas microbicidas que contienen (Brinkmann et al., 2004).

## 2. Reclutamiento de neutrófilos

La detección de infecciones o daño celular es el inicio para el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Las células dendríticas, células cebadas, macrófagos y células del endotelio vascular son las primeras en estar expuestas a estímulos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (Kono and Rock, 2008). Estos patrones moleculares son detectados por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y a través de estos receptores desencadenan la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Akira et al., 2006; McDonald et al., 2010; Takeuchi and Akira, 2010).

Las citocinas proinflamatorias, DAMPs, PAMPs y fragmentos del complemento funcionan como alarminas provocando que las células del endotelio vascular se activen (Kono and Rock, 2008) y produzcan citocinas como IL-8, quimiocinas y

leucotrienos. Estas sustancias con importantes factores quimioatrayentes de neutrófilos a sitios de inflamación (Furze and Rankin, 2008; Krishnaswamy et al., 1999).

En las células del endotelio vascular ya activado, se induce la expresión de moléculas de adhesión para facilitar la primera interacción física entre los neutrófilos y las células endoteliales. Este primer contacto es conocido como captura y es mediado por una familia de tres glicoproteínas transmembranales llamadas selectina E, selectina P y selectina L. Estudios con ratones knock-out para estas selectinas muestran problemas de reclutamiento de neutrófilos al endotelio vascular (Dimasi et al., 2013). L-selectina es expresada constitutivamente en la mayoría de los leucocitos, mientras que las selectinas P y E son expresadas en las células activadas del endotelio vascular (McEver, 2002). La selectina P se encuentra preformada en reservorios dentro de las células del endotelio y translocada a la membrana plasmática cuando las células del endotelio son activadas. La selectina E se sintetiza de *novo* y su transcripción es regulada por la activación del endotelio (Petri et al., 2008).

El proceso de captura es posible por la unión de las selectinas al ligando glicoproteico de P-selectina-1 (PSGL-1) (Zarbock et al., 2011). Así como P- y E-selectina se unen a PSGL-1, L-selectina también puede hacerlo pero esta interacción promueve que los neutrófilos que ya han sido capturados al endotelio puedan atraer por contacto a otros neutrófilos que aún no han sido capturados. Este anclaje secundario incrementa el número de neutrófilos reclutados a sitios de inflamación (Bargatze et al., 1994).

En el siguiente paso llamado rodamiento los neutrófilos literalmente ruedan a lo largo del endotelio en dirección al sitio de inflamación. En esta fase es necesaria la formación y el rompimiento de uniones entre el endotelio y el neutrófilo. La disociación de la unión de P-selectina-PSGL-1 provoca la formación de otras uniones con E- y L-selectinas para producir el rodamiento (Mayadas et al., 1993). De hecho, la E-selectina se une a otro ligando llamado ligando de E-selectina-1 (ESL-1), el cual es indispensable para iniciar un óptimo rodamiento (Ley et al., 1995).

Asimismo, la E-selectina puede cambiar a otro ligando llamado CD44 (Hidalgo et al., 2007). Entonces, mientras que PSGL-1 y ESL-1 se encuentran en las microvellosidades de la superficie del neutrófilo, CD44 se encuentra únicamente en la superficie plana, es decir, cuando ocurre la transición del neutrófilo rodando a un rodaje lento, las microvellosidades disminuyen y se expone CD44 que es reconocido por E-selectina. Esta interacción induce una señalización intracelular para provocar la redistribución de PSGL-1 y L-selectina para acercarse al sitio de inflamación (Borregaard, 2010; Hidalgo et al., 2007). Las selectinas también pueden unirse a estructuras de carbohidratos, una de ellas denominada antígeno Lewis x (CD15) presente en la superficie de los neutrófilos (Gadhoum and Sackstein, 2008)

Las integrinas son otras moléculas de adhesión que participan en el rodamiento de los neutrófilos. El antígeno asociado a función de linfocito-1 (LFA-1) también conocido como integrina  $\alpha$ L $\beta$ 2 (CD11a-CD18) y el receptor de macrófagos-1 (MAC-1) también conocido como integrina  $\alpha$ M $\beta$ 2 (CD11b-CD18), se encuentran en los leucocitos e interactúan con una molécula del endotelio denominada molécula de

adhesión intracelular-1 (ICAM-1) (Borregaard, 2010). El rodamiento facilita el contacto de los neutrófilo con el endotelio que contiene quimiocinas. Durante esta fase las quimiocinas son detectadas por los neutrófilos mediante receptores acoplados a proteínas G que inducen la completa activación de las integrinas en los neutrófilos (McDonald and Kubes, 2011). La activación de las integrinas lleva al paso de la adhesión firme (Kolaczkowska and Kubes, 2013).

Posteriormente, ocurre el arrastramiento de los neutrófilos sobre el endotelio para identificar el sitio donde transmigrarán hacia el lugar de inflamación (Phillipson et al., 2006). Para dejar el vaso sanguíneo, el neutrófilo pasa entre las células endoteliales (migración paracelular) o a través de ellas (migración transcelular) (Borregaard, 2010). La transmigración paracelular es la forma más frecuente y mejor descrita en donde los leucocitos buscan las uniones intercelulares. Alrededor del 85-95% de los leucocitos migran de esta forma. Durante la transmigración paracelular las uniones endoteliales reducen sus fuerzas de unión por la redistribución de la molécula caderina vascular endotelial (Dimasi et al., 2013) y las células endoteliales se contraen, en respuesta a un incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular, para favorecer la transmigración del neutrófilo (Su et al., 2000). Por otro lado, la transmigración transcelular parece estar limitada exclusivamente a ciertos tejidos como medula ósea, timo y páncreas (Carman, 2009). Sin embargo, no está claro qué mecanismos conducen a que el neutrófilo realice una migración paracelular o transcelular.

Un gran número de moléculas se expresan entre las uniones endoteliales y estas moléculas están involucradas en ayudar a la transmigración paracelular. Entre las

moléculas principales se encuentran ICAM-1 e ICAM-2, en las células endoteliales, que se unen a las integrinas LFA-1 y Mac-1 (Borregaard, 2010). Otras moléculas importantes son PECAM-1, JAM (moléculas de adhesión de unión), ESAM (molécula de adhesión selectiva a células endoteliales), PVR (receptor de poliovirus), CD99 y CD99L2. Todas estas moléculas pertenecientes a la súper familia de las inmunoglobulinas (Dimasi et al., 2013; Ley et al., 2007; Schmidt et al., 2011).

### 3. Activación de neutrófilos

Normalmente los neutrófilos se encuentran en reposo cuando están en circulación. Al detectar un ambiente inflamatorio los neutrófilos se activan por el proceso de migración a través el endotelio vascular. Una vez que los neutrófilos están en el espacio extravascular, éstos destruyen a los microorganismos patógenos (Mayadas et al., 2014). Los neutrófilos son capaces de identificar microorganismos patógenos a través de receptores membranales o intracelulares que reconocen directamente patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Estos receptores en conjunto se denominan receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (Thomas and Schroder, 2013). Además los neutrófilos pueden reconocer proteínas del mismo hospedero que se unen a los microorganismos para facilitar su detección. Las proteínas del hospedero más comunes para marcar a los microorganismos son los anticuerpos y los fragmentos del complemento funcionando como opsoninas (moléculas que favorecen el reconocimiento del patógeno y el proceso de fagocitosis) (Mayadas et al., 2014).



En humanos, los neutrófilos expresan un amplio repertorio de PRR que incluyen todos los receptores tipo toll (TLRs) excepto el TLR-3 y TLR-7 (Hayashi et al., 2003); CLEC7A (Kennedy et al., 2007) y CLEC2 (también conocido CLEC1B) (Kerrigan et al., 2009) que son receptores de lectina tipo C (CLRs); receptores tipo NOD como NOD1 y 2 (Clarke et al., 2010; Ekman and Cardell, 2010), NLRP3, NLRP1 y NLRC4 (Thomas and Schroder, 2013); receptores citoplasmáticos para detectar ácidos nucleicos como RIG1, MDA5 (Tamassia et al., 2008); receptores acoplados a proteínas G para detectar péptidos formilados (Fu et al., 2006) y moléculas endógenas producidas durante la inflamación como leucotrienos y quimiocinas (Tecchio and Cassatella, 2016). Además los neutrófilos expresan los receptores de complemento CR3 (MAC-1) (van Bruggen et al., 2009), CR1 (CD35) (Sengeløv, 1995), y CR4 (Paoliello-Paschoalato et al., 2015; Sengeløv, 1995). También expresan los receptores de anticuerpos, denominados receptores Fc (Rosales, 2017; Rosales and Uribe-querol, 2013): Fc $\gamma$ RIIA (CD32) y Fc $\gamma$ RIIIb (CD16b) (Bruhns, 2012; Paoliello-Paschoalato et al., 2015; Ravetch and Bolland, 2001). Es importante resaltar que este último receptor se encuentra únicamente en neutrófilos humanos (Rosales and Uribe-querol, 2013). La activación de neutrófilos con interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) induce la expresión del Fc $\gamma$ RI (CD64) (Lee et al., 2003).

#### 4. Mecanismos de acción

Los neutrófilos activados después de llegar al sitio de inflamación y/o infección llevan a cabo diferentes mecanismos para destruir a los patógenos. Dichos

mecanismos incluyen: fagocitosis, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), degranulación y formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs).

#### 4.1 Fagocitosis

La fagocitosis es el mecanismo principal para eliminar patógenos y remover debris celular. Este proceso es dependiente de PRRs en donde una partícula es internalizada por la membrana celular para formar una vacuola llamada fagosoma (Rosales and Uribe-Querol, 2017). Los neutrófilos pueden fagocitar partículas opsonizadas o no opsonizadas. Los principales receptores para detectar opsoninas son los receptores Fc y los receptores de complemento. En la fagocitosis mediada por receptores Fc se forman extensiones de la membrana llamadas pseudópodos que envuelven a la partícula recubierta con anticuerpos. Por el contrario, en la fagocitosis mediada por receptores del complemento, la partícula parece hundirse en la membrana para formar el fagosoma (Underhill and Ozinsky, 2002).

El fagosoma que contiene la partícula fagocitada se fusiona con otras vesículas y gránulos intracelulares, particularmente los lisosomas, para dar lugar a una vesícula llamada fagolisosoma. En el fagolisosoma la partícula ingerida es degradada (Rosales and Uribe-Querol, 2017). El proceso de transformación de fagosoma a fagolisosoma se conoce como maduración de fagosoma e involucra la liberación de moléculas microbicidas dentro del lumen del fagosoma, el ensamble del complejo NADPH oxidasa para la producción de ROS (Amulic et al., 2012) y la acidificación del fagosoma para que las proteasas como elastasa y catepsina G tengan una

óptima actividad microbicida (Jankowski et al., 2002; Jaumouille and Grinstein, 2016; Lee et al., 2003)

#### 4.2. Estallido respiratorio

Bajo la activación de los neutrófilos se producen especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) en un proceso llamado estallido respiratorio. El complejo enzimático responsable de este proceso es la NADPH oxidasa. Este complejo se ensambla en la membrana plasmática y en la membrana del fagosoma para reducir el oxígeno a aniones superóxido ( $O_2^-$ ) (Arruda and Barja-Fidalgo, 2009; Bylund et al., 2010). La NADPH oxidasa es un complejo de transferencia de electrones compuesto por 5 subunidades; las subunidades  $p22^{phox}$  y  $gp91^{phox}$  se encuentran unidas a la membrana plasmática así como en la membrana de los gránulos (Borregaard et al., 1983) formando un heterodímero conocido como citocromo b (citocromo b558) que conforma el sitio catalítico de la transferencia de electrones de todo el complejo NADPH oxidasa (Bylund et al., 2010).

Normalmente en ausencia de activación los demás componentes  $p40^{phox}$ ,  $p47^{phox}$  y  $p67^{phox}$  se encuentran libres en el citosol sin asociarse al citocromo b por lo que la oxidasa se encuentra inactiva. Una vez que los neutrófilos se activan los componentes del citosol se movilizan a la membrana para asociarse con citocromo b y formar la NADPH oxidasa activa. En humanos se ha detectado la presencia de varios cofactores que ayudan a la activación de la oxidasa. Rac2 es el cofactor más predominante (Bokoch and Zhao, 2006). Cuando el complejo NADPH oxidasa

está activo, se encarga de transferir electrones a través del citocromo b que provienen del NADPH del citosol hacia el otro lado de la membrana. Esto es hacia el interior de compartimientos intracelulares, como el fagosoma, o bien hacia al espacio extracelular (Bylund et al., 2010).

Dentro del fagosoma, el superóxido ( $O_2^-$ ) es espontáneamente o enzimáticamente convertido a peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) el cual puede volver a reaccionar con el superóxido ( $O_2^-$ ) para formar radicales hidroxilo ( $OH^-$ ) y oxígeno ( $O_2$ ). Estos dos compuestos son altamente reactivos y tóxicos (Roos et al., 2003). El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) también puede reaccionar junto con cloruro ( $Cl^-$ ) para ser usado como sustrato de la mieloperoxidasa (MPO) para generar ácido hipocloroso (HOCl), un compuesto tóxico para casi todos los microbios. Además el HOCl puede reaccionar con aminas secundarias para dar lugar a cloraminas, que también son microbicidas pero menos estables (Klebanoff, 2005). También se ha descrito que el óxido nítrico es una molécula muy reactiva producida por la enzima óxido nítrico sintasa inducible que se ha localizado en los gránulos primarios. De tal manera que el superóxido también puede reaccionar con el óxido nítrico para generar peroxinitrito (Winterbourn et al., 2006).

En los neutrófilos, la mayoría del citocromo b se encuentra en los gránulos secundarios y terciarios (Borregaard and Cowland, 1997; Bylund et al., 2010). Las V-ATPasas son bombas que se encargan de ingresar protones al lumen del fagosoma y se encuentran en los gránulos primarios y terciarios (Lee et al., 2003). A pesar de que los gránulos se fusionan con el fagosoma de los neutrófilos y hay actividad de las V-ATPasas, el lumen del fagosoma no es tan ácido; de hecho, se

ha descrito que en estadios tempranos del fagolisosoma existe un ambiente alcalino (Jankowski and Grinstein, 2002). Por lo tanto, unos minutos después de haberse formado el fagosoma se ha observado que hay un aumento del pH alrededor de 8. Inclusive después de la fusión con los gránulos, aproximadamente después de 30 minutos el pH dentro del fagolisosoma disminuye a valores menores de 7 (Roos et al., 2003). De esta manera, la destrucción de los microorganismos se logra por los productos oxidantes o por el contenido de los gránulos (Roos et al., 2003).

### 4.3 Degranulación

Los neutrófilos tienen proteínas con funciones microbicidas y enzimas hidrolíticas que se encuentran almacenadas en los gránulos. Los gránulos pueden liberar sus contenidos dentro del lumen del fagolisosoma o al espacio extracelular en un proceso es conocido como degranulación (Dale et al., 2008).

La clasificación de los gránulos y su heterogeneidad es mejor explicada por su formación durante la maduración de los neutrófilos en la medula ósea (Amulic et al., 2012). Los gránulos azurófilos o primarios son sintetizados durante la fase de promielocitos. Los gránulos específicos o secundarios son formados en la fase de mielocitos. Los gránulos de gelatinasa o terciarios son formados en la fase de metamielocitos y durante la fase de células en banda. Además de los gránulos, los neutrófilos maduros también cuentan con vesículas secretoras formadas por endocitosis (Borregaard, 2010; Borregaard et al., 2007).

Los gránulos primarios contienen principalmente defensinas (HNP-1, -2 y -3), mieloperoxidasa (MPO), proteasas de serina, elastasa de neutrófilos (NE) y la catepsina G. Los gránulos secundarios se caracterizan por tener fosfatasa alcalina, lactoferrina, lisozima, citocromo b (componente de la NADPH oxidasa) y colagenasa. Los gránulos terciarios contienen catepsina y gelatinasa (también conocida como metaloproteínasa-9) (Borregaard et al., 2007; Cain et al., 2011; Pruchniak *et al.*, 2013). El cuarto tipo de gránulo son las vesículas secretoras, las cuales contiene proteínas del plasma como albúmina (Lacy, 2006), y proteínas de la membrana que son incorporadas por endocitosis durante la activación (Häger *et al.*, 2010).

El mecanismo de degranulación en los neutrófilos ocurre cuando los receptores se estimulan y los gránulos se movilizan al fagosoma o a la membrana plasmática para liberar sus contenidos. Para que suceda este proceso se requiere de un incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular, así como la hidrólisis de ATP (Lacy, 2006).

#### 4.4 Trampas extracelulares de neutrófilos

Otro mecanismo de defensa de los neutrófilos son las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). Las NET, están compuestas por fibras de cromatina y proteínas de los gránulos. Las NET son liberadas al exterior en un proceso denominado NETosis (Jorch and Kubes, 2017).

En 2004, Volker Brinkmann y colaboradores reportaron por primera vez la producción y liberación de NET al estimular neutrófilos con bacterias Gram-positivas

y Gram-negativas. Este grupo de investigadores analizó la composición de las NET por inmunofluorescencia y detectó la presencia de proteínas pertenecientes a los gránulos. Asimismo, encontraron que en las NETs habían histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4 (Brinkmann et al., 2004).

Muchos microorganismos como hongos, virus y protozoarios, además de las bacterias, también pueden inducir liberación de NET al estar en contacto con los neutrófilos (Zawrotniak and Rapala-Kozik, 2013). Otras moléculas inflamatorias como LPS, fragmentos del complemento, complejos inmunes, IL-8 y PMA (forbol-12-miristato-13-acetato) también pueden inducir el proceso de NETosis (Branzk and Papayannopoulos, 2013; Brinkmann et al., 2004).

Cuando el estímulo es detectado por los neutrófilos, éstos se activan y desencadenan una serie de señalizaciones intracelulares que provocan cambios en la morfología de los neutrófilos. Se han determinado algunos pasos fundamentales en la NETosis. Durante la activación, los neutrófilos producen grandes cantidades de ROS por la actividad del complejo de la NADPH oxidasa (Roos et al., 2003), el núcleo pierde su forma lobulada y el DNA se descondensa (Fuchs et al., 2007), esto ocurre por acción proteasas de la elastasa y la mieloperoxidasa, las cuales se movilizan al núcleo por mecanismos desconocidos para descondensar el DNA (Papayannopoulos et al., 2010). Al mismo tiempo, se ha propuesto que los altos niveles de calcio activan a la enzima arginina-deaminasa 4 (PAD4). Esta enzima se localiza en el núcleo de los neutrófilos y actúa sobre las histonas H3 para promover la descondensación del ADN (Wang et al., 2009). PAD4 convierte la arginina a citrulina en un proceso llamado citrulinación, para evitar la metilación de las histonas

y mecanismos de transcripción (Mesa and Vasquez, 2013). Posteriormente, la membrana nuclear se rompe, el DNA queda libre en el citoplasma y se asocia con proteínas de los gránulos y del citoplasma. Al final, la membrana celular se rompe y las NET son liberadas al exterior para atrapar patógenos y evitar su diseminación (Papayannopoulos and Zychlinsky, 2009). Además debido a que las NET contienen proteínas microbicidas también pueden dañar a los patógenos directamente (Sollberger et al., 2018; Zawrotniak and Rapala-Kozik, 2013).

#### 5. Neutrófilos, una población heterogénea

En 1984, Gallin propuso por primera vez el concepto de heterogeneidad en la población de neutrófilos (Gallin, 1984). Sin embargo, este concepto en el campo de los neutrófilos obtuvo muy poca atención. Recientemente este concepto ha sido retomado nuevamente debido a que han surgido investigaciones que muestran diversas funciones de los neutrófilos tanto en condiciones de homeostasis (Adrover et al., 2016) como en condiciones patológicas (Fridlender et al., 2009; Rosales, 2018).

Esta evidencia ha llevado a usar diferentes estrategias para tratar de identificar poblaciones de neutrófilos: se han buscado marcadores de superficie exclusivos de neutrófilos, se han caracterizado los estadios de maduración y las diferentes funciones de estas células. Desafortunadamente, aún no está claro si las posibles subpoblaciones de neutrófilos reportadas en estudios previos son realmente tipos diferentes de neutrófilos que provienen ya programados (son un linaje diferente) desde médula ósea, o son simplemente variaciones en el estado de activación.



Aunque no hay respuesta a esta discrepancia, lo que sí es claro, es que los neutrófilos son células con la capacidad de especializarse y mostrar fenotipos diferentes (Deniset and Kubes, 2016; Rosales, 2018).

### 5.1. Neutrófilos de baja densidad

Generalmente los neutrófilos de la sangre se purifican por medio de un gradiente de densidad sobre Ficoll (Boyum, 1968; García-García et al., 2013). En este método, los neutrófilos aparecen puros en el fondo del tubo después de la centrifugación. Los monocitos y linfocitos, que son leucocitos de menor densidad, se encuentran en la parte superior del tubo sobre el Ficoll. Sorprendentemente usando el método anterior con sangre de ratones con cáncer, se ha identificado la presencia de neutrófilos en la parte superior del gradiente de densidad. Estos neutrófilos que aparecen con las células mononucleares (monocitos y linfocitos) se les han denominado neutrófilos de baja densidad (LDN, por sus siglas en inglés). Se piensa que los LDN son una subpoblación de neutrófilos con propiedades diferentes a los neutrófilos que aparecen en la parte inferior del tubo, los cuales son también llamados neutrófilos de densidad normal. La cantidad de neutrófilos de baja densidad aumentaron con la progresión del tumor (Sagiv et al., 2015) y ser una mezcla de neutrófilos morfológicamente maduros e inmaduros (Mishalian et al., 2017).

Esta subpoblación de LDN que se ha encontrado en modelos de cáncer con ratones, también se ha reportado en humanos con cáncer y se ha sugerido que podrían estar

implicados en la progresión de los tumores (Sagiv et al., 2015). Esto ha despertado gran interés por determinar los efectos de estas células en el desarrollo del cáncer. Los LDN no sólo aparecen en cáncer, se han reportaron en pacientes con lupus eritematoso sistémico (SLE, por sus siglas en inglés) o con artritis reumatoide (Carmona-Rivera and Kaplan, 2013; Denny et al., 2010; Hacbarth and Kajdacsy-Balla, 1986), hay reportes de que los LDN aparecen en pacientes con infecciones bacterianas (Deng et al., 2016), y algunas enfermedades como psoriasis (Lin et al., 2011), infecciones por VIH (Cloke et al., 2012), asma (Fu et al., 2014; Herteman et al., 2017) o malaria (Rocha et al., 2015). Incluso, los LDN se han reportado en mujeres embarazadas (Ssemaganda et al., 2014). Desafortunadamente las características y funciones de los LDN no son claras.

Un problema que existe para identificar subpoblaciones de neutrófilos es que no existen marcadores moleculares que exclusivamente definan a este tipo celular. En ratones, los neutrófilos pueden ser identificados por medio de la expresión de las moléculas Ly6G y CD11b (Sagiv et al., 2015). Particularmente, Ly6G es único de neutrófilos murinos. En el caso de los neutrófilos humanos la identificación a través de moléculas es más difícil, pues no hay un marcador selectivo de estas células. Por lo tanto, para determinar neutrófilos humanos se realiza por inmunofluorescencia múltiple para la identificación moléculas de superficie, se requiere de anticuerpos para identificar a las moléculas CD15, CD11b, CD16, CD66b, CD14 y CD62L. Estas moléculas en conjunto definen a un neutrófilo, sin embargo, ninguna es exclusiva de estas células (Elghetany et al., 2004). En los reportes de pacientes con algunas de las patologías que se mencionaron

anteriormente, la presencia de neutrófilos de baja densidad se ha establecido usando marcadores de superficie como CD11b y CD66b (Sagiv et al., 2015), o CD15 y CD14 (Carmona-Rivera and Kaplan, 2013). Sin embargo, en la mayoría de los estudios que reportan células con morfología similar a los neutrófilos en la capa mononuclear no han usado una combinación adecuada de marcadores de superficie para identificar a los neutrófilos y por lo tanto solo se han identificado como granulocitos de baja densidad. El receptor de anticuerpos Fc $\gamma$ RIIIb (CD16b) es exclusivo de neutrófilos humanos (Rosales and Uribe-querol, 2013) y tiene potencial como posible marcador selectivo de estas células, sin embargo, este receptor es muy parecido al receptor Fc $\gamma$ RIIIa que se expresa en células Natural Killer (NK) (Rosales and Uribe-querol, 2013), el anticuerpo que reconoce estos receptores no pueden diferenciar entre ambos, pero recientemente, un anticuerpo monoclonal disponible comercialmente, parece ser específico para reconocer al Fc $\gamma$ RIIIb (CD16b).

Hasta ahora, los reportes publicados indican que los neutrófilos de baja densidad aparecen bajo ciertas patologías, principalmente el cáncer, sin embargo, muchas preguntas sobre el origen y función de estas células quedan pendientes. Por ejemplo: ¿De dónde provienen estos neutrófilos de baja densidad? Aunque los LDN se han detectado únicamente en individuos enfermos, ¿también existen en personas sanas? Además, no se conoce si las funciones de los LDN son diferentes a las funciones de los neutrófilos clásicos.

En 2015, Sagiv et al. reportaron que los ratones libres de tumores tenían LDN, mientras que en ratones a los cuales se les indujo diferentes tipos de cáncer los

LDN aumentaron en número, de hecho observaron que los LDN incrementaron gradualmente conforme avanzó la progresión del tumor (Sagiv et al., 2015).

En el caso de humanos, no es claro si los LDN existen en personas sanas. Midgley, reportó el porcentaje de granulocitos de baja densidad (LDG) CD15<sup>+</sup> de pacientes con SLE juvenil y de personas sanas, encontrando que en personas sanas hubo alrededor del 2% de granulocitos de baja densidad en la capa mononuclear. Sin embargo, no se pueden considerar neutrófilos debido a que solo se consideraron células CD15<sup>+</sup> (Midgley and Beresford, 2015). En otro estudio, Zhang et al. reportaron la presencia de LDG en pacientes con artritis reumatoide, SLE, polimiositis y dermatomiositis. En sus resultados reportaron que aproximadamente el 1% de las células de la capa mononuclear corresponde a granulocitos de baja densidad en personas sanas (Zhang et al., 2017). El inconveniente de este estudio es que de nuevo sólo se consideraron células CD14<sup>low</sup> CD15<sup>+</sup>. Sagiv et al. reportó que en personas sin cáncer es difícil encontrar LDN (Sagiv et al., 2015). En este estudio se usaron los marcadores de superficie CD66b y CD11b para definir a los neutrófilos. Aunque los neutrófilos sí expresan estas moléculas, no son exclusivas de estas células y por tanto, no se pueden considerar neutrófilos estrictamente.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente se desconoce si existe la presencia de neutrófilos de baja densidad en humanos sanos debido a que los pocos reportes que existen no describen claramente esta población. Los reportes que hay sobre granulocitos de baja densidad en humanos no ocupan una adecuada identificación de moléculas de superficie para identificar neutrófilos.

Por otro lado, en ratones con cáncer se ha observado que los LDN tienen funciones disminuidas en comparación con los neutrófilos. Además, en ratones sanos parece ser que hay presencia de LDN. En humanos, los reportes sugieren que sólo se presentan bajo ciertas patologías, se han detectado células con una morfología de neutrófilos, sin embargo, en personas sanas no hay reportes de la presencia de LDN. Por lo tanto, en este trabajo se propuso buscar la presencia de LDN en personas sanas y la evidencia obtenida nos ayudará a determinar si realmente existe heterogeneidad en la población de neutrófilos.

### IV. HIPÓTESIS

En individuos sanos se pueden encontrar neutrófilos de baja densidad y estas células presentan funciones reducidas de forma similar a los LDN de ratones con cáncer.

### V. OBJETIVO GENERAL

Buscar la presencia de la población de neutrófilos de baja densidad en la capa mononuclear de donadores sanos y comparar su funcionalidad con los neutrófilos de la fracción de alta densidad.

## VI. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener y purificar las fracciones de alta y baja densidad de sangre periférica.
2. Realizar tinciones para moléculas de superficie para analizar la población de neutrófilos de baja densidad por citometría de flujo.
3. Realizar la separación de células (cell sorting) de las células en la capa mononuclear para separar los neutrófilos de los linfocitos y monocitos.
4. Evaluar la funcionalidad de los neutrófilos de la capa mononuclear mediante ensayos de fagocitosis, producción de NET y ROS.

## VII. METODOLOGÍA

### 1. Obtención de sangre

Con una jeringa de 10mL se realizó una extracción de sangre periférica del brazo de donadores sanos, la sangre se colocó cuidadosamente en un tubo de 15 mL con 0.25 mL de heparina (1000 UI/mL) y 2 ml de dextrán T500 al 6%. El tubo se mezcló con cuidado para evitar que se formaran burbujas y se dejó sedimentar por 40 min a temperatura ambiente.

Asimismo, se obtuvo 10mL de sangre con Vacutainer con EDTA (Becton Dickinson. N° de cat. 368171). Después de obtener la sangre se colocó en un tubo de 15 mL y se mezcla con 2 mL de dextrán T500 al 6%. El tubo se mezcló con cuidado para evitar que se formaran burbujas y se dejó sedimentar por 40 min a temperatura ambiente.

Todas las muestras fueron tomadas con el conocimiento informado de los donantes. El protocolo de extracción de sangre y todos los métodos experimentales fueron aprobados por el comité de ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

## 2. Separación de células por gradiente de densidad

Una vez que se separó el plasma de los eritrocitos, se tomó el plasma y se colocó por las paredes de un tubo de 15 mL que contiene 5 mL de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare), asegurándose de que se formaran dos capas. El plasma debe quedar sobre el Ficoll-Hypaque sin mezclarse. El tubo se centrifugó a  $516 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 min. Transcurrido el tiempo de centrifugación, la capa de las células mononucleares (MNC) se encontró en la interfase de plasma y Ficoll-Hypaque. Los neutrófilos (también llamados células polimorfonucleares o PMN) se encontraron en el fondo del tubo. Tanto la capa de células mononucleares como los PMN se colectaron en tubos separados. Para eliminar los eritrocitos restantes del fondo del tubo que quedaron junto con los PMN, se agregó 10 mL de solución hipotónica durante 1 min, posteriormente se agregó 10 mL de solución hipertónica. Finalmente los PMN se lavaron con PBS pH 7.4. El número de células obtenidas, tanto de MNC como de PMN se determinó por conteo en la cámara de Neubauer.

## 3. Tinción directa para moléculas de superficie

Se colocaron  $10^6$  células en microtubos Eppendorf de 1.5 mL y se agregó los anticuerpos anti-CD66b Alexa-Flour 647 ( $0.05 \mu\text{g/mL}$ ) (BioLegend. N° de cat.

305109), anti-CD14 APC-Cy7 (0.25 µg/mL) (BioLegend. N° de cat. 367107), anti-CD15 PE-Cy5 (0.25 µg/mL) (BioLegend. N° de cat. 323013), anti-CD11b Alexa-Flour 488 (0.25 µg/mL) (BioLegend. N° de cat. 301317) y anti-CD16b PE (BD Bioscience. N° de cat. 550868). De este último anticuerpo, se usó 2.5 µL/muestra. Los anticuerpos se colocaron en 100 µL de buffer de lavado (PBS + BSA 1% + NaN<sub>3</sub> 0.1%), los tubos se mezclaron suavemente y se incubaron 30 min a 4°C en la oscuridad. Transcurrido el tiempo se lavaron las muestras con 1 mL de PBS y se fijaron con paraformaldehído al 1%. Las muestras se leyeron en el citómetro de flujo Attune azul/rojo (Applied Biosystems) y los resultados fueron analizados en el software Flowjo (versión X).

#### 4. Ensayo de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se colocaron 10<sup>6</sup> células en microtubos Eppendorf de 1.5 mL, se agregó Dihidrorodamina 123 (15 µM) (AnaSpec, Inc. N° de cat. AS-85711) y los tubos se mezclaron suavemente. Los tubos se incubaron 15 min a 37°C en la oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron con PBS, se agrega PMA (20 nM) y las células se incubaron 50 min a 37°C en la oscuridad. Transcurrido el tiempo las células se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 1% y se leyeron en el citómetro Attune azul/rojo (Applied Biosystems). Los resultados fueron analizados en el software Flowjo (versión X).



## 5. Separación de células (cell sorting) por citometría de flujo

Después de purificar la fracción de células mononucleares, las células se tiñeron con el anticuerpo anti-CD16b PE (BD Bioscience. N° de cat. 550868) en 100  $\mu$ L buffer de lavado (PBS + BSA 1% + NaN<sub>3</sub> 0.1%) y se incubaron 30 min a 4°C en la oscuridad. Posteriormente las células se concentraron a  $2 \times 10^6$  células/mL en PBS y se realizó el *cell sorting* de las células CD16b<sup>+</sup>. Las células CD16b<sup>+</sup> se recuperaron en suero fetal bovino (FBS). Finalmente, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI.

## 6. Ensayo de producción de NET

Se colocaron  $10^5$  neutrófilos de baja densidad, purificados por cell sorting, en una placa de 48 pozos en un volumen de 250  $\mu$ L de PBS y se dejaron sedimentar en una incubadora (Forma Scientific) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, durante 20 min. Posteriormente, se agregó PMA (20 nM) y las células se incubaron 4h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo, las células se fijaron con paraformaldehído al 1%, se agregó DAPI (120  $\mu$ M) y las células se visualizaron con un microscopio invertido de fluorescencia (Olympus IX70). Las imágenes fueron capturadas con el software Image-Pro Plus (versión 6.2.1) y analizadas con el software ImageJ (Schindelin et al., 2012).

## 7. Oponización de microperlas

La oponización de microperlas de látex fluorescentes de aproximadamente 4.8  $\mu\text{m}$  de diámetro (Nº de cat. 16592) se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor Polysciences (Warrington, PA). Las microperlas se encontraban a  $1.25 \times 10^8$  partículas/ml, por lo tanto se tomó el volumen necesario y las microperlas se lavan tres veces con 500  $\mu\text{L}$  de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) 1M. Luego, el anticuerpo IV.3 (10 mg/mL) se agregó en 500  $\mu\text{L}$  de ácido bórico 1M y las microperlas se dejaron en agitación toda la noche a 4°C en ausencia de luz. Posteriormente las microperlas se lavaron dos veces con 500  $\mu\text{L}$  PBS + BSA (10 mg/mL) y finalmente se resuspendieron en el volumen inicial para que las microperlas se mantuvieran a una concentración de  $1.25 \times 10^8$  partículas/mL.

## 8. Ensayo de fagocitosis

Se colocaron  $10^6$  células en microtubos Eppendorf de 1.5 mL en 100  $\mu\text{L}$  de buffer de fagocitosis frío (PBS + 2 mM cloruro de calcio + 1.5 mM cloruro de magnesio + 1% de albúmina sérica humana); en ese mismo tubo se colocó el volumen adecuado de perlas oponizadas en una proporción de perlas:células de 3:1 y se mezclaron agitando cuidadosamente. Los tubos se incubaron en baño maría a 37°C por 30 min en la oscuridad. Transcurrido el tiempo, los tubos se colocaron en agua de hielo por 2 minutos para detener la reacción de fagocitosis. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 4000 rpm por 2 minutos en una microcentrifuga Eppendorf, se eliminó el sobrenadante y el pellet de células se resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de

solución de tripsina-EDTA (PBS + 0.05% tripsina + 1 mM EDTA). Las células se mezclaron suavemente y se incubaron en agua de hielo durante 15 min en la oscuridad. Después de los 15 min, las células se lavaron con 500  $\mu$ L de buffer MACS (PBS + 0.5% BSA + 2 mM EDTA).

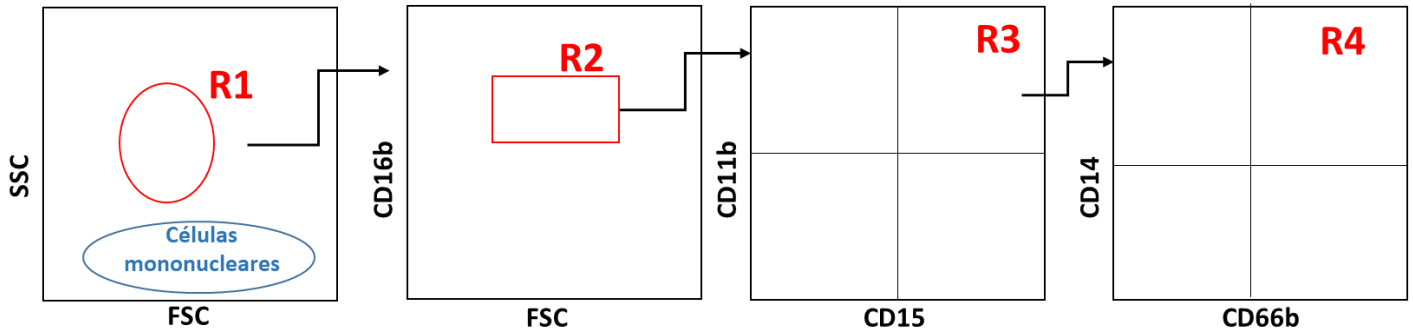
Luego se realizó una inmunofluorescencia de superficie como se mencionó anteriormente con los marcadores anti-CD14 APC Cy7 (BioLegend), anti-CD15 PE Cy5 (BioLegend) y finalmente las células se resuspendieron en paraformaldehído 1% y se leyeron en el citómetro Attune azul/rojo (Applied Biosystems). Los resultados se analizaron en el software Flowjo (versión X). Asimismo, las células se visualizaron en el microscopio invertido de fluorescencia (Olympus IX70). Las imágenes fueron capturadas con el software Image-Pro Plus (versión 6.2.1) y analizadas con el software ImageJ.

## VIII. RESULTADOS

### 1. Caracterización de los neutrófilos de baja densidad

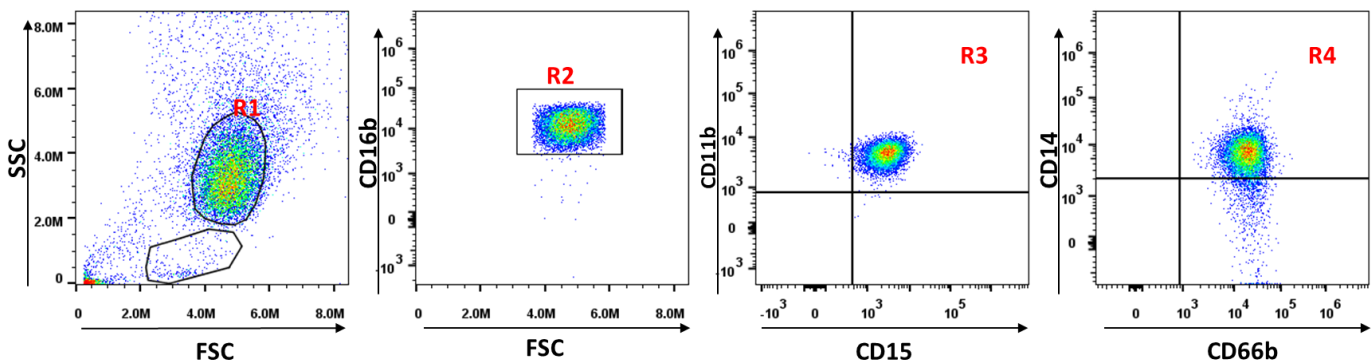
La presencia de neutrófilos de baja densidad (LDN) en individuos sanos fue confirmada al realizar una inmunofluorescencia directa en las células de las fracciones de baja y alta densidad que se obtuvieron al centrifugar el plasma sanguíneo por gradiente de densidad. Para detectar LDN se utilizó una combinación de anticuerpos para identificar moléculas superficie como CD11b, CD66b (Lakschevitz et al., 2016), CD16b (Rosales and Uribe-querol, 2013), CD15 y CD14 (Elghetany et al., 2004), los cuales se usan tradicionalmente para detectar neutrófilos maduros.

Primero se analizaron las muestras de la fracción de alta densidad donde se encuentran los neutrófilos purificados. Se realizó un dot plot FSC vs SSC y se seleccionó la región de los neutrófilos (R1). Posteriormente las células de R1 se analizaron en otra ventana de FSC vs CD16b. De aquí se seleccionó únicamente la población de células CD16b<sup>+</sup> (R2). A partir de R2 se realizó otro dot plot de CD15 vs CD11b para identificar la población doble positiva CD15<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> (R3). Las células de la región R3 se analizaron nuevamente en otro dot plot de CD66b vs CD14 para detectar la población doble positiva CD66b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> (Fig. 1). Este análisis se realizó de la misma manera en las muestras de la fracción de baja densidad para identificar a los LDN.



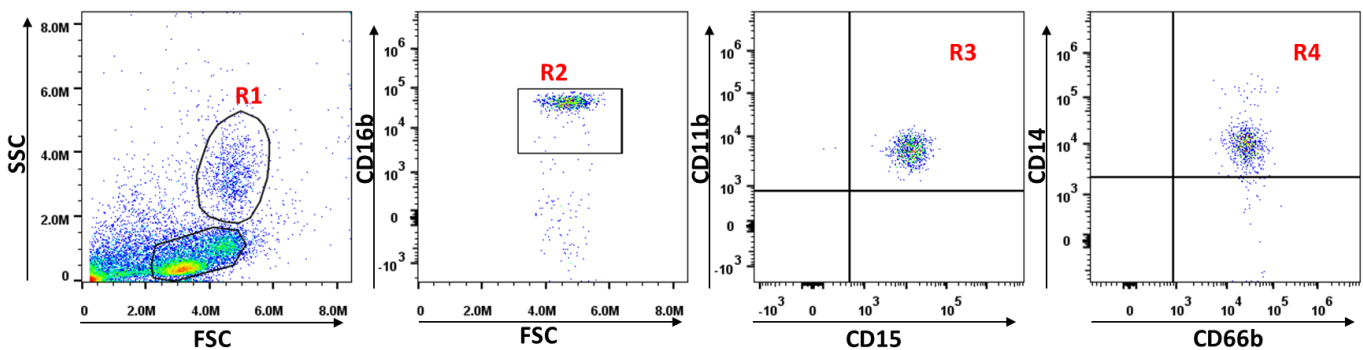
**Figura 1.** Estrategia de análisis para identificación de neutrófilos. Los neutrófilos purificados por gradiente de densidad en Ficoll-Paque aparecen en la región R1. Las células R1 se analizaron para seleccionar las células CD16b<sup>+</sup>, definiendo así la región R2. Las células en R2 se analizaron para seleccionar células CD11b<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> (región R3). Finalmente las células en R3 se analizaron para seleccionar células CD14<sup>+</sup> CD66b<sup>+</sup> (región R4).

Al realizar el análisis de las muestras de neutrófilos se observó que presentaron un fenotipo CD16b<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> CD66b<sup>+</sup> (Fig. 2). Al analizar la fracción de células mononucleares, se observó que en el dot plot de FSC vs SSC, se observa que la mayoría de las células (monocitos y linfocitos) aparecen en la parte inferior de la gráfica. Sin embargo, en forma consistente, en la región de los neutrófilos (R1) se detectaron células (Fig. 3).



**Figura 2.** *Análisis por citometría de flujo de neutrófilos de densidad normal.* Los neutrófilos purificados por gradiente de densidad en Ficoll-Paque presentan un fenotipo CD16b<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> CD66b<sup>+</sup>.

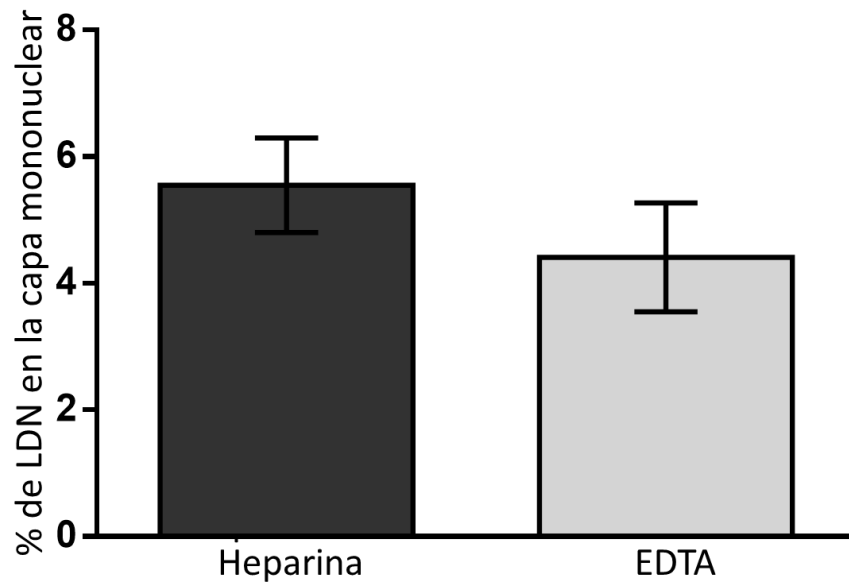
Las células en la región R1, que se comportan por tamaño y granularidad como neutrófilos, se tiñeron con los anticuerpos contra las moléculas de superficie que son marcadores de neutrófilos (Fig. 2). El 100% de las células en la región R1 que vienen de la capa de células mononucleares fueron positivas para la expresión de las moléculas CD16b, CD11b, CD15, CD14 y CD66b (Fig. 3).



**Figura 3.** *Análisis por citometría de flujo de células mononucleares.* Las células mononucleares purificadas por gradiente de densidad en Ficoll-Paque se analizaron con por citometría de flujo para detectar la presencia de marcadores de neutrófilos. Una porción de las células presentan el fenotipo CD16b<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> CD66b<sup>+</sup> típico de neutrófilos.

Estos resultados muestran que en la fracción de células de baja densidad hay una fracción de células que aparecen en la región R1 y comparten las mismas moléculas de superficie que los neutrófilos, aunque en diferentes niveles de expresión. Por tanto, estos datos sugieren que hay neutrófilos de baja densidad (LDN) en la sangre de individuos sanos. Como se observa en la figura 3, los LDN pueden ser separados de las células mononucleares desde el dot plot de FSC vs SSC en la región R1, que

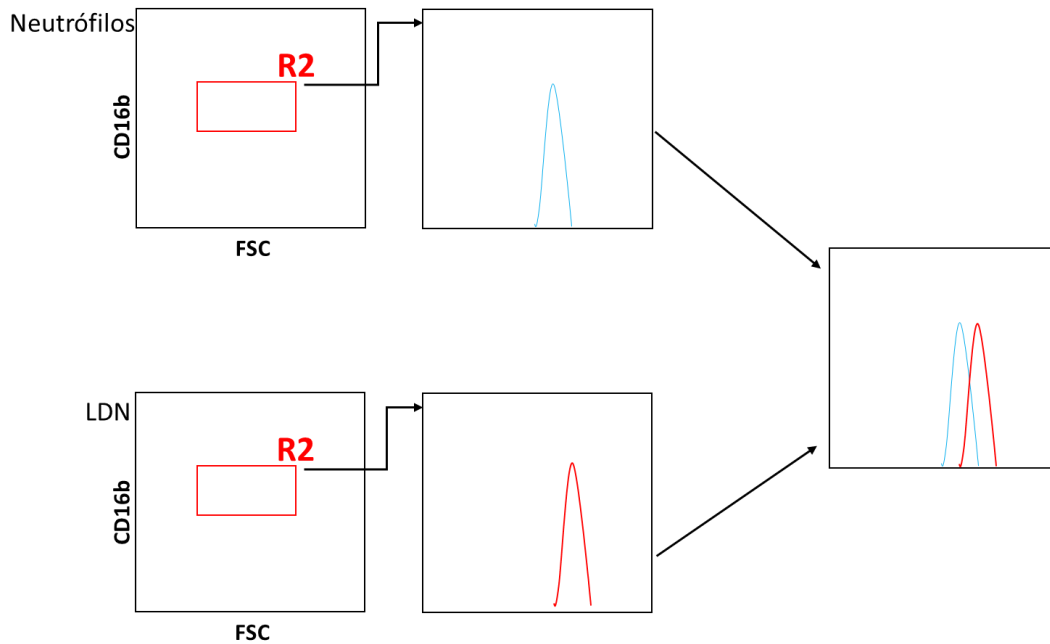
es la misma región donde se detectan los neutrófilos. El porcentaje de los LDN de individuos sanos fue alrededor del 6% de las células mononuclear purificadas con heparina y alrededor de 5% purificadas con EDTA (Fig. 4).



**Figura 4.** *Porcentaje de neutrófilos de baja densidad en las células mononucleares.* Las células mononucleares purificadas por gradiente de densidad en Ficoll-Paque, a partir de sangre de individuos sanos, se analizaron con por citometría de flujo para detectar la presencia de neutrófilos de baja densidad utilizando heparina (barra negra) y EDTA (barra gris). Los datos de heparina son promedio  $\pm$  error estándar  $5,549 \pm 0,7479$  de 5 determinaciones independientes. Los datos de EDTA son promedio  $\pm$  error estándar  $4,410 \pm 0,8599$  de 5 determinaciones independientes.

Posteriormente, para comparar los niveles de expresión de las moléculas de superficie de los LDN y los neutrófilos, se realizaron histogramas a partir de la región R2 para cada una de las moléculas de superficie tanto de neutrófilos como de LDN. Los histogramas se graficaron juntos para hacer la comparación entre los dos

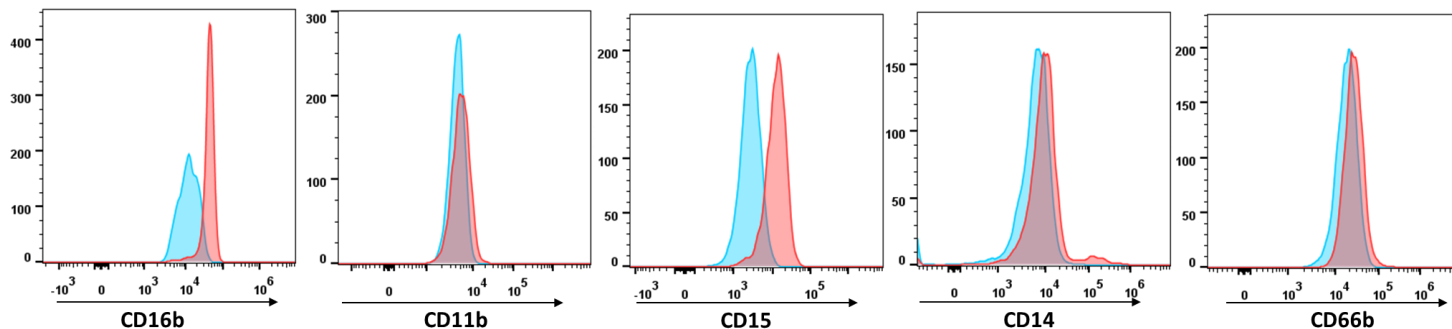
grupos de células (Fig. 5). En este análisis, se pudo detectar que los LDN presentaron un aumento en los niveles de expresión de las moléculas CD16b y CD15 (Fig. 6).



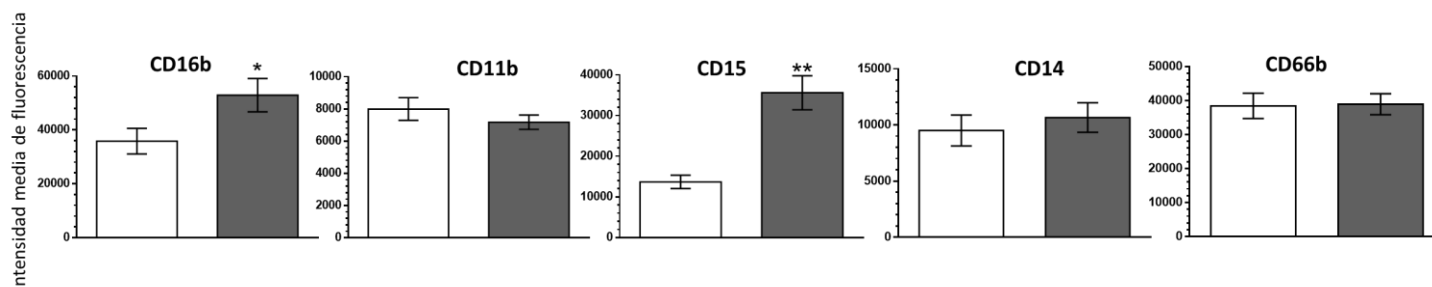
**Figura 5.** Estrategia de análisis de histogramas empalmados. Tanto neutrófilos como células mononucleares purificadas por gradiente de densidad en Ficoll-Paque, se analizaron por citometría de flujo. Las células en la región 2 (R2) se tiñeron para diferentes marcadores de superficie y los histogramas correspondientes a neutrófilos (línea azul) o a neutrófilos de baja densidad (LDN) (línea roja) se graficaron empalmados.

Al recopilar todos los datos de diferentes individuos se encontró que los LDN tienen una mayor expresión de las moléculas CD16b y CD15 en comparación con los neutrófilos (Fig. 7). Por otro lado, la expresión de las moléculas CD11b, CD66b y CD14 fue similar en ambas poblaciones celulares (Fig. 7). Esto indica que los LDN muestran un fenotipo  $CD16b^{high} CD15^{high} CD11b^{+} CD66b^{+} CD14^{+}$ , el cual es diferente a los neutrófilos que son  $CD16b^{high} CD15^{high} CD11b^{+} CD66b^{+} CD14^{+}$ .



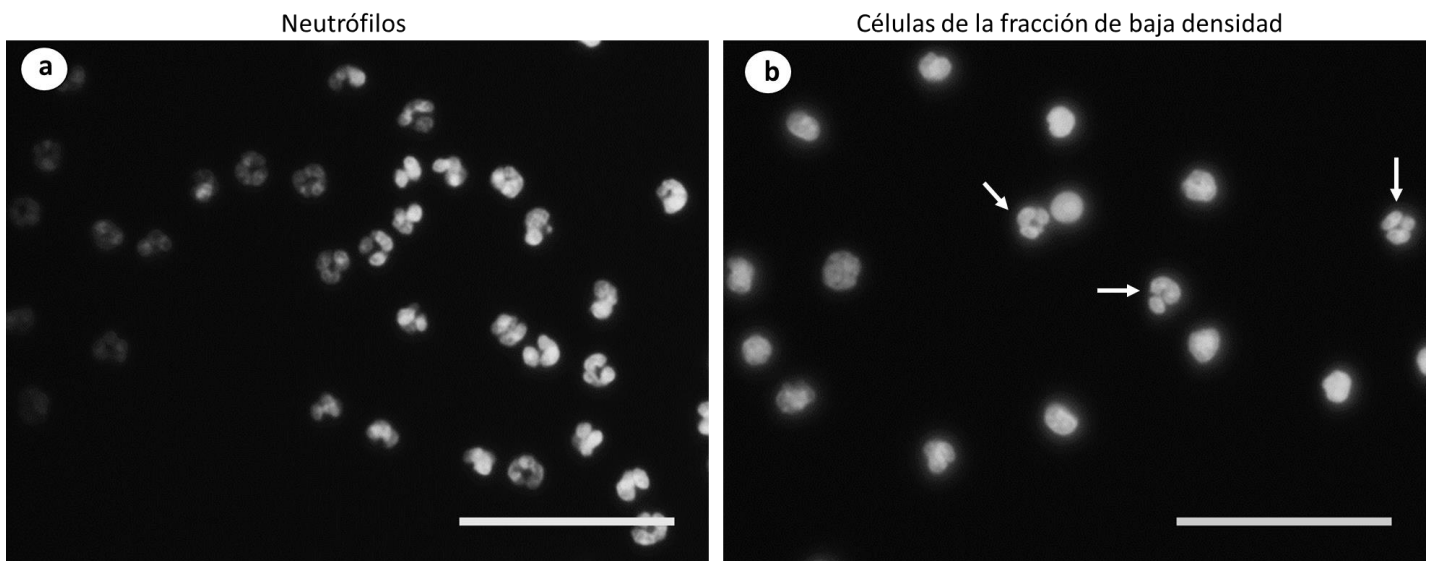


**Figura 6.** Expresión de las moléculas CD16b, CD11b, CD15, CD14 y CD66b en neutrófilos y neutrófilos de baja densidad (LDN). Las células se tiñeron para diferentes marcadores de superficie y los histogramas correspondientes a neutrófilos (línea azul) o a neutrófilos de baja densidad (LDN) (línea roja) se graficaron empalmados.



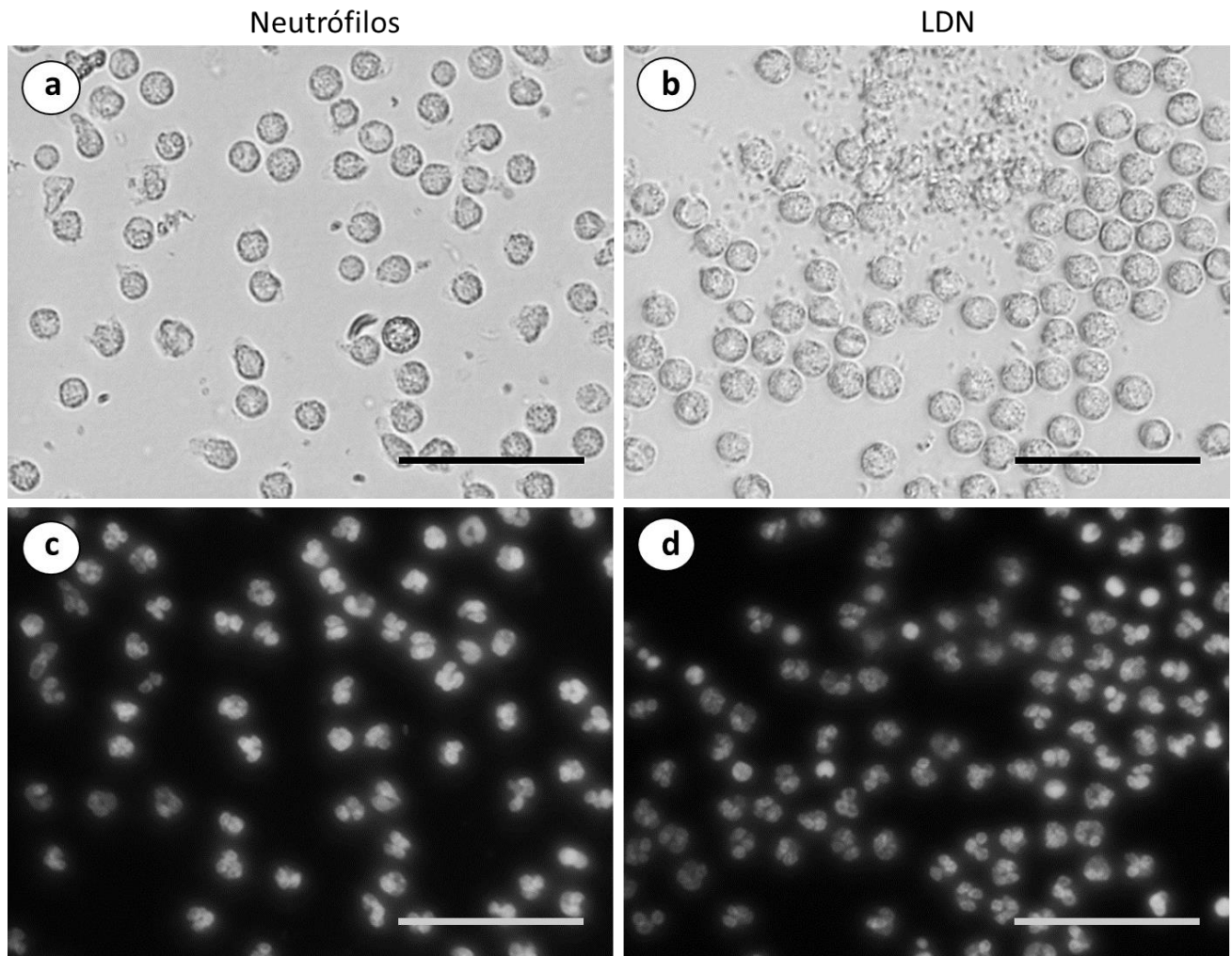
**Figura 7.** Expresión de las moléculas CD16b, CD11b, CD15, CD14 y CD66b en neutrófilos y neutrófilos de baja densidad (LDN). Las células se tiñeron para diferentes marcadores de superficie y se analizaron por citometría de flujo. El nivel de expresión (intensidad media de fluorescencia) de cada molécula en neutrófilos (barras blancas) o a neutrófilos de baja densidad (LDN) (barras negras) se graficaron juntos. Los datos para CD16b de neutrófilos son promedio  $\pm$  error estándar  $35819 \pm 4763$  de 9 determinaciones independientes. Los datos para CD16b de LDN son promedio  $\pm$  error estándar  $52932 \pm 6214$  de 9 determinaciones independientes. Los datos para CD15 de neutrófilos son promedio  $\pm$  error estándar  $13697 \pm 1639$  de 11 determinaciones independientes. Los datos para CD15 de LDN son promedio  $\pm$  error estándar  $35601 \pm 4189$  de 11 determinaciones independientes. Los asteriscos indican diferencias entre los dos grupos de células, \*  $p = 0,0441$  (para CD16b) y \*\*  $p < 0,0001$  (para CD 15) usando una prueba pareada de t de Student.

Una característica fundamental de los neutrófilos es la forma lobulada de su núcleo (Fig. 8a). Los datos anteriores mostraron que en las células mononucleares purificadas por gradiente de densidad, el  $5,549 \pm 0,7479\%$  de las células mononucleares corresponde a neutrófilos de baja densidad. Para observar si los LDN tenían núcleos con morfología típica de neutrófilos, la fracción mononuclear purificada se tiñó con DAPI ( $120 \mu\text{M}$ ) y las células se observaron en el microscopio invertido de fluorescencia. En la fracción de baja densidad se puede observar que la mayoría de las células tienen un núcleo redondo o semi redondo que corresponden principalmente linfocitos y monocitos respectivamente (Fig. 8b). Asimismo, se identificaron células con núcleos lobulados como los neutrófilos, al igual que los núcleos lobulados que se observan en la muestra de los neutrófilos (Fig. 8b). Esta evidencia apoya los resultados obtenidos por citometría de flujo para concluir que en personas sanas hay presencia de neutrófilos de baja densidad y su núcleo se mantiene multilobulado como los neutrófilos maduros.



**Figura 8.** *En la fracción de células mononucleares existen neutrófilos de baja densidad (LDN). Los neutrófilos y las células mononucleares se purificaron por gradiente de densidad en Ficoll-Paque. Cada fracción de células se tiñó con 120µM DAPI y se observaron con un microscopio invertido de fluorescencia. Imágenes de luz visible (paneles superiores) y de fluorescencia (paneles inferiores) muestran que entre las células mononucleares hay neutrófilos (flechas naranjas). La barra de escala representa 50 µm.*

Tal como los resultados anteriores indican, en la fracción de células mononucleares hay aproximadamente un 6 % de neutrófilos de baja densidad. Estas células tienen una morfología típica de neutrófilo con núcleo lobulado y tienen un fenotipo CD16b<sup>high</sup>, CD15<sup>high</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup> CD66b<sup>+</sup> que es diferente al de los neutrofilos. Usando esta estrategia de análisis es posible separar a los LDN de las demás células. Para esto, primero se realizó una inmunofluorescencia directa del receptor FcγRIIIb (CD16b) en las células en la fracción de baja densidad, CD16b es una molécula exclusiva de neutrófilos humanos (Rosales and Uribe-querol, 2013). Luego de hacer la inmunofluorescencia se realizó una separación (cell sorting) de las células CD16b positivas por citometría de flujo. Las células CD16b<sup>+</sup> separadas de esta forma (Fig. 9b), corresponden a los LDN de la fracción de las células mononucleares y tienen en su totalidad una morfología lobulada en sus núcleos (Fig. 9d) igual que los neutrófilos maduros (Fig. 9c).

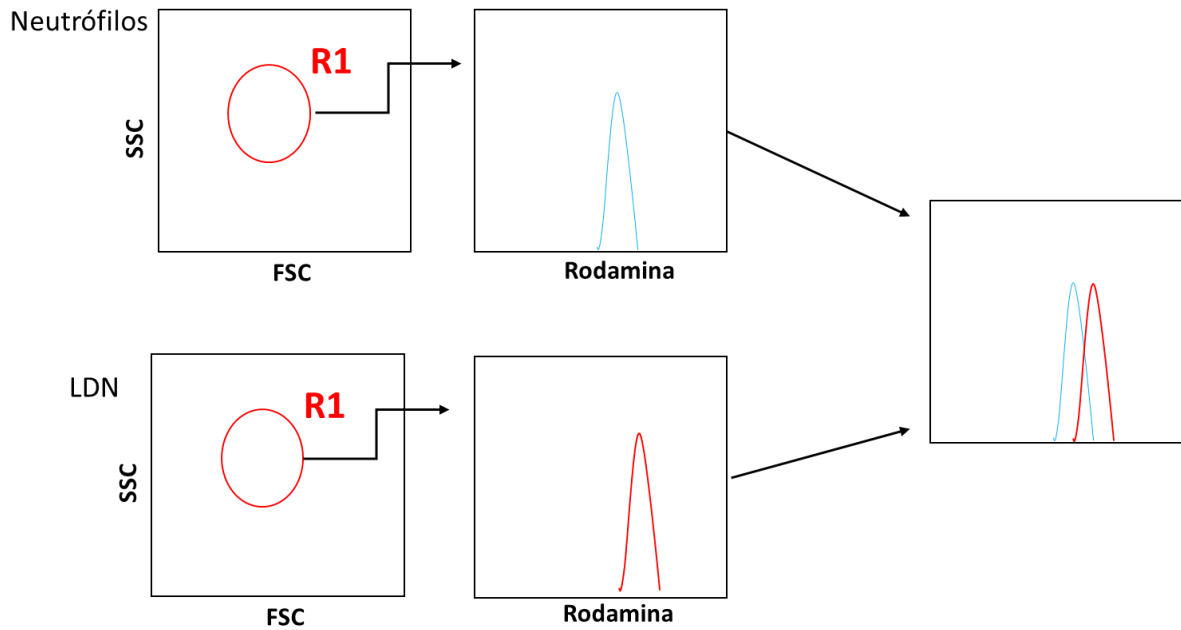


**Figura 9.** Los neutrófilos de baja densidad (LDN) tienen morfología típica de neutrófilos maduros. Las células mononucleares se purificaron por gradiente de densidad en Ficoll-Paque y se tiñeron con el anticuerpo específico para el receptor  $Fc\gamma RIIIb$  (CD16b) que es exclusivo de neutrófilos humanos. Las células  $CD16b^+$  separadas por citometría de flujo se tiñeron con 120  $\mu M$  DAPI y se observaron con un microscopio invertido de fluorescencia. Imágenes de luz visible (paneles superiores) y de fluorescencia (paneles inferiores) muestran que todos los LDN tienen morfología típica de neutrófilos maduros. La barra de escala representa 50  $\mu m$ .

2. Los neutrófilos de baja densidad tienen un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno.

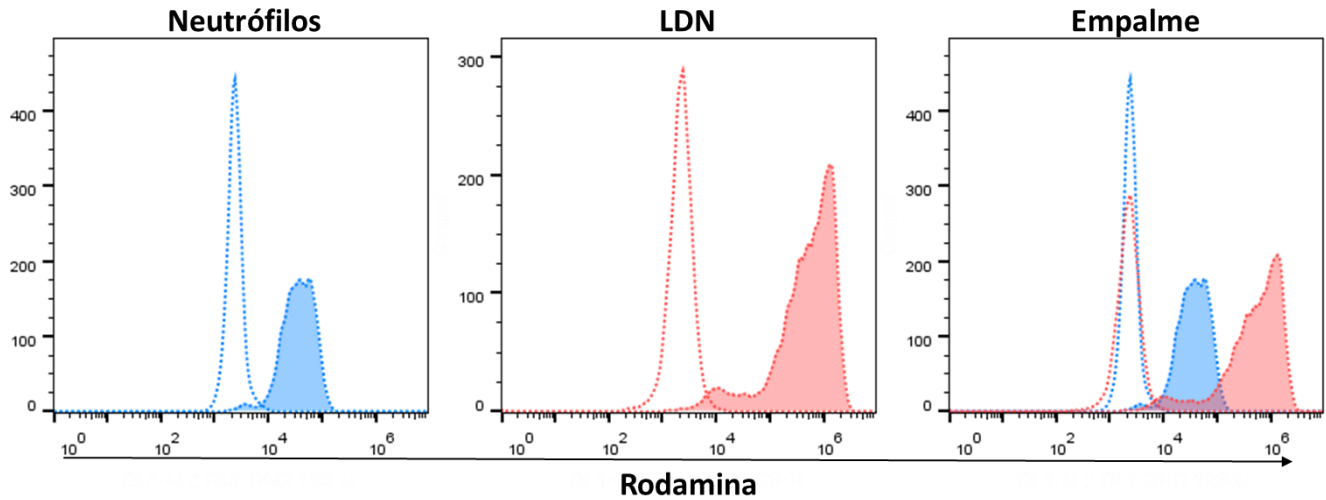
Los neutrófilos de baja densidad encontrados en las personas sanas mostraron un incremento en los niveles expresión de las moléculas CD16b y CD15. Este fenotipo diferente sugiere que probablemente los LDN sean también funcionalmente diferentes de los neutrófilos con densidad normal. Por lo tanto, se decidió evaluar varias funciones típicas de neutrófilos comparando los neutrófilos con los LDN.

Para evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) de los neutrófilos de baja densidad, las células de la fracción de baja densidad fueron teñidas con dihidrorodamina 123 (DHR 123) y posteriormente fueron estimuladas con PMA (120 nM). Como la DHR 123 es un compuesto que cuando está en contacto con especies reactivas de oxígeno se oxida y da lugar a la rodamina que es un compuesto fluorescente (Freitas et al., 2009), es posible detectar la presencia de especies reactivas de oxígeno midiendo la fluorescencia de rodamina. La producción de especies reactivas de oxígeno de los LDN se evaluó entonces por citometría de flujo. La estrategia de análisis primero se realizó en los neutrófilos. A partir del dot plot FSC vs SSC, se seleccionó la región (R1) donde se detectan los neutrófilos. Con las células de la región R1 se realizaron histogramas para detectar la fluorescencia de la rodamina, que representa la producción de ROS (Fig. 10).

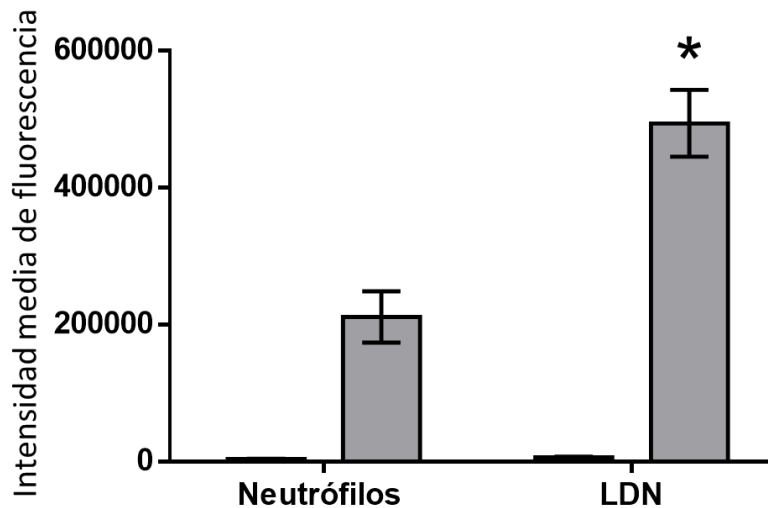


**Figura 10.** Estrategia de análisis para detección de especies reactivas de oxígeno (ROS). Tanto neutrófilos como células mononucleares purificadas por gradiente de densidad en Ficoll-Paque, se tiñeron con dihidrorodamina 123, posteriormente se estimularon con 120 nM PMA y se analizaron por citometría de flujo. Las células en la región 1 (R1), que corresponden a neutrófilos, se analizaron para detectar la fluorescencia de rodamina. Los histogramas correspondientes a neutrófilos (línea azul) o a neutrófilos de baja densidad (LDN) (línea roja) se graficaron empalmados.

Tanto los neutrófilos como los LDN fueron capaces de producir ROS en respuesta a la estimulación con PMA (Fig. 11). Sin embargo, los neutrófilos de baja densidad mostraron una capacidad mayor para producir ROS que los neutrófilos (Fig. 11). De hecho, los LDN producen más del doble de ROS que los neutrófilos (Fig. 12). Esto sugiere que los LDN son más reactivos que los neutrófilos.



**Figura 11.** Los neutrófilos de baja densidad (LDN) producen más especies reactivas de oxígeno (ROS) que los neutrófilos. Tanto neutrófilos como células mononucleares purificadas por gradiente de densidad en Ficoll-Paque, se tiñeron con dihidrorodamina 123, posteriormente se dejaron sin estímulo (líneas punteadas) o se estimularon con 120 nM PMA (líneas continuas) y se analizaron por citometría de flujo. Los histogramas muestran la fluorescencia de rodamina correspondiente a neutrófilos (línea azul) o a neutrófilos de baja densidad (LDN) (línea roja).



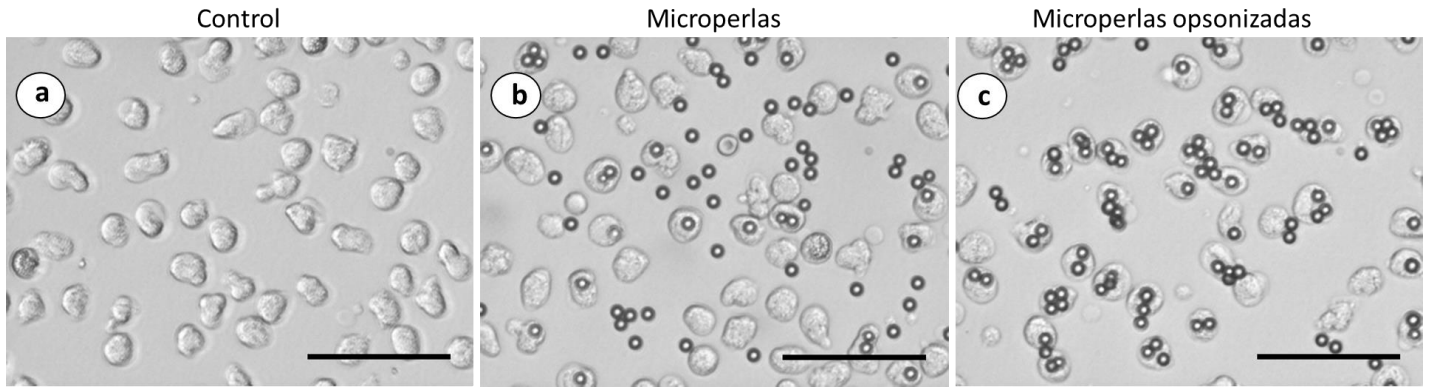
**Figura 12.** Los neutrófilos de baja densidad (LDN) producen más del doble especies reactivas de oxígeno (ROS) que los neutrófilos. Tanto neutrófilos como células mononucleares purificadas por gradiente de densidad en Ficoll-Paque, se tiñeron con dihidrorodamina 123, posteriormente se dejaron sin estímulo (barras

blancas) o se estimularon con 120 nM PMA (barras negras) y se analizaron por citometría de flujo. Los datos de neutrófilos estimulados con PMA son promedio  $\pm$  error estándar  $211237 \pm 37265$  de 9 determinaciones independientes. Los datos de LDN estimulados con PMA son promedio  $\pm$  error estándar  $493956 \pm 48701$  de 9 determinaciones independientes. El asterisco indica diferencias entre los dos grupos de células, \*p =0.0003 usando una prueba pareada de t de Student.

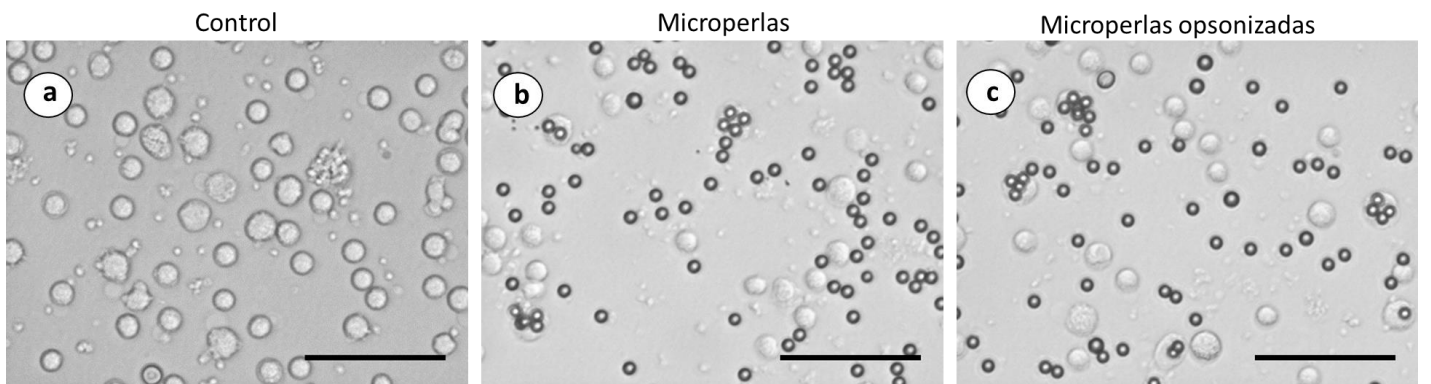
### 3. Los neutrófilos de baja densidad tienen mayor capacidad de fagocitar que los neutrófilos

Debido a que los resultados anteriores sugieren que los neutrófilos de baja densidad son más reactivos que los neutrófilos, se evaluó otra función fundamental de estas células, la fagocitosis. Los neutrófilos son capaces de fagocitar partículas que están opsonizadas con anticuerpos (Fig. 13). Cuando los neutrófilos se mezclan con microperlas de látex sin opsonizar algunas células pueden fagocitar las microperlas, indicando que los neutrófilos tienen una capacidad fagocítica basal (Fig. 13b). Sin embargo, cuando los neutrófilos encuentran microperlas opsonizadas la gran mayoría de ellos pueden fagocitar y cada célula es capaz de ingerir varias microperlas (Fig. 13c). De forma similar en la fracción de baja densidad, donde se encuentran principalmente células mononucleares que incluyen linfocitos y monocitos, encontramos que algunas células pueden fagocitar microperlas sin opsonizar (Fig. 14). En presencia de microperlas opsonizadas se encontraron que algunas células son capaces de fagocitar, pero no se observó realmente ninguna diferencia entre los dos tipos de microperlas (Fig. 14).





**Figura 13.** Los neutrófilos fagocitan eficientemente partículas opsonizadas con anticuerpo. Los neutrófilos se purificaron por gradiente de densidad en Ficoll-Paque y se mezclaron con microperlas de látex sin opsonizar (b) o con microperlas opsonizadas con anticuerpo (c). Las células se observaron con un microscopio invertido. La barra de escala representa 50  $\mu\text{m}$ .

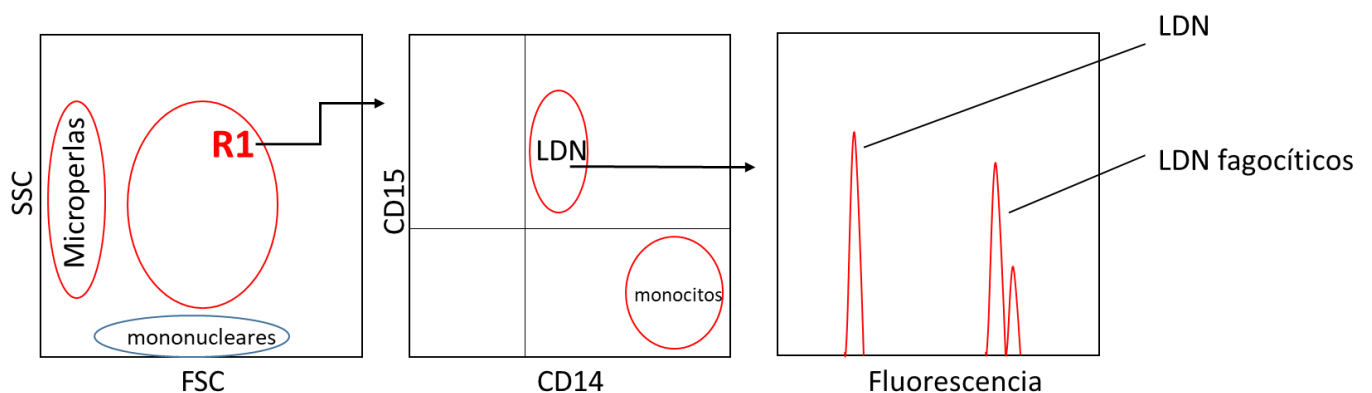


**Figura 14.** Algunas células mononucleares fagocitan microperlas de látex. Las células mononucleares se purificaron por gradiente de densidad en Ficoll-Paque y se mezclaron con microperlas de látex sin opsonizar (b) o con microperlas opsonizadas con anticuerpo (c). Las células se observaron con un microscopio invertido, encontrando que algunas células tienen capacidad fagocítica (flechas rojas). La barra de escala representa 50  $\mu\text{m}$ .

Debido a que los monocitos al igual que los neutrófilos tienen receptores Fc para detectar anticuerpos de tipo IgG (Rosales and Uribe-querol, 2013), en las muestras de células mononucleares no es posible diferenciar al microscopio si las células

fagocíticas son los LDN o los monocitos. Esto impide que se pueda calcular el porcentaje de LDN que sean fagocíticos. Entonces para solventar este problema, se analizó la fagocitosis por medio de citometría de flujo, usando microperlas fluorescentes. Además, las células se marcaron con anticuerpos para identificar las moléculas de superficie CD15 y CD14 y de esta manera poder diferenciar claramente los LDN con un fenotipo CD15<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> de los monocitos con un fenotipo CD15<sup>-</sup> CD14<sup>high</sup> (Zhang et al., 2017).

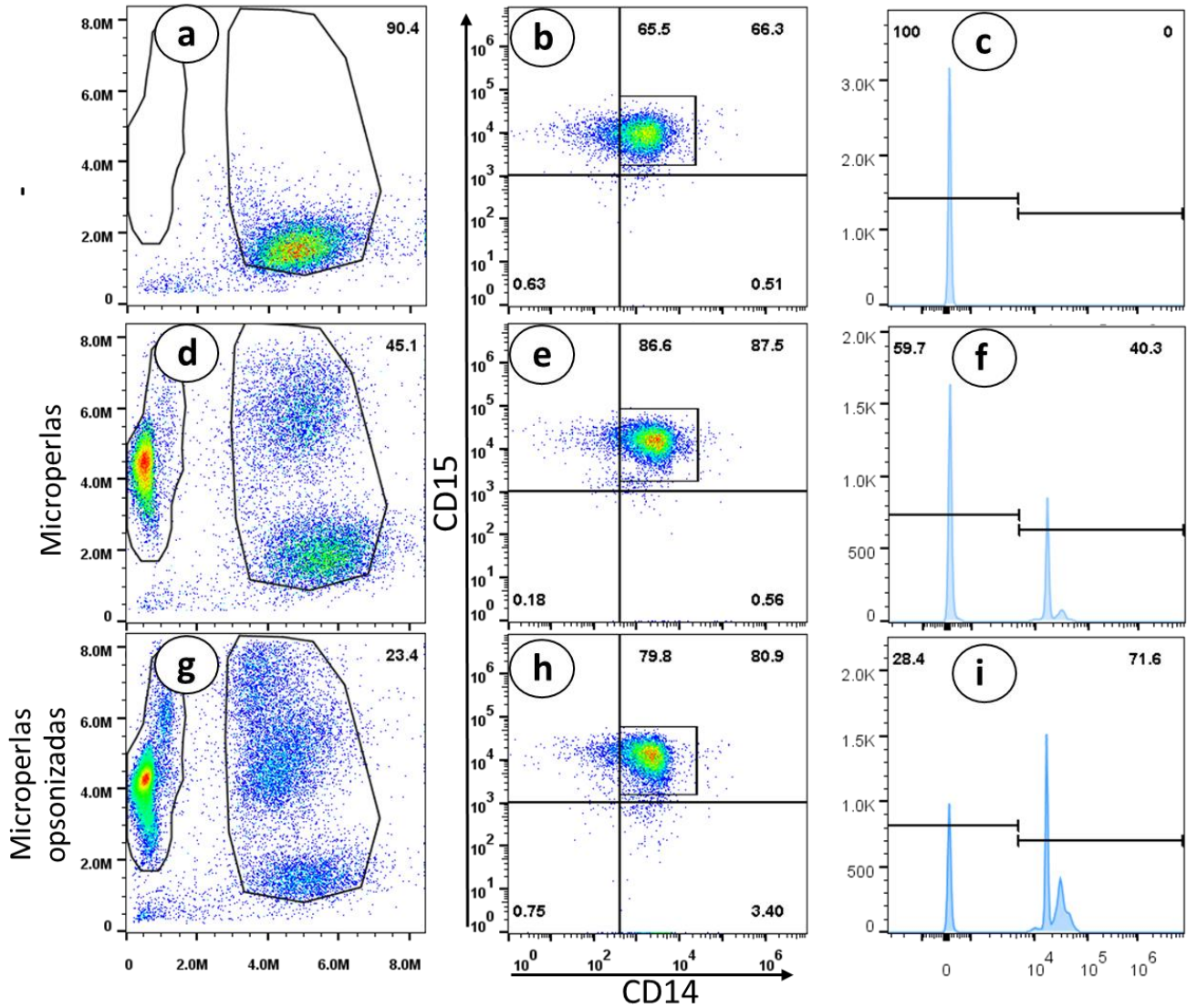
Para esta estrategia de análisis, las células mononucleares se analizaron primero con el dot plot de FSC vs SSC y se seleccionó la región de los neutrófilos (R1) (Fig. 15). A partir de R1 se realizó otro dot plot de CD15 vs CD14 y únicamente se seleccionó la región CD15<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> (R2). Finalmente de la región R2 se realizó un histograma para detectar la fluorescencia de las microperlas que fueron fagocitadas (Fig. 15).



**Figura 15.** Estrategia de análisis para fagocitosis por neutrófilos de baja densidad. Las células mononucleares purificadas por gradiente de densidad en Ficoll-Paque, se tiñeron con anticuerpos anti CD14 y anti CD15. Posteriormente las células se mezclaron con microperlas fluorescentes opsonizadas con anticuerpo. Las células en la región 1 (R1), que corresponden a neutrófilos, se analizaron en un dot plot de CD14 vs CD15. Finalmente, las células con un fenotipo

CD15<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> que corresponden a neutrófilos de baja densidad (LDN) se analizaron en un histograma para detectar la fluorescencia de las microperlas fagocitadas. Los monocitos con un fenotipo CD15<sup>-</sup> CD14<sup>high</sup> quedan excluidos en este análisis.

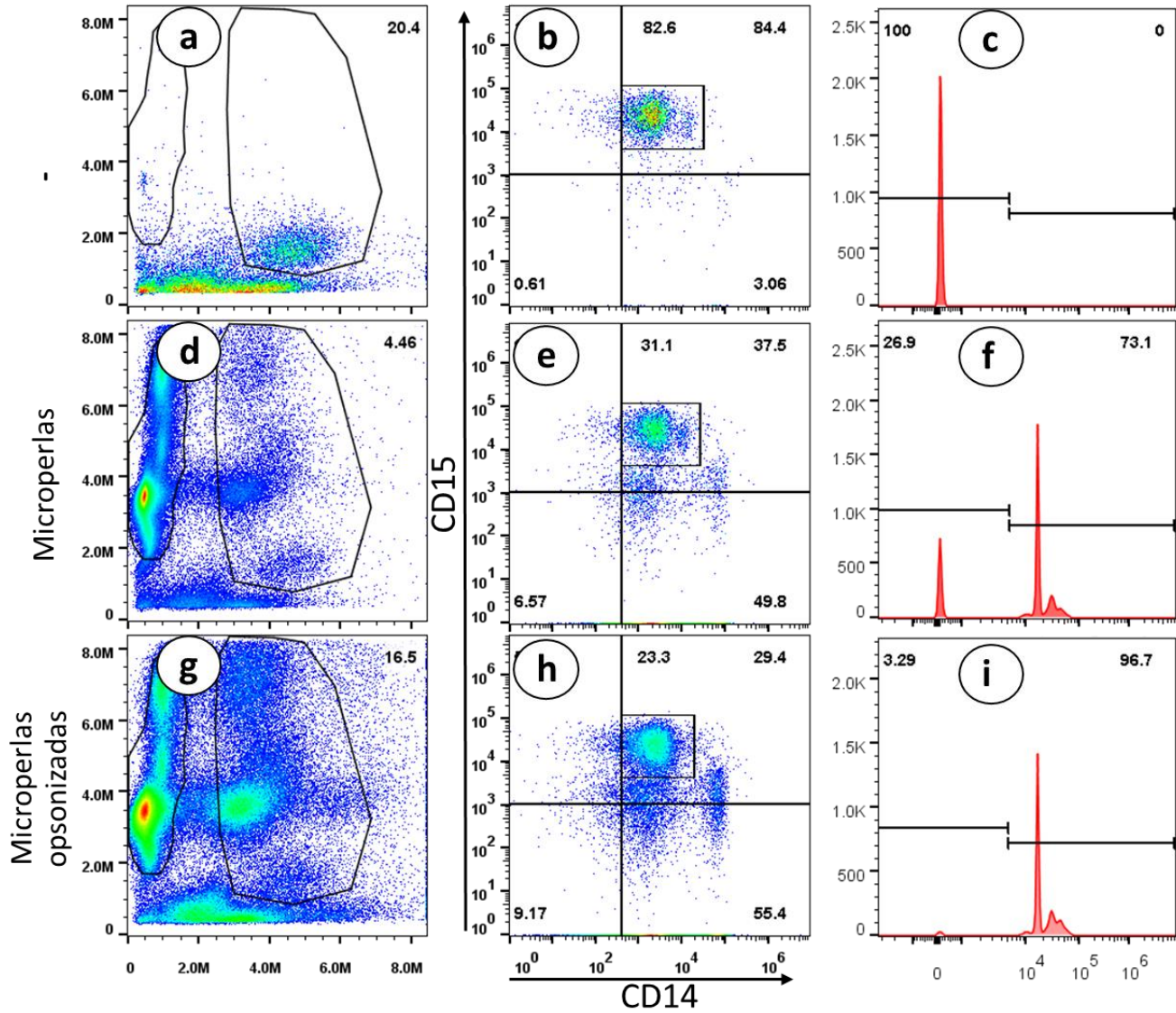
Cuando los neutrófilos son sometidos este análisis se ve que todas las células forman una población homogénea en el dot plot de SSC vs FSC (Fig. 16a) En presencia de microperlas no opsonizadas algunas células cambian su tamaño y granularidad apareciendo como una segunda población (Fig. 16d). Esto indica que algunos neutrófilos han fagocitado las microperlas. Esto se confirma por la aparición de un pico con alta fluorescencia en el histograma (Fig. 16f). En presencia de microperlas opsonizadas aparece una tercera población de células (Fig. 16g) indicando que algunas células han fagocitado aún más. Esto se refleja claramente en el histograma donde aparece un segundo pico con muy alta fluorescencia (Fig. 16i). En todos los casos las células conservan su fenotipo CD14<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> típico de neutrófilos (Fig. 16 paneles b, e, h).



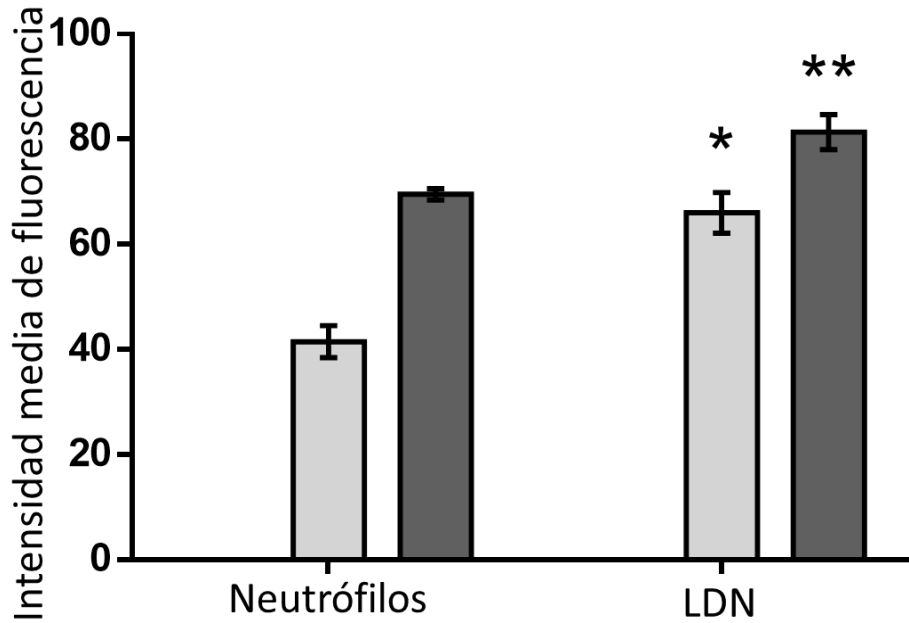
**Figura 16.** Los neutrófilos fagocitan microperlas fluorescentes opsonizadas. Neutrófilos purificados por gradiente de densidad en Ficoll-Paque, se tiñeron con anticuerpos anti CD14 y anti CD15 y posteriormente se dejaron solos (paneles superiores), se mezclaron con microperlas fluorescentes no opsonizadas (paneles centrales), o con microperlas fluorescentes opsonizadas con anticuerpo (paneles inferiores). Las células con el fenotipo CD14<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> que corresponde a neutrófilos se analizaron en un histograma para detectar la fluorescencia de las microperlas fagocitadas.

Un análisis similar con las células mononucleares indica que los neutrófilos de baja densidad fagocitan más eficientemente que los neutrófilos (Fig. 17). En presencia de microperlas no opsonizadas aparecen en la región de neutrófilos tres poblaciones celulares, lo cual sugiere algunas células cambian su tamaño y granularidad por fagocitosis (Fig. 17d). Sin embargo, el dot plot de CD14 vs CD15 muestra que algunas de estas células son CD14<sup>high</sup> CD15<sup>low</sup>, indicando que son monocitos (Fig. 17 paneles e, h). Concentrando nuestra atención sólo en las células CD14<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> que corresponde a neutrófilos (Fig. 15), se encontró que los neutrófilos de baja densidad tienen un mayor porcentaje de células fagocíticas para internalizar microperlas sin opsonizar que los neutrófilos (Fig. 17f). En presencia de microperlas opsonizadas los LDN todavía fagocitan más eficientemente que los neutrófilos (Fig. 17i).

En todos los casos los LDN mostraron un mayor porcentaje de células fagocíticas que los neutrófilos (Fig. 18). Mientras que el  $41.48 \pm 3.027\%$  de los neutrófilos fagocitaron microperlas sin opsonizar, alrededor del  $66.03 \pm 3.862\%$  de los LDN fagocitaron microperlas no opsonizadas (Fig. 18). En presencia de microperlas opsonizadas  $69.52 \pm 1.082\%$  de los neutrófilos fagocitaron, mientras que alrededor del  $81.38 \pm 3.297\%$  de los LDN fagocitaron (Fig.18).



**Figura 17.** Los neutrófilos de baja densidad fagocitan más eficientemente que los neutrófilos. Células mononucleares purificadas por gradiente de densidad en Ficoll-Paque, se tiñeron con anticuerpos anti CD14 y anti CD15 y posteriormente se dejaron solos (paneles superiores), se mezclaron con microperlas fluorescentes no opsonizadas (paneles centrales), o con microperlas fluorescentes opsonizadas con anticuerpo (paneles inferiores). Las células con el fenotipo CD14<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> que corresponde a neutrófilos de baja densidad se analizaron en un histograma para detectar la fluorescencia de las microperlas fagocitadas.

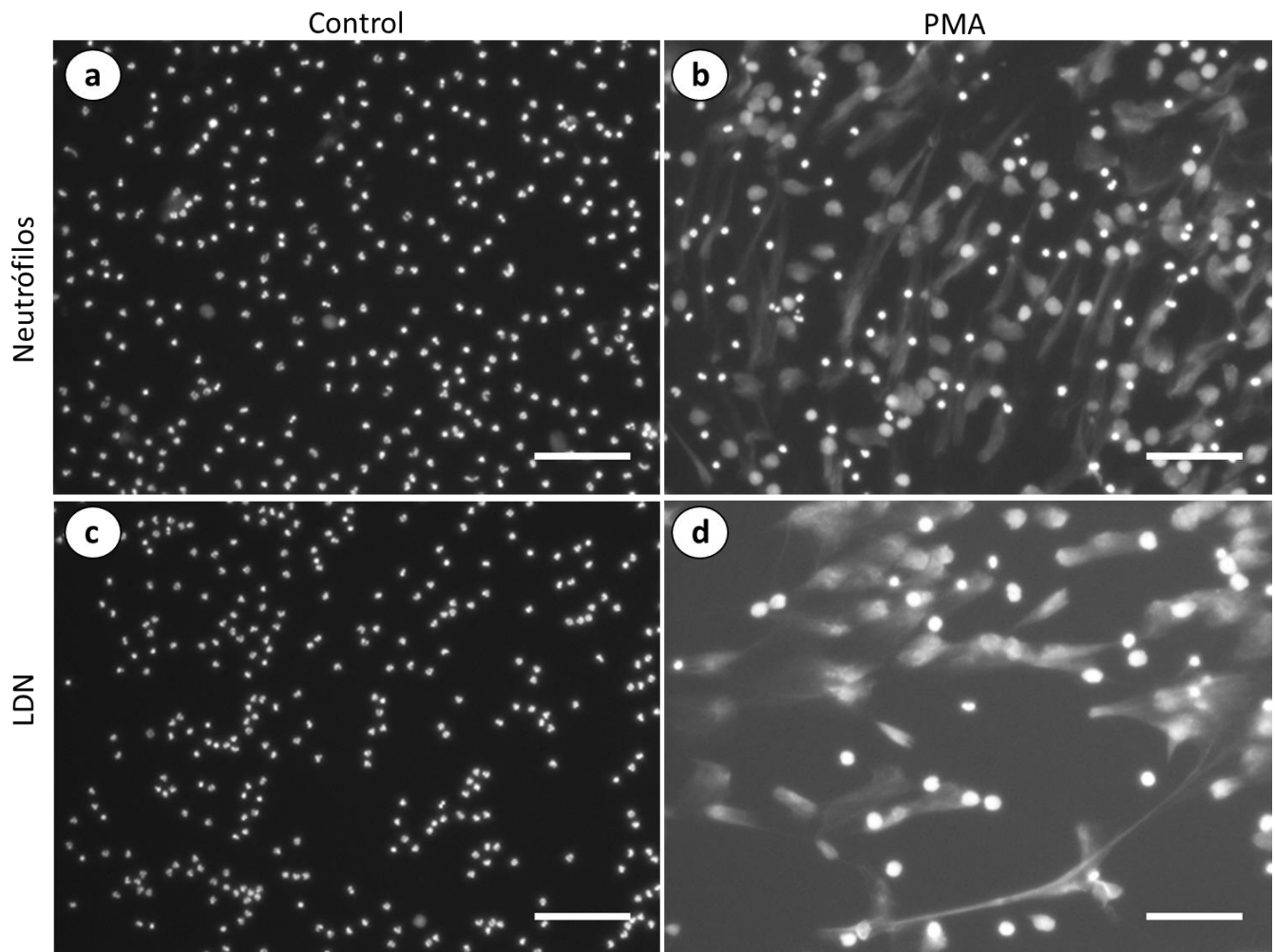


**Figura 18.** Los neutrófilos de baja densidad fagocitan más eficientemente que los neutrófilos. Neutrófilos o células mononucleares purificadas por gradiente de densidad en Ficoll-Paque, se tiñeron con anticuerpos anti CD14 y anti CD15 y posteriormente se dejaron solos (barras blancas), se mezclaron con microperlas fluorescentes no opsonizadas (barras grises), o con microperlas fluorescentes opsonizadas con anticuerpo (barras negras). Las células con el fenotipo CD14<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup> que corresponde a neutrófilos de baja densidad se analizaron por citometría de flujo para detectar la fagocitosis de las microperlas. Los datos de neutrófilos con microperlas sin opsonizar son promedio ± error estándar 41.48 ± 3.027 de 4 determinaciones independientes. Los datos de neutrófilos con microperlas opsonizadas son promedio ± error estándar 69.52 ± 1.082 de 4 determinaciones independientes. Los datos de LDN con microperlas sin opsonizar son promedio ± error estándar 66.03 ± 3.862 de 4 determinaciones independientes. Los datos de LDN con microperlas opsonizadas son promedio ± error estándar 81.38 ± 3.297 de 4 determinaciones independientes. Los asteriscos indican diferencias entre los dos grupos de células, \*p = 0.0024 (para microperlas sin opsonizar) y \*\*p = 0.0142 (para microperlas opsonizadas) usando una prueba pareada de t de Student.

4. Los neutrófilos de baja densidad son capaces de producir trampas extracelulares de neutrófilos (NET)

Posteriormente para determinar si los neutrófilos de baja densidad (LDN) tienen la capacidad de generar NET, estas células se purificaron a partir de la fracción de células mononucleares mediante citometría de flujo (cell sorting). Las células mononucleares se tiñeron para identificar el receptor Fc $\gamma$ RIIIb (CD16b) y luego se realizó un cell sorting para separar las células CD16b<sup>+</sup> (LDN). A partir de 6x10<sup>6</sup> células mononucleares se obtuvieron un poco más de 3.5 x 10<sup>5</sup> células CD16b<sup>+</sup> que corresponden a los LDN. Los LDN fueron estimulados con PMA y después de 4 horas se tiñeron con DAPI para visualizar el DNA. Los LDN fueron capaces de producir NET al igual que los neutrófilos (Fig. 19). En los LDN estimulados con PMA se pueden observar los característicos núcleos descondensados que aparecen durante la NETosis (Mesa and Vasquez, 2013) y también se observan fibras de DNA afuera de los LDN (Sollberger et al., 2018) que se visualizan por la tinción con DAPI (Fig. 19). Con estos resultados sabemos que los LDN son capaces de producir NET al ser estimulados con PMA.





**Figura 19.** *Los neutrófilos de baja densidad pueden formar NET.* Neutrófilos (a y b) purificados por gradiente de densidad en Ficoll-Paque, o neutrófilos de baja densidad purificados por cell sorting (c y d) fueron dejados sin estimular (control) o estimulados con 120 nM PMA (b y d). Después de 4 horas, las células se tiñeron con DAPI para visualizar el DNA. La barra de escala representa 100  $\mu$ m.

## IX. DISCUSIÓN

La heterogeneidad celular es una propiedad fundamental que permite la especialización funcional y la adaptación a los cambios del ambiente. La diferenciación en los leucocitos hacia las distintas subpoblaciones requiere de plasticidad transcripcional y tiempo para integrar las señales del ambiente (Nicolas Ávila et al., 2017). Debido a la corta vida de los neutrófilos se consideraba que era una población homogénea pues se pensaba que únicamente se encargaban de las defensas innatas. (Rosales, 2018).

Recientemente se ha descrito que los neutrófilos cambian de fenotipo durante su vida; una vez que los neutrófilos han sido liberados a circulación sufren cambios en la expresión de moléculas de sus membranas hasta que son eliminados de circulación (Adrover et al., 2016). En personas sanas se han reportado presencia de neutrófilos en varios tejidos realizando funciones específicas. En pulmón se ha observado neutrófilos que se encuentran adheridos por mecanismos dependientes de CXCR4 (Devi et al., 2013). En bazo, se han detectado neutrófilos que inducen la hipermutación somática y producción de anticuerpos de los linfocitos B (Puga et al., 2011). En nódulos linfáticos, los neutrófilos que se movilizan a estas regiones son capaces de funcionar como células presentadoras de antígeno y activar células T (Duffy et al., 2012).

Estos reportes nos apoyan a la idea que los neutrófilos pueden mostrar una amplia variedad de fenotipos y funciones; sugiriendo que los neutrófilos son una población heterogénea. De hecho, los neutrófilos pueden liberar diferentes mediadores pro-

inflamatorios y citocinas que contribuyen a direccionar la respuesta inmunológica (Rosales, 2018).

En la actualidad se ha sumado otra posible subpoblación de neutrófilos llamada neutrófilos de baja densidad. Se ha descrito la presencia de LDN en ciertas patologías, pero se desconoce si hay existencia de los LDN en individuos sanos, por lo tanto el objetivo de este trabajo fue identificar la presencia de LDN en la capa mononuclear de personas sanas.

A diferencia de otros estudios para identificar LDN en la capa mononuclear de personas sanas, en este trabajo se usó una combinación de anticuerpos para identificar moléculas de superficie presentes en los neutrófilos. Al analizar la fracción de células polimorfonucleares se observó que los neutrófilos mostraron un fenotipo CD16b<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> CD66b<sup>+</sup>, como ya se ha reportado anteriormente (Lakschevitz et al., 2016). Al analizar la capa de células mononucleares, sorprendentemente se identificaron células que mostraron un fenotipo CD16b<sup>high</sup> CD15<sup>high</sup> CD11b<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>, por lo tanto, muestran un fenotipo diferente por tener un aumento en los niveles de expresión de las moléculas CD16b y CD15. Con esta evidencia se comprobó la presencia de LDN en personas sanas.

Para la purificación de neutrófilos hay autores que utilizan anticoagulantes como heparina (García-García et al., 2013; Hayashi et al., 2003; Sagiv et al., 2015) o EDTA (Cloke et al., 2012; Deng et al., 2016; Ssemaganda et al., 2014; Zhang et al., 2017) para purificar neutrófilos. Recientemente ha surgido la hipótesis que propone que la heparina activa a los neutrófilos que a su vez degranulan, se hacen menos densos y aparecen en la fracción de las células mononucleares, sin embargo, no

hay ningún estudio que soporte tal hipótesis. Por lo tanto, en este trabajo se utilizaron los anticoagulantes EDTA y heparina para purificar neutrófilos y al evaluar el porcentaje de neutrófilos de baja densidad no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de LDN de la capa mononuclear de personas sanas. Esto indica que el anticoagulante no influye en el porcentaje de LDN. Por otro lado, para realizar los experimentos de funcionalidad no se usó las células purificadas con EDTA debido a que el EDTA es un agente quelante de calcio (Banfi Giuseppe et al., 2007) y los neutrófilos necesitan calcio para realizar diversas funciones. Por este motivo, para los ensayos de funcionalidad se usaron los neutrófilos purificados con heparina.

Asimismo, los neutrófilos y los LDN comparten características de tamaño y granularidad similares respecto a los parámetros relativos de FSC y SSC que se detectan en la gráfica de la región R1 (Fig. 2) donde normalmente se detectan los neutrófilos. En esa misma región y únicamente ahí también se detectan los LDN de la fracción de baja densidad (Fig. 3), por lo tanto, usando citometría de flujo se puede separar la población de los LDN de los linfocitos y monocitos.

Cuando se evaluaron los niveles de expresión de las moléculas de superficie de los neutrófilos y LDN, se encontró que los LDN tienen un aumento en los niveles de expresión de las moléculas CD16b y CD15 en comparación con los neutrófilos. Se ha descrito que los neutrófilos activados pierden expresión del Fc $\gamma$ IIIb (CD16b) (Wang and Jönsson, 2019), sin embargo, los resultados obtenidos indican que en donadores sanos los LDN tienen incluso niveles más altos en la expresión de CD16b. Por otro lado, CD15 (también llamado antígeno de Lewis X) es un

carbohidrato que está ligado a integrinas como CD11b. Los neutrófilos activados que han hecho trans migración epitelial muestran un aumento de CD15 (Brazil et al., 2016), por lo tanto, si los LDN fueron tomados de circulación y ya cuentan con niveles más altos de CD15 posiblemente tengan un fenotipo preactivado. Respecto a las otras moléculas de superficie que se analizaron CD66b, CD11b, y CD14 no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los LDN y los neutrófilos (Fig. 7).

Al observar la morfología nuclear las células de la capa mononuclear encontramos células con núcleos multilobulados, las cuales podrían corresponder a las células CD16b<sup>high</sup> CD15<sup>high</sup> CD11b<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> CD66b<sup>+</sup> (LDN) que se identificaron anteriormente. Para tener la población de LDN separada de las células mononucleares se realizó un cell sorting de las células CD16b<sup>+</sup> de la capa mononuclear y como se observa en la figura 9 todas las células purificadas CD16b<sup>+</sup> tienen núcleos multilobulados característicos de los neutrófilos.

En 2006, Adrover et al, describieron que los neutrófilos durante su proceso de envejecimiento en circulación muestran núcleos hipersegmentados (Adrover et al., 2016). Las células CD16b<sup>+</sup> (LDN) muestran núcleos típicos de neutrófilos maduros, de esta forma se sugiere que los LDN no son neutrófilos viejos. Con esta evidencia se demostró la presencia de LDN CD16b<sup>high</sup> CD15<sup>high</sup> CD11b<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> CD66b<sup>+</sup> en personas sanas, lo cual no se había reportado anteriormente. Además, en este análisis se utilizó un panel de moléculas más amplio para identificar neutrófilos.

Otro objetivo fue evaluar la funcionalidad de los LDN y compararlos contra los neutrófilos. La producción de ROS es esencial para funciones como fagocitosis,

producción de NET y degranulación. Al evaluar la producción de ROS de los LDN encontramos que producen cantidades más altas de ROS al ser estimulados con PMA en comparación con los neutrófilos (Fig. 12). Este incremento de los LDN para producir ROS se encuentra alrededor de más de dos veces en comparación con los neutrófilos, sin embargo, se desconocen otras cuestiones como por qué los LDN tienen la capacidad de producir más ROS que los neutrófilos, si los LDN podrían ser metabólicamente más rápidos para generar ROS que los neutrófilos, o si el incremento de la producción de ROS podría estar influyendo en la velocidad o la cantidad de producción de NET. No obstante, con estos resultados se sugiere que los LDN podrían tener un fenotipo preactivado por tener un aumento en la producción de ROS.

Al encontrar que los LDN producían más ROS en comparación con los neutrófilos, se evaluó su función fagocítica. Para realizar el ensayo de fagocitosis se usaron microperlas de látex recubiertas con anticuerpo de tipo IgG y se colocaron en suspensión con las muestras de LDN y neutrófilos. En las muestras de los neutrófilos se observó claramente que al estar en contacto con las microperlas son capaces de fagocitarlas (Fig. 13b) y el porcentaje de células fagocíticas aumenta cuando las microperlas están recubiertas de anticuerpo (Fig. 13c).

La capa de células mononucleares principalmente está compuesta por linfocitos, monocitos y los LDN. Aunque se observan unas células que fagocitan microperlas sin opsonizar (Fig. 14b) y este número de células que fagocitan aumentan con las microperlas opsonizadas (Fig. 14c), los LDN se encuentran mezclados con los monocitos, los cuales tienen en su membrana celular receptores Fc para reconocer

anticuerpos (Rosales and Uribe-Querol, 2013), por lo tanto, los monocitos también pueden identificar y fagocitar las microperlas de látex opsonizadas. De esta manera es difícil diferenciar por microscopia a los LDN de los monocitos.

Para resolver este problema se usó nuevamente citometría de flujo. Esta reportado que los monocitos expresan CD15<sup>-</sup>CD14<sup>high</sup> (Zhang et al., 2017) y los neutrófilos son CD15<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>. Con esta diferencia entre los fenotipos de monocitos y neutrófilos se diferenciaron a los LDN de los monocitos en la capa mononuclear, además para detectar el porcentaje de células fagocíticas se usaron microperlas de látex fluorescentes.

Al evaluar la fagocitosis en los neutrófilos se observó que son dobles positivos para CD15 y CD14 (Fig.16b, e, h) como ya se había demostrado anteriormente. A partir de los neutrófilos CD15<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> (Fig. 16b) se obtuvo el porcentaje de células fagocíticas. Primero se colocó el control de neutrófilos sin microperlas y se observó únicamente un histograma (Fig. 16c) que corresponde a la auto fluorescencia de las células. Es importante mencionar que la región positiva de células fagocíticas se seleccionó usando únicamente microperlas fluorescentes, el histograma que arrojó se encontró aproximadamente en  $10^4$ , por lo tanto las células que se encontraron en la escala de  $10^4$  en adelante se consideraron positivas para fagocitosis debido a que se detecta a las células CD15<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> con microperlas fluorescentes adentro.

De esta manera, cuando se colocaron microperlas sin opsonizar, se observan dos histogramas con diferente fluorescencia (Fig. 16f): el histograma con menor fluorescencia corresponde a los neutrófilos que no fagocitaron y el histograma con mayor fluorescencia son los neutrófilos que tienen adentro microperlas lo cual nos

indica el porcentaje de células fagocíticas. Cuando agregamos microperlas opsonizadas con IgG se puede observar como el tamaño de los histogramas cambian de proporción (Fig.16i) lo cual es indicativo de un aumento en el porcentaje de células fagocíticas.

En los LDN las muestras se observan con más eventos en los dot plot de FSC vs SSC debido a que como los LDN se encuentran alrededor del 6% de la capa mononuclear se necesita capturar un mayor cantidad de volumen (Fig. 17 a, d, g). Asimismo, los LDN muestran un fenotipo CD15<sup>high</sup> CD14<sup>+</sup> y se diferencian de los monocitos por ser CD15<sup>-</sup>CD14<sup>high</sup> que puede observarse en los dot plot de CD15 vs CD14 (Fig. 17 b, e, h).

Cuando se le agrega microperlas sin opsonizar a los LDN se observa claramente que el histograma con mayor fluorescencia corresponde al porcentaje de células fagocíticas (Fig. 17f). Al tener LDN con microperlas opsonizadas se encontró que únicamente hay un histograma que corresponde a las células fagocíticas (Fig. 17i). Al juntar todos los experimentos se encontró que en los neutrófilos con microperlas sin opsonizar hay un 41% de células fagocíticas, este porcentaje aumenta casi al 70% cuando se agregaron perlas opsonizadas (Fig. 18). Sorprendentemente en los LDN con microperlas sin opsonizar hay alrededor de 66% de células fagocíticas que es casi lo mismo que los neutrófilos con microperlas opsonizadas. De forma interesante, cuando se agregan microperlas opsonizadas a los LDN el porcentaje de células fagocíticas aumenta a un 81%.

Estos resultados indican que los LDN podrían tener un fenotipo preparado o activado ya que muestran más porcentaje de células fagocíticas y mayor capacidad



de producir ROS en comparación a los neutrófilos, sin embargo, se desconoce si los LDN son más fagocíticos que los neutrófilos clásicos. En 2016, Alemán et al. describieron que el receptor Fc $\gamma$ IIa (CD32a) es el responsable de llevar a cabo la fagocitosis mediada por anticuerpos en neutrófilos humanos (Alemán et al., 2016). Aquí se encontró que los LDN tienen una mayor expresión de CD16b (Fig. 7) y tienen mayor porcentaje de células fagocíticas, pudiendo sugerir una mayor expresión de la molécula CD32 que les permita ser más fagocíticos.

Posteriormente, se evaluó la capacidad de los LDN para generar NET. Al tener a los LDN purificados del cell sorting, los LDN fueron estimulados con PMA (20nM) y después de 4 horas de incubación se observaron por microscopía de fluorescencia. Los LDN también son capaces de producir NET (Fig. 19 d) similar a los neutrófilos (Fig. 19b). Aunque se desconoce si los LDN producen mayor cantidad de redes o si son más rápidos en hacerlas en comparación con los neutrófilos, se ha reportado que el receptor Fc $\gamma$ IIIb (CD16b) al ser estimulado entrecruzando los receptores es responsable de producir NET (Alemán et al., 2016), entonces, es posible que los LDN debido a que tienen un incremento en la expresión de CD16b, tengan la capacidad de generar mayor producción de NET al entrecruzar los receptores Fc $\gamma$ IIIb.

Además se encontró que si hay presencia de LDN en personas sanas y el anticoagulante no tiene ningún efecto en los porcentajes de los LDN. Los LDN muestran niveles de expresión aumentados de las moléculas CD15 y CD16b en comparación con los neutrófilos clásicos. Sin embargo, una parte de la hipótesis planteada fue rechazada ya que se propuso que los LDN tendrían funciones

reducidas como se observó en los ratones con cáncer (Sagiv et al., 2015) y al evaluar algunas de sus funciones se encontró que producen más ROS y que tienen un mayor porcentaje de células fagocíticas en comparación con los neutrófilos. Además, tienen la capacidad de producir NET al ser estimulados con PMA de forma similar a los neutrófilos.

Se descartó la posibilidad de que los LDN sean neutrófilos viejos en circulación que hayan hecho transmigración epitelial debido a que los neutrófilos viejos muestran un aumento en la expresión de CD11b y muestran núcleos hipersegmentados. En los resultados mostrados, los niveles de expresión de CD11b de los LDN y neutrófilos se encuentran similares (Fig. 7), así como los núcleos de los LDN no se observan hipersegmentados (Fig. 9d) y tienen una apariencia similar a los neutrófilos (Fig. 9c).

Estas evidencias sugieren que los neutrófilos de baja densidad podrían estar preactivados o preparados, es decir, que posiblemente sea un fenotipo diferente o una subpoblación de neutrófilos. Esto apoya la idea que los neutrófilos son células transcripcionalmente activas y una población heterogénea.

## X. CONCLUSIONES

1. En donadores sanos se encontraron LDN que corresponden al  $5,549 \pm 0,7479\%$  del total de las células mononucleares.
2. Los LDN mostraron el fenotipo  $CD16b^{high} CD15^{high} CD11b^{+} CD14^{+} CD66b^{+}$ , el cual es diferente al de los neutrófilos que son  $CD16b^{+} CD15^{+} CD11b^{+} CD14^{+} CD66b^{+}$ .
3. Los LDN al ser estimulados con PMA tienen la capacidad de producir más del doble de ROS que los neutrófilos.
4. Los LDN tienen el  $81.38 \pm 3.297\%$  de células fagocíticas a diferencia de los neutrófilos que tienen el  $69.52 \pm 1.082\%$  de células fagocíticas.
5. Los LDN tienen la capacidad de producir NET de manera similar a los neutrófilos.

## XI. PERSPECTIVAS

1. Evaluar la capacidad de fagocítica de los LDN obteniendo el índice fagocítico para determinar si los LDN son capaces de fagocitar más que los neutrófilos. Asimismo, medir los niveles de expresión del receptor  $Fc\gamma IIa$  (CD32a) para observar si hay alguna relación entre los niveles de expresión y la capacidad fagocítica de los LDN.
2. Realizar una cinética de producción de ROS de los LDN para comparar su comportamiento respecto a los neutrófilos.
3. Realizar una cinética de producción de NET y cuantificarlas para determinar si los LDN producen la misma cantidad de NET y si son liberadas al exterior al mismo tiempo que los neutrófilos.
4. Para observa si las funciones de los LDN de personas sanas cambian en personas enfermas, se pretende evaluar las funciones de los LDN de producción de ROS, fagocitosis, degranulación y producción de NET en pacientes con diabetes o cáncer.

## XII. REFERENCIAS

- Adrover, J. M., Nicolás-Ávila, J. A. and Hidalgo, A.** (2016). Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils. *Trends Immunol.* **37**, 334–345.
- Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O.** (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* **124**, 783–801.
- Alemán, O. R., Mora, N., Cortes-Vieyra, R., Uribe-Querol, E. and Rosales, C.** (2016). Differential Use of Human Neutrophil Fcγ Receptors for Inducing Neutrophil Extracellular Trap Formation. *J. Immunol. Res.* **2016**, 2908034.
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D. and Zychlinsky, A.** (2012). Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 459–489.
- Arruda, M. A. and Barja-Fidalgo, C.** (2009). NADPH oxidase activity: In the crossroad of neutrophil life and death. *Front. Biosci.* **14**, 4546–4556.
- Banfi Giuseppe, Luca, S. G. and Giuseppe, L.** (2007). The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clin. Chem. Lab. Med.* **45**, 565.
- Bardoel, B. W., Kenny, E. F., Sollberger, G. and Zychlinsky, A.** (2014). The Balancing Act of Neutrophils. *Cell Host Microbe* **15**, 526–536.
- Bargatze, R. F., Kurk, S., Butcher, E. C. and Jutila, M. A.** (1994). Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *J. Exp. Med.* **180**, 1785 LP – 1792.
- Bokoch, G. M. and Zhao, T.** (2006). Regulation of the Phagocyte NADPH Oxidase by Rac GTPase. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1533–1548.
- Borregaard, N.** (2010). Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* **33**, 657–670.
- Borregaard, N. and Cowland, J. B.** (1997). Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood* **89**, 3503 LP – 3521.
- Borregaard, N., Heiple, J. M., Simons, E. R. and Clark, R. A.** (1983). Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J. Cell Biol.* **97**, 52 LP – 61.
- Borregaard, N., Sørensen, O. E. and Theilgaard-Mönch, K.** (2007). Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* **28**, 340–345.
- Boyum, A.** (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **97**, 77–89.
- Branzk, N. and Papayannopoulos, V.** (2013). Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Semin. Immunopathol.* **35**, 513–530.
- Brazil, J. C., Sumagin, R., Cummings, R. D., Louis, N. A. and Parkos, C. A.** (2016). Targeting of Neutrophil Lewis X Blocks Transepithelial Migration and Increases Phagocytosis and Degranulation. *Am. J. Pathol.* **186**, 297–311.

- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y. and Zychlinsky, A.** (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* (80-. ). **303**, 1532–1535.
- Bruhns, P.** (2012). Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* **119**, 5640 LP – 5649.
- Bylund, J., Brown, K. L., Movitz, C., Dahlgren, C. and Karlsson, A.** (2010). Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: How, where, and what for? *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1834–1845.
- Cain, D. W., Snowden, P. B., Sempowski, G. D. and Kelsoe, G.** (2011). Inflammation triggers emergency granulopoiesis through a density-dependent feedback mechanism. *PLoS One* **6**, e19957–e19957.
- Carman, C. V** (2009). Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by ‘invadosome-like protrusions’. *J. Cell Sci.* **122**, 3025–3035.
- Carmona-Rivera, C. and Kaplan, M. J.** (2013). Low density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin Immunopathol* **35**, 455–463.
- Carvalho, L. O., Aquino, E. N., Neves, A. C. D. and Fontes, W.** (2015). The Neutrophil Nucleus and Its Role in Neutrophilic Function. *J. Cell. Biochem.* **116**, 1831–1836.
- Clarke, T. B., Davis, K. M., Lysenko, E. S., Zhou, A. Y., Yu, Y. and Weiser, J. N.** (2010). Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat. Med.* **16**, 228–231.
- Cloke, T., Munder, M., Taylor, G., Müller, I. and Kropf, P.** (2012). Characterization of a Novel Population of Low-Density Granulocytes Associated with Disease Severity in HIV-1 Infection. *PLoS One* **7**, e48939.
- Dale, D. C., Boxer, L. and Liles, W. C.** (2008). The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* **112**, 935 LP – 945.
- Deng, Y., Ye, J., Luo, Q., Huang, Z., Peng, Y., Xiong, G., Guo, Y., Jiang, H. and Li, J.** (2016). Low-density granulocytes are elevated in mycobacterial infection and associated with the severity of tuberculosis. *PLoS One* **11**, 1–13.
- Deniset, J. F. and Kubes, P.** (2016). Recent advances in understanding neutrophils. *F1000Research* **5**, 1–10.
- Denny, M. F., Yalavarthi, S., Zhao, W., Thacker, S. G., Anderson, M., Sandy, A. R., McCune, W. J. and Kaplan, M. J.** (2010). A Distinct Subset of Proinflammatory Neutrophils Isolated from Patients with Systemic Lupus Erythematosus Induces Vascular Damage and Synthesizes Type I IFNs. *J. Immunol.* **184**, 3284 LP – 3297.
- Devi, S., Wang, Y., Chew, W. K., Lima, R., A-González, N., Mattar, C. N. Z., Chong, S. Z., Schlitzer, A., Bakocevic, N., Chew, S., et al.** (2013). Neutrophil mobilization via plerixafor-mediated CXCR4 inhibition arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow. *J. Exp. Med.* **210**, 2321–2336.
- Dimasi, D., Sun, W. Y. and Bonder, C. S.** (2013). Neutrophil interactions with the vascular endothelium. *Int. Immunopharmacol.* **17**, 1167–1175.
- Döhrmann, S., Cole, J. N. and Nizet, V.** (2016). Conquering Neutrophils. *PLoS Pathog.* **12**,.

- Duffy, D., Perrin, H., Abadie, V., Benhabiles, N., Boissonnas, A., Liard, C., Descours, B., Reboulleau, D., Bonduelle, O., Verrier, B., et al.** (2012). Neutrophils Transport Antigen from the Dermis to the Bone Marrow, Initiating a Source of Memory CD8+ T Cells. *Immunity* **37**, 917–929.
- Ekman, A.-K. and Cardell, L. O.** (2010). The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. *Immunology* **130**, 55–63.
- Elghetany, M. T., Ge, Y., Patel, J., Martinez, J. and Uhrova, H.** (2004). Flow cytometric study of neutrophilic granulopoiesis in normal bone marrow using an expanded panel of antibodies: Correlation with morphologic assessments. *J. Clin. Lab. Anal.* **18**, 36–41.
- Freitas, M., Lima, J. L. F. C. and Fernandes, E.** (2009). Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. *Anal. Chim. Acta* **649**, 8–23.
- Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G. and Ling, L.** (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* **16**, 183–94.
- Fu, H., Karlsson, J., Bylund, J., Movitz, C., Karlsson, A. and Dahlgren, C.** (2006). Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 247–256.
- Fu, J., Tobin, M. C. and Thomas, L. L.** (2014). Neutrophil-like low-density granulocytes are elevated in patients with moderate to severe persistent asthma. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **113**, 635-640.e2.
- Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V. and Zychlinsky, A.** (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* **204**, i2 LP-i2.
- Furze, R. C. and Rankin, S. M.** (2008). Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology* **125**, 281–288.
- Gadhoom, S. Z. and Sackstein, R.** (2008). CD15 expression in human myeloid cell differentiation is regulated by sialidase activity. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 751.
- Gallin, J. I.** (1984). Human neutrophil heterogeneity exists, but is it meaningful? *Blood* **63**, 977 LP – 983.
- García-García, E., Uribe-Querol, E. and Rosales, C.** (2013). A simple and efficient method to detect nuclear factor activation in human neutrophils by flow cytometry. *J. Vis. Exp.* 50410.
- Görgens, A., Radtke, S., Horn, P. A. and Giebel, B.** (2013). New relationships of human hematopoietic lineages facilitate detection of multipotent hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Cycle* **12**, 3478–3482.
- Hacbarth, E. and Kajdacsy-Balla, A.** (1986). Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever. *Arthritis Rheum.* **29**, 1334–1342.
- Häger, M., Cowland, J. B. and Borregaard, N.** (2010). Neutrophil granules in health and disease. *J. Intern. Med.* **268**, 25–34.

- Hayashi, F., Means, T. K. and Luster, A. D.** (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* **102**, 2660 LP – 2669.
- Herteman, N., Vargas, A. and Lavoie, J.-P.** (2017). Characterization of Circulating Low-Density Neutrophils Intrinsic Properties in Healthy and Asthmatic Horses. *Sci. Rep.* **7**, 7743.
- Hidalgo, A., Peired, A. J., Wild, M. K., Vestweber, D. and Frenette, P. S.** (2007). Complete Identification of E-Selectin Ligands on Neutrophils Reveals Distinct Functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity* **26**, 477–489.
- Hirai, H., Zhang, P., Dayaram, T., Hetherington, C. J., Mizuno, S., Imanishi, J., Akashi, K. and Tenen, D. G.** (2006). C/EBP $\beta$  is required for emergency granulopoiesis. *Nat. Immunol.* **7**, 732.
- Hoffmann, K., Sperling, K., Olins, A. L. and Olins, D. E.** (2007). The granulocyte nucleus and lamin B receptor: avoiding the ovoid. *Chromosoma* **116**, 227–235.
- Jankowski, A. and Grinstein, S.** (2002). Modulation of the Cytosolic and Phagosomal pH by the NADPH Oxidase. *Antioxid. Redox Signal.* **4**, 61–68.
- Jankowski, A., Scott, C. C. and Grinstein, S.** (2002). Determinants of the Phagosomal pH in Neutrophils. *J. Biol. Chem.* **277**, 6059–6066.
- Jaumouille, V. and Grinstein, S.** (2016). Molecular Mechanisms of Phagosome Formation. *Microbiol. Spectr.* **4**,.
- Jorch, S. K. and Kubes, P.** (2017). An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat. Med.* **23**, 279.
- Kennedy, A. D., Willment, J. A., Dorward, D. W., Williams, D. L., Brown, G. D. and DeLeo, F. R.** (2007). Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur. J. Immunol.* **37**, 467–478.
- Kerrigan, A. M., Dennehy, K. M., Mourão-Sá, D., Faro-Trindade, I., Willment, J. A., Taylor, P. R., Eble, J. A., Reis e Sousa, C. and Brown, G. D.** (2009). CLEC-2 Is a Phagocytic Activation Receptor Expressed on Murine Peripheral Blood Neutrophils. *J. Immunol.* **182**, 4150 LP – 4157.
- Klebanoff, S. J.** (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 598–625.
- Kolaczowska, E. and Kubes, P.** (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* **13**, 159–175.
- Kono, H. and Rock, K. L.** (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 279.
- Krishnaswamy, G., Kelley, J., Yerra, L., Smith, J. K. and Chi, D. S.** (1999). Human Endothelium as a Source of Multifunctional Cytokines: Molecular Regulation and Possible Role in Human Disease. *J. Interf. Cytokine Res.* **19**, 91–104.
- Kumar, V. and Sharma, A.** (2010). Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int. Immunopharmacol.* **10**, 1325–1334.
- Lacy, P.** (2006). Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma. Clin. Immunol.* **2**, 98–108.



- Lakschevitz, F. S., Hassanpour, S., Rubin, A., Fine, N., Sun, C. and Glogauer, M.** (2016). Identification of neutrophil surface marker changes in health and inflammation using high-throughput screening flow cytometry. *Exp. Cell Res.* **342**, 200–209.
- Lakshman, R. and Finn, A.** (2001). Neutrophil disorders and their management. *J. Clin. Pathol.* **54**, 7–19.
- Lapidot, T.** (2003). The Roles of the Chemokine SDF-1 and its Receptor CXCR4 in Human Stem Cell Migration and Repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. In *Transplantation in Hematology and Oncology II* (ed. Berdel, W. E.), Büchner, T; Kienast, J; Jürgens, H; Ritter, J; and Vormoor, J; pp. 11–24. Springer Berlin Heidelberg.
- Lee, W. L., Harrison, R. E. and Grinstein, S.** (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.* **5**, 1299–1306.
- Ley, K., Bullard, D. C., Arbonés, M. L., Bosse, R., Vestweber, D., Tedder, T. F. and Beaudet, A. L.** (1995). Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J. Exp. Med.* **181**, 669 LP – 675.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. and Nourshargh, S.** (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 678.
- Lin, A. M., Rubin, C. J., Khandpur, R., Wang, J. Y., Riblett, M., Yalavarthi, S., Villanueva, E. C., Shah, P., Kaplan, M. J. and Bruce, A. T.** (2011). Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J. Immunol.* **187**, 490–500.
- Mayadas, T. N., Johnson, R. C., Rayburn, H., Hynes, R. O. and Wagner, D. D.** (1993). Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* **74**, 541–554.
- Mayadas, T. N., Cullere, X. and Lowell, C. A.** (2014). The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **9**, 181–218.
- McDonald, B. and Kubes, P.** (2011). Cellular and molecular choreography of neutrophil recruitment to sites of sterile inflammation. *J. Mol. Med.* **89**, 1079.
- McDonald, B., Pittman, K., Menezes, G. B., Hirota, S. A., Slaba, I., Waterhouse, C. C. M., Beck, P. L., Muruve, D. A. and Kubes, P.** (2010). Intravascular Danger Signals Guide Neutrophils to Sites of Sterile Inflammation. *Science (80- )*. **330**, 362 LP – 366.
- McEver, R. P.** (2002). Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 581–586.
- Mesa, M. A. and Vasquez, G.** (2013). NETosis. *Autoimmune Dis.* **2013**, 651497.
- Midgley, A. and Beresford, M. W.** (2015). Increased expression of low density granulocytes in juvenile-onset systemic lupus erythematosus patients correlates with disease activity. *Lupus* **25**, 407–411.
- Mishalian, I., Granot, Z. and Fridlender, Z. G.** (2017). The diversity of circulating neutrophils in cancer. *Immunobiology* **222**, 82–88.
- Mócsai, A.** (2013). Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.* **210**, 1283–1299.

- Nathan, C.** (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 173–182.
- Nauseef, W. M. and Borregaard, N.** (2014). Neutrophils at work. *Nat. Immunol.* **15**, 602.
- Nicolas Ávila, J. Á., Adrover, J. M. and Hidalgo, A.** (2017). Review Neutrophils in Homeostasis , Immunity , and Cancer. *Immun. Rev.* **12**, 15–28.
- Paoliello-Paschoalato, A. B., Marchi, L. F., de Andrade, M. F., Kabeya, L. M., Donadi, E. A. and Lucisano-Valim, Y. M.** (2015). Fcγ and Complement Receptors and Complement Proteins in Neutrophil Activation in Rheumatoid Arthritis: Contribution to Pathogenesis and Progression and Modulation by Natural Products. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2015**, 429878.
- Papayannopoulos, V. and Zychlinsky, A.** (2009). NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* **30**, 513–521.
- Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A. and Zychlinsky, A.** (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **191**, 677 LP – 691.
- Petri, B., Phillipson, M. and Kubes, P.** (2008). The Physiology of Leukocyte Recruitment: An In Vivo Perspective. *J. Immunol.* **180**, 6439 LP – 6446.
- Phillipson, M., Heit, B., Colarusso, P., Liu, L., Ballantyne, C. M. and Kubes, P.** (2006). Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J. Exp. Med.* **203**, 2569 LP – 2575.
- Pruchniak, M. P., Arazna, M. and Demkow, U.** (2013). Life of neutrophil: From stem cell to neutrophil extracellular trap. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **187**, 68–73.
- Puga, I., Cols, M., Barra, C. M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., et al.** (2011). B cell–helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat. Immunol.* **13**, 170.
- Radomska, H. S., Huettner, C. S., Zhang, P., Cheng, T., Scadden, D. T. and Tenen, D. G.** (1998). CCAAT/Enhancer Binding Protein α Is a Regulatory Switch Sufficient for Induction of Granulocytic Development from Bipotential Myeloid Progenitors. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4301 LP – 4314.
- Ravetch, J. V and Bolland, S.** (2001). IgG Fc Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 275–290.
- Rocha, B. C., Marques, P. E., Leoratti, F. M. de S., Junqueira, C., Pereira, D. B., Antonelli, L. R. do V., Menezes, G. B., Golenbock, D. T. and Gazzinelli, R. T.** (2015). Type I Interferon Transcriptional Signature in Neutrophils and Low-Density Granulocytes Are Associated with Tissue Damage in Malaria. *Cell Rep.* **13**, 2829–2841.
- Roos, D., van Bruggen, R. and Meischl, C.** (2003). Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* **5**, 1307–1315.
- Rosales, C.** (2017). Fcγ Receptor Heterogeneity in Leukocyte Functional Responses. *Front. Immunol.* **8**, 1–13.

- Rosales, C.** (2018). Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? . *Front. Physiol.* **9**, 113.
- Rosales, C. and Uribe-querol, E.** (2013). Fc receptors : Cell activators of antibody functions. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **2013**, 21–33.
- Rosales, C. and Uribe-Querol, E.** (2013). Fc receptors: Cell activators of antibody functions. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **04**, 21–33.
- Rosales, C. and Uribe-Querol, E.** (2017). Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *Biomed Res. Int.* **2017**, 9042851.
- Sagiv, J. Y., Michaeli, J., Assi, S., Mishalian, I., Kisos, H., Levy, L., Damti, P., Lumbroso, D., Polyansky, L., Sionov, R. V, et al.** (2015). Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep.* **10**, 562–573.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al.** (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682.
- Schmidt, E. P., Lee, W. L., Zemans, R. L., Yamashita, C. and Downey, G. P.** (2011). On, Around, and Through: Neutrophil-Endothelial Interactions in Innate Immunity. *Physiology* **26**, 334–347.
- Selders, G. S., Fetz, A. E., Radic, M. Z. and Bowlin, G. L.** (2017). An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regen. Biomater.* **4**, 55–68.
- Semerad, C. L., Liu, F., Gregory, A. D., Stumpf, K. and Link, D. C.** (2002). G-CSF Is an Essential Regulator of Neutrophil Trafficking from the Bone Marrow to the Blood. *Immunity* **17**, 413–423.
- Sengeløv, H.** (1995). Complement receptors in neutrophils. *Crit. Rev. Immunol.* **15**, 107–131.
- Soehnlein, O., Steffens, S., Hidalgo, A. and Weber, C.** (2017). Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 248–261.
- Sollberger, G., Tilley, D. O. and Zychlinsky, A.** (2018). Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization. *Dev. Cell* **44**, 542–553.
- Ssemaganda, A., Kindinger, L., Bergin, P., Nielsen, L., Mpendo, J., Ssetaala, A., Kiwanuka, N., Munder, M., Teoh, T. G., Kropf, P., et al.** (2014). Characterization of Neutrophil Subsets in Healthy Human Pregnancies. *PLoS One* **9**, e85696.
- Su, W.-H., Chen, H., Huang, J. and Jen, C. J.** (2000). Endothelial [Ca<sup>2+</sup>] signaling during transmigration of polymorphonuclear leukocytes. *Blood* **96**, 3816 LP – 3822.
- Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, A. M. and Chilvers, E. R.** (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* **31**, 318–324.
- Takeuchi, O. and Akira, S.** (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **140**, 805–820.
- Tamassia, N., Le Moigne, V., Rossato, M., Donini, M., McCartney, S., Calzetti, F., Colonna, M., Bazzoni, F. and Cassatella, M. A.** (2008). Activation of an Immunoregulatory and Antiviral Gene Expression Program in Poly(I:C)-Transfected

- Human Neutrophils. *J. Immunol.* **181**, 6563 LP – 6573.
- Tecchio, C. and Cassatella, M. A.** (2016). Neutrophil-derived chemokines on the road to immunity. *Semin. Immunol.* **28**, 119–128.
- Thomas, C. J. and Schroder, K.** (2013). Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends Immunol.* **34**, 317–328.
- Underhill, D. M. and Ozinsky, A.** (2002). Phagocytosis of Microbes: Complexity in Action. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 825–852.
- van Bruggen, R., Drewniak, A., Jansen, M., van Houdt, M., Roos, D., Chapel, H., Verhoeven, A. J. and Kuijpers, T. W.** (2009). Complement receptor 3, not Dectin-1, is the major receptor on human neutrophils for  $\beta$ -glucan-bearing particles. *Mol. Immunol.* **47**, 575–581.
- von Vietinghoff, S. and Ley, K.** (2008). Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. *J. Immunol.* **181**, 5183–5188.
- Wang, J. and Arase, H.** (2014). Regulation of immune responses by neutrophils. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1319**, 66–81.
- Wang, Y. and Jönsson, F.** (2019). Expression, Role, and Regulation of Neutrophil Fc $\gamma$  Receptors. *Front. Immunol.* **10**, 1958.
- Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S. A., et al.** (2009). Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.* **184**, 205 LP – 213.
- Winkler, I. G., Barbier, V., Wadley, R., Zannettino, A. C. W., Williams, S. and Lévesque, J.-P.** (2010). Positioning of bone marrow hematopoietic and stromal cells relative to blood flow in vivo: serially reconstituting hematopoietic stem cells reside in distinct nonperfused niches. *Blood* **116**, 375 LP – 385.
- Winterbourn, C. C., Hampton, M. B., Livesey, J. H. and Kettle, A. J.** (2006). Modeling the Reactions of Superoxide and Myeloperoxidase in the Neutrophil Phagosome: Implications for microbial killing. *J. Biol. Chem.* **281**, 39860–39869.
- Yang, F., Feng, C., Zhang, X., Lu, J. and Zhao, Y.** (2017). The Diverse Biological Functions of Neutrophils, Beyond the Defense Against Infections. *Inflammation* **40**, 311–23.
- Zarbock, A., Ley, K., McEver, R. P. and Hidalgo, A.** (2011). Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* **118**, 6743 LP – 6751.
- Zawrotniak, M. and Rapala-Kozik, M.** (2013). Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta Biochim. Pol.* **60**, 277–284.
- Zhang, S.-G., Song, Y.-X., Shu, X.-M., Shen, H.-L., Yang, H.-B., Duo, R.-X. and Wang, G.-C.** (2017). A simple method for removing low-density granulocytes to purify T lymphocytes from peripheral blood mononuclear cells. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **18**, 605–614.