



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**IDENTIFICACIÓN DE NEUTRÓFILOS DE BAJA DENSIDAD DE
SANGRE PERIFÉRICA DE PERSONAS CON OBESIDAD**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias**

PRESENTA:

Nathalia Fernanda Naranjo Pinto

TUTOR PRINCIPAL

**Dr. Carlos Rosales Ledezma
Instituto de Investigaciones Biomédicas**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dra. Marcela Lizano Soberón
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay
Instituto de Biotecnología**

Ciudad de México. septiembre, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Reconocimientos

Este trabajo de tesis de maestría se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la dirección del **Dr. Carlos Rosales Ledezma**, con apoyo del proyecto **PAPIIT IN222120** otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México.

La alumna **Nathalia Fernanda Naranjo Pinto**, con número de cuenta **52046159-0** recibió la beca de estudios **754247**, **CVU:1015059**, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Agradecimientos

- A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por abrirme sus puertas, acogerme entre sus aulas y brindarme las herramientas necesarias para mi formación profesional. **Gracias.**
- Al **Dr. Carlos Rosales Ledezma**, mi tutor, por todos sus sabios consejos, por haberme guiado, escuchado y apoyado durante mis estudios de posgrado. **Gracias.**
- A la **Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay** y a la **Dra. Marcela Lizano Soberón**, miembros del Comité Tutor, por su asesoramiento, paciencia y apoyo en cada momento. **Gracias.**
- A la **M. en IBB. Nancy Yorley Mora Pérez**, por su excelente apoyo técnico, consejos y ayuda durante la realización del presente trabajo. **Gracias.**
- Al Dr. Aldo Ferreira, médicos y enfermeras de la Clínica de Obesidad del Centro Médico Nacional Siglo XXI, por su disponibilidad y guía brindada. **Gracias.**
- A todos los donadores de sangre, por su valiosa contribución para el desarrollo del presente trabajo. **Gracias.**

Dedicatoria

- A mi hermosa familia, por siempre estar conmigo a pesar de la distancia. Los amo y los llevo a todos en mi corazón.
 - A mis padres, Fernando y Katty, por haberme llenado de amor y fortaleza para seguir siempre adelante y luchar por mis sueños.
 - A mi hermano, Andrés, que con sus ocurrencias hace de mis días más felices.
 - A mis abuelos, Papi Aníbal y Mami Tere, por sus consejos, por todo su cariño, preocupación y entrega.
 - A mis tías y tío, Ta, Miche, Lui y Caro, por brindarme tantos momentos de felicidad, por quererme y cuidarme.
 - A mis primos, Nico, Luisito y Joaquín, por toda la alegría que le brindan a mi vida.
- A mi amor, Jafet, por haberme acompañado en esta gran aventura, por todos tus consejos, por escucharme, por apoyarme, por amarme.
- A Marisa y Reyna, por permitirme ser parte de sus vidas, por todo su apoyo, lecciones y cariño.
- A mis hermanis, Cami, Cris, Silvia, por todo su cariño, preocupación y amistad.
- A mis compañeros de laboratorio, Rafa, Carlos, Fer, Devi, Faby, Cindy y Nancy por hacerme sentir en casa y brindarme su amistad.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
i. Purificación y caracterización de neutrófilos	4
ii. Origen de los neutrófilos	5
iii. Neutrófilos en circulación	7
iv. Funciones microbidas de los neutrófilos	9
v. Muerte de los neutrófilos	11
vi. Heterogeneidad en la población de neutrófilos	12
vii. Neutrófilos de baja densidad	13
OBESIDAD	15
i. El tejido adiposo	16
ii. Inflamación en obesidad	17
iii. Neutrófilos y obesidad	18
Planteamiento del problema	19
Hipótesis	19
Objetivos	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
Materiales y métodos	20
a) Disoluciones	20
b) Donadores	21
c) Obtención de sangre	21
d) Purificación de leucocitos por gradiente de densidad	21
e) Caracterización de neutrófilos por citometría de flujo	23
i. Inmunofluorescencia directa para moléculas de superficie de neutrófilos	23
ii. Citometría de fujo	24
f) Prueba Estadística	25

Resultados	26
i. Se obtienen más neutrófilos purificados de sangre de personas obesas que de personas no obesas.....	26
ii. En sangre de personas no obesas y en sangre de personas con obesidad existen neutrófilos de baja densidad	27
iii. Hay más neutrófilos de baja densidad en personas obesas que en personas de peso normal.....	34
Discusión	39
Conclusiones.....	48
Perspectivas.....	49
Referencias	50

Resumen

Los neutrófilos de baja densidad (LDN) son una subpoblación sugerida de neutrófilos. Se ha descrito que la cantidad de LDN aumenta en diversas condiciones inflamatorias crónicas. La obesidad es una enfermedad relacionada con inflamación crónica de bajo grado y actualmente se desconoce si el número de LDN también aumenta en obesidad. Para poder identificar a los LDN de sangre de personas obesas y poder establecer si existe una relación entre la cantidad de LDN y la obesidad, los leucocitos sanguíneos de adultos de peso normal (índice de masa corporal [IMC] $< 30\text{kg/m}^2$) y de adultos obesos (IMC $\geq 30\text{kg/m}^2$) se purificaron por gradiente de densidad. Así, se obtuvieron neutrófilos puros y células de la capa de células mononucleares. Los neutrófilos puros se caracterizaron por la expresión de moléculas de superficie mediante citometría de flujo. Posteriormente, las células de la capa de células mononucleares se analizaron utilizando los mismos parámetros para identificar a los LDN.

De esta forma se identificó que los LDN provenientes de personas de peso normal y de personas obesas presentan un fenotipo $\text{CD16b}^+\text{CD66b}^+\text{CD11b}^+\text{CD15}^+\text{CD14}^+$ correspondiente al fenotipo de neutrófilo maduro. Además, se encontró que independientemente del IMC, los LDN expresan más CD16b que los neutrófilos de la misma persona, sugiriendo que los LDN posiblemente poseen características diferentes a los neutrófilos. Por otro lado, se notó que tanto los LDN como los neutrófilos de una persona obesa expresan más CD66b que los LDN y los neutrófilos de una persona de peso normal, lo que sugiere que la obesidad podría provocar la activación de los neutrófilos reflejada en el aumento de la expresión de CD66b. Finalmente, se halló que en personas de peso normal los LDN constituyen el 2.44% de células de la capa de células mononucleares mientras que en personas obesas los LDN constituyen el 9.86% de células de la capa de células mononucleares. Por lo tanto, la obesidad parece estar relacionada con un incremento de LDN en sangre.

Abstract

Low-density neutrophils (LDN) have been suggested to represent a subpopulation of neutrophils. LDN are found among mononuclear cells (MNC), monocytes and lymphocytes, after blood leukocytes separation by density gradient centrifugation. LDN numbers have been reported to increase in several chronic inflammatory conditions. Obesity is a disease related to low-grade chronic inflammation and it is currently unknown whether the number of LDN also increases in obesity.

Therefore, in order to identify LDN from blood of obese people and to establish whether there is a relationship between the LDN numbers and obesity, blood leukocytes from non-obese adults (body mass index [BMI] < 30kg/m²) and from obese adults (BMI ≥ 30kg/m²) were separated by density gradient centrifugation. Thus, pure neutrophils and MNC fraction were obtained. Pure neutrophils were further characterized by flow cytometry. Subsequently, the MNC fraction was analysed using the same parameters to identify LDN.

LDN from both non-obese and obese people displayed a CD16b⁺CD66b⁺CD11b⁺CD15⁺CD14⁺ phenotype corresponding to a mature neutrophil phenotype. Furthermore, it was found that regardless of BMI, LDN express more CD16b than neutrophils from the same person, suggesting that LDN could possibly have different characteristics than neutrophils. Besides that, both LDN and neutrophils from an obese person showed a higher expression of CD66b than LDN and neutrophils of a non-obese person, suggesting that obesity could cause the activation of neutrophils as is reflected in the increase of CD66b expression. Finally, LDN comprised 2.44% of cells of the MNC fraction from non-obese people, while in obese people, LDN comprised 9.86% of MNC fraction. Therefore, obesity appears to be related to an increase in LDN numbers in blood.

Introducción

El sistema inmunológico ha evolucionado para proteger al organismo de factores exógenos o endógenos que pueden causar daño. Esto incluye, pero no se limita a infecciones, daño a tejidos, y eliminación de células tumorales. Para esto, el sistema inmunológico detecta, contiene y, de ser posible, elimina el factor que causa daño al organismo (Chaplin, 2010). La respuesta inmunológica depende en gran medida de un repertorio grande de células que cumplen funciones específicas. Entre estas células se encuentran los leucocitos (glóbulos blancos de la sangre) que son tal vez los más importantes. De entre los tipos de leucocitos los neutrófilos son los más abundantes en la sangre. Los neutrófilos son células que poseen un citoplasma rico en gránulos y un núcleo segmentado o multilobulado. Por esta razón, los neutrófilos también son conocidos como granulocitos polimorfonucleares (**Figura 1**). Los neutrófilos se consideran como la primera línea de defensa del sistema inmunológico, porque son las primeras células en llegar a sitios de inflamación o de infección (Rosales, 2018). La importancia del papel de los neutrófilos para proteger al organismo resalta en casos de trastornos genéticos como la deficiencia de adhesión de leucocitaria-1 y la enfermedad granulomatosa crónica, que provocan deficiencias en la función de los neutrófilos. Por lo tanto, los individuos con estos padecimientos son muy susceptibles a infecciones bacterianas y fúngicas (Dinauer, 2016; von Vietinghoff & Ley, 2008).

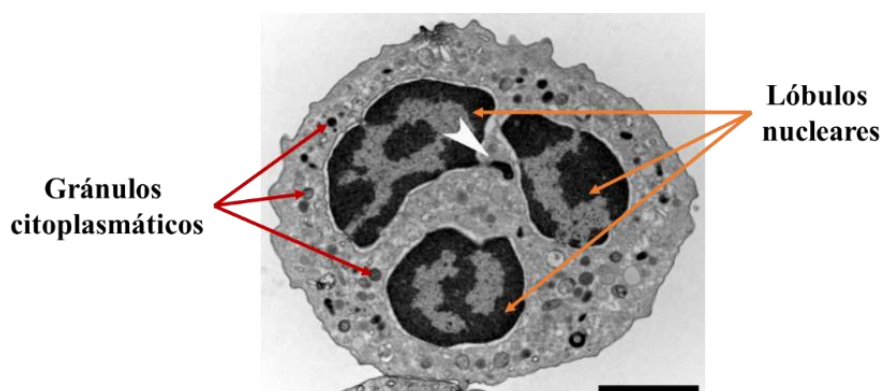


Figura 1. Morfología del neutrófilo. Microfotografía de un neutrófilo humano obtenida por microscopía electrónica de transmisión. El neutrófilo contiene varios tipos de gránulos en el citoplasma (señalados con flechas rojas) y un núcleo multilobulado (señalado con flechas naranjas). La barra representa 2 μ m. Modificado de (Brinkmann & Zychlinsky, 2012).

i. Purificación y caracterización de neutrófilos

Para poder estudiar y comprender adecuadamente la biología de los neutrófilos, se han descrito diversos métodos que permiten aislar, purificar, identificar y caracterizar a este tipo de leucocitos. Tradicionalmente, los neutrófilos sanguíneos pueden ser separados de otros leucocitos y componentes sanguíneos por métodos de centrifugación en gradientes de densidad. Para esto, una muestra de sangre completa o plasma enriquecido en leucocitos se coloca sobre un gradiente de densidad, como el Ficoll o el Percoll y luego se centrifuga. Según la densidad del medio, ciertas poblaciones celulares se ubicarán sobre, por debajo o entre el medio. Por ejemplo, el Ficoll-Plaque tienen una densidad = 1.077 g/ml. Entonces, al centrifugar plasma enriquecido en leucocitos sobre Ficoll-Plaque, los neutrófilos que son las células más densas (densidad > 1.080 g/ml) aparecen en el fondo del tubo y las células de menor densidad, monocitos (densidad = 1.067-1.077 g/ml) y linfocitos (densidad = 1.073–1.077 g/ml), aparecen en la interfase del plasma y el Ficoll (García-García et al., 2013; Zipursky et al., 1976) (**Figura 2**).

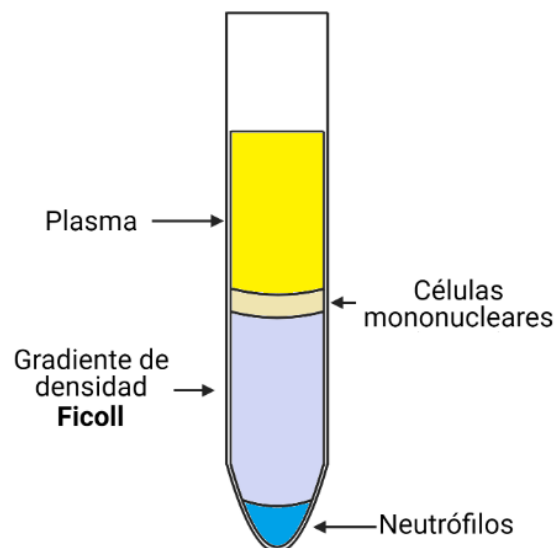


Figura 2: Representación esquemática de la separación de leucocitos en un gradiente de densidad. La centrifugación de plasma rico en leucocitos en gradiente de densidad permite la separación de leucocitos. Las células de menor densidad, monocitos y linfocitos forman una capa de células (capa de células mononucleares) en la interfase del plasma y Ficoll-Paque. Y los neutrófilos que son las células de mayor densidad se encuentran en la parte inferior del tubo. (Creado con Biorender.com)

Las características fenotípicas de los neutrófilos, como tamaño, morfología nuclear y gránulos citoplasmáticos, permiten que los neutrófilos puedan ser visualizados e identificados por microscopía (**Figura 1**). Paralelamente, la citometría de flujo se utiliza habitualmente para identificar neutrófilos con base en la expresión de las moléculas de superficie. Actualmente se utiliza una combinación de dos o más moléculas de superficie como marcadores que permiten identificar neutrófilos de humanos por citometría de flujo. Comúnmente, se utiliza una combinación de las moléculas CD11b, CD14, CD15, CD16b, CD66b y CD62L, como marcadores de neutrófilos. Sin embargo, ninguna de estas moléculas se expresa únicamente en neutrófilos. Por eso es importante usar siempre varios de estos marcadores para identificar a un neutrófilo.

ii. Origen de los neutrófilos

Se estima que cada día se forman de $1 \text{ a } 2 \times 10^{11}$ nuevos neutrófilos en la médula ósea en el proceso conocido como granulopoyesis (Borregaard, 2010). La granulopoyesis es un proceso en el cual se generan granulocitos a partir de células progenitoras hematopoyéticas en la médula ósea. De esta forma, las células progenitoras hematopoyéticas se diferencian en progenitores mieloides comunes, que a su vez dan lugar a progenitores de granulocitos-monocitos. Posteriormente, del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) induce que los progenitores de granulocitos-monocitos se comprometan con la generación de neutrófilos entrando a las etapas terminales del desarrollo de neutrófilos (von Vietinghoff & Ley, 2008).

Las seis etapas terminales del desarrollo de los neutrófilos incluyen: mieloblastos, promielocitos, mielocitos, metamielocitos, células en banda y neutrófilos maduros. Estas etapas terminales, se han dividido con base en el tamaño celular, morfología nuclear y contenido de gránulos (Gabrilovich, 2013). Entonces, los mieloblastos y promielocitos tienen núcleos grandes y redondos y se caracterizan por la aparición de los gránulos azurófilos o primarios que contienen principalmente mieloperoxidasa, elastasa y catepsina G. Por otro lado, en los mielocitos y metamielocitos el núcleo redondo adquiere forma de riñón y se producen los gránulos específicos o secundarios que contienen principalmente colagenasa, lactoferrina y lisozima. Durante la transición de los metamielocitos a neutrófilos en banda, el núcleo adquiere una forma similar a una banda y se generan los

gránulos de gelatinasa o terciarios que contienen principalmente gelatinasa, lisozima y citocromo b558 (componente del complejo NADPH oxidasa). Finalmente, la maduración de los neutrófilos concluye con la segmentación del núcleo y la aparición de vesículas secretoras formadas por endocitosis (Jack B. et al., 2016) (**Figura 3**). Las vesículas secretoras contienen varios receptores en su membrana, como: los receptores del complemento (CR1), los receptores Fc (CD16b), los receptores de lipopolisacáridos (LPS) (CD-14) y los receptores de formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLF) (Rosales & Uribe-Querol, 2018).

Además de los cambios morfológicos del núcleo y aparición de gránulos citoplasmáticos y vesículas secretoras, la maduración de los neutrófilos va acompañada por cambios en la expresión de moléculas en la superficie de la membrana plasmática (Elghetany, 2002). Algunos de las moléculas de superficie de los neutrófilos funcionan como “sensores biológicos” que permiten que los neutrófilos detecten y reaccionen a cambios en el entorno, como infecciones o daños en el tejido. Por esta razón, los cambios en la expresión de las moléculas de superficie durante la vida de los neutrófilos provocan que estas células se preparen y se adapten para llevar a cabo sus funciones. Algunos de las moléculas de superficie que se han identificado durante las diferentes etapas de maduración del neutrófilo son: CD10 (LeBien & McCormack, 1989; McCormack et al., 1986), CD11b (Evrard et al., 2018; V. O. Shah et al., 1988), CD15 (Nakayama et al., 2001), CD16b (Terstappen et al., 1990) y CD66b (Van Lochem et al., 2004) (**Figura 3**).

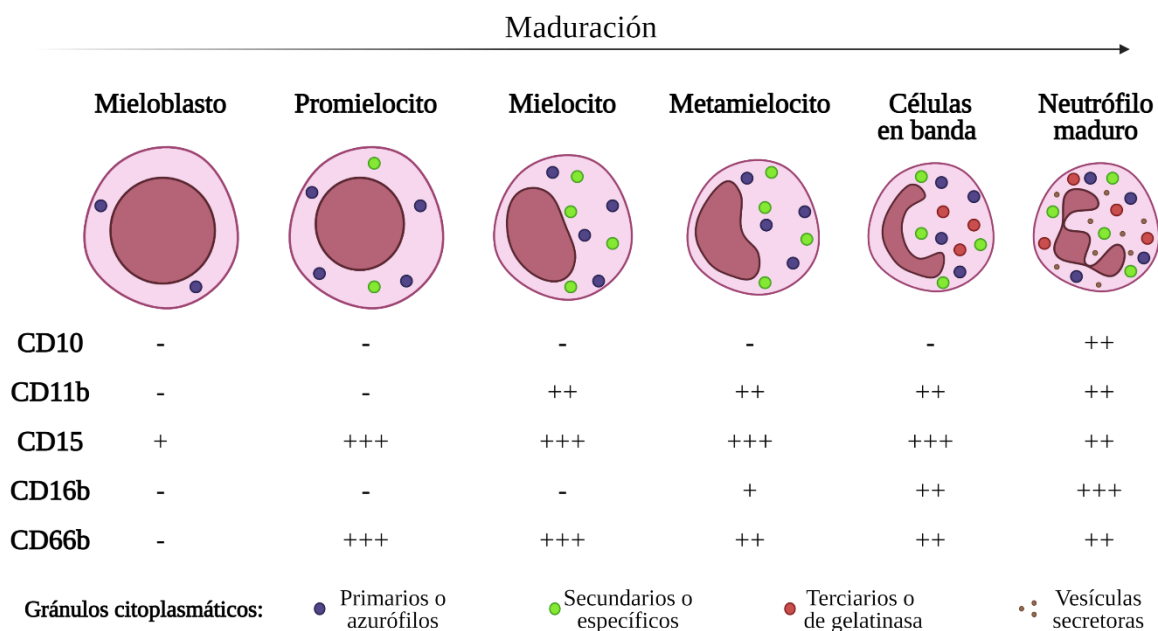


Figura 3: Etapas de maduración de los neutrófilos. Los mieloblastos son las primeras células precursoras comprometidas del linaje de neutrófilos. Los mieloblastos siguen un proceso de maduración que incluye las etapas de promielocitos, mielocito, metamielocitos, células de banda y neutrófilos maduro. El proceso de maduración de los neutrófilos se caracteriza por una disminución del tamaño celular, desarrollo de lobulación nuclear, aparición de gránulos citoplasmáticos y cambios en la expresión de moléculas de superficie. +++ expresión fuerte, ++ expresión moderada, + expresión débil, - no expresión. (Creado con Biorender.com)

iii. Neutrófilos en circulación

En humanos adultos sanos, menos del 2% de los neutrófilos maduros que se producen en la médula ósea se liberan diariamente al torrente sanguíneo (Semerad et al., 2002). En condiciones fisiológicas también se liberan a circulación sanguínea neutrófilos inmaduros como las células en banda, aunque, los neutrófilos inmaduros representan menos del 3% de los neutrófilos sanguíneos (Hassanpour et al., 2016). La salida de los neutrófilos de la médula ósea es regulada estrictamente. Las células del estroma de la médula ósea expresan CXCL12 y los neutrófilos en la médula ósea expresan CXCR4 (el receptor de CXCL12). La interacción entre CXCL12 y CXCR4 provoca la retención de neutrófilos en la médula ósea. Fisiológicamente, G-CSF induce la salida de neutrófilos de la médula ósea para que entren a la circulación sanguínea. Por un lado, G-CSF provoca que la expresión de CXCR4 disminuya gradualmente a medida que los neutrófilos maduran y regula negativamente la

expresión de CXCL12 (Hyun et al., 2006). Por otro lado, G-CSF induce que los neutrófilos expresen CXCR2. Los ligandos de CXCR2 como CXCL1, CXCL2, CXCL5 y CXCL8 (también llamada interleucina [IL] 8) son producidos por las células endoteliales cuando los neutrófilos deben entrar a la circulación sanguínea (Rosales, 2018). Una vez en circulación, los neutrófilos tienen una vida media de 6 a 8 horas (Summers et al., 2010). Sin embargo, la activación de neutrófilos por derivados bacterianos como LPS, puede prolongar la vida útil de los neutrófilos hasta 5 días y además provocar que más neutrófilos inmaduros sean libreados de la médula ósea a circulación (Pillay et al., 2010).

En homeostasis, los neutrófilos circulantes existen en un estado basal, caracterizado por la falta de adherencia al endotelio, una morfología redonda, una actividad transcripcional mínima y una capacidad limitada para responder a los estímulos activadores (Miralda et al., 2017). El fenotipo de los neutrófilos circulantes en homeostasis protege al organismo de respuestas injustificadas y posibles lesiones al tejido. En caso de daño o infección en el tejido periférico, los neutrófilos son atraídos al endotelio en respuesta a factores quimiotácticos como lípidos (leucotrieno B₄), quimiocinas (IL-8), moléculas del sistema de complemento (C3a y C5a), y productos de la degradación de patógenos (péptidos formilados) (Metzemaekers et al., 2020). Las citocinas proinflamatorias, fragmentos del complemento, patrones moleculares asociados a daño y patrones moleculares asociados a patógenos, que se producen en el tejido inflamado, actúan como alarminas que activan al endotelio vascular, induciendo la expresión de moléculas de adhesión (Yang et al., 2017). Entonces, los neutrófilos atraídos migran al tejido por el proceso conocido como trans migración endotelial, que se piensa ocurre en cuatro pasos: rodamiento, adhesión firme, diapédesis y migración (Ley et al., 2007). El primer paso de la trans migración endotelial es el rodamiento. El rodamiento está mediado por interacciones adhesivas débiles transitorias entre selectinas (E-selectinas y P-selectinas) presentes en la superficie del endotelio adyacente al tejido inflamado y el grupo sialyl Lewis^x (CD15) presente en glicoproteínas de la superficie de los neutrófilos. El rodamiento, facilita la estimulación in situ de los neutrófilos por quimioatrayentes (IL8), citocinas (TNF- α) y productos bacterianos (Miralda et al., 2017; Yao et al., 2015), de esta forma se induce la activación de integrinas de neutrófilos: integrina α L β 2 (CD11a-CD18) e integrina α M β 2 (CD11b-CD18) (McDonald & Kubes, 2011). El segundo paso, la adhesión firme, depende de la interacción

entre las integrinas expresadas en la superficie de los neutrófilos y las moléculas de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) presentes en la superficie del endotelio activado. Posteriormente, ocurre la diapédesis, en la cual también participan las integrinas de los neutrófilos y moléculas de adhesión intracelular del endotelio. Además, la interacción entre las moléculas de adhesión de células endoteliales de plaquetas (PECAM-1), presentes en las uniones intercelulares de la pared del epitelio y en la superficie de los neutrófilos, permite que los neutrófilos migren a través del endotelio (O'Brien et al., 2003). Luego los neutrófilos penetran la membrana basal del endotelio con la ayuda de proteinasas presentes en la superficie de los neutrófilos que degradan a la matriz extracelular de la membrana basal (Lerchenberger et al., 2013). Finalmente, los neutrófilos migran siguiendo la gradiente de concentración de los quimioatrayentes secretados por las células del sitio de inflamación.

Durante la transmigración endotelial, diferentes estímulos como la adhesión al endotelio y a la matriz extracelular así como la exposición a lipopolisacáridos, quimiocinas y factores de crecimiento mejoran la capacidad de los neutrófilos para responder a estímulos posteriores (Miralda et al., 2017). Este fenómeno se conoce como pre-activación o priming y mejora la capacidad microbicida de los neutrófilos (Mayadas et al., 2014). Una vez en el tejido inflamado y en respuesta a los estímulos microambientales, los neutrófilos se activan y pueden llevar a cabo funciones microbicidas como la fagocitosis, la liberación de proteínas granulares o degranulación, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la producción de trampas extracelulares de neutrófilo o NET (Mayadas et al., 2014).

iv. Funciones microbicidas de los neutrófilos

Los neutrófilos reconocen directamente patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) por medio de receptores de la membrana plasmática y receptores intracelulares denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (Thomas & Schroder, 2013). Los neutrófilos expresan una amplia variedad de PRR, entre los cuales se encuentran: receptores tipo Toll (TLR-1, -2, -4, -5, -6, -8 y -9) (Prince et al., 2011), receptores tipo NOD (NOD-1, -2 y NLRP3) (Ekman & Cardell, 2010), receptores de lectina tipo C (CLEC2 y CLEC7A) (Chiffolleau, 2018), receptores acoplados a proteínas G para detectar

péptidos formilados (Liu et al., 2012) y receptores citoplasmáticos para detectar ácidos nucleicos (RIG-1) (Tamassia et al., 2008). Por otro lado, los neutrófilos reconocen a moléculas del hospedero (inmunoglobulinas y complemento) que están unidas a los patógenos. Las inmunoglobulinas y fragmentos del sistema de complemento recubren la superficie de los patógenos en el proceso conocido como opsonización (Mayadas et al., 2014). La opsonización de los patógenos facilita el reconocimiento y la fagocitosis del patógeno (van Kesse et al., 2014).

Los neutrófilos son células principalmente fagocíticas, esto es poseen la capacidad de engullir y eliminar patógenos y restos celulares a través del proceso de fagocitosis (Silva & Correia-Neves, 2012). Los neutrófilos son capaces de fagocitar patógenos opsonizados y no opsonizados, sin embargo, la fagocitosis mediada por opsoninas ha sido la más estudiada. Los principales receptores de opsoninas de los neutrófilos en humanos son los receptores Fc γ RIIa (CD32), Fc γ RIIIb (CD16b) (Rosales, 2017) y el receptor de complemento CR3 (CD11b/CD18) (Vandendriessche et al., 2021). Cuando el neutrófilo reconoce a las partículas opsonizadas, extiende su membrana alrededor de la partícula, envolviéndola para ser internalizada en una vesícula endocítica denominada fagosoma. El fagosoma luego pasa un proceso de maduración, que consiste en la fusión con los gránulos citoplasmáticos, vesículas secretoras y finalmente lisosomas. Entonces, el fagosoma se convierte en fagolisosoma y adquiere características microbicidas porque se liberan las enzimas proteolíticas y proteínas bactericidas de los lisosomas al lumen del fagosoma (W. L. Lee et al., 2003). Además, el complejo NADPH oxidasa se ensambla en la membrana del fagosoma. La NADPH oxidasa es un complejo enzimático que produce especies reactivas de oxígeno (ROS) al interior del fagosoma, las cuales son muy reactivas y contribuyen a la muerte y destrucción de la partícula fagocitada (Uribe-Querol & Rosales, 2020).

Otra función antimicrobiana de los neutrófilos es la degranulación (Lacy, 2006). En esta función, las proteínas antimicrobianas contenidas en los gránulos citoplasmáticos pueden liberarse al medio extracelular y actuar contra patógenos. La degranulación es un proceso jerárquico que parece depender de los niveles de Ca²⁺ intracelular (Faurischou & Borregaard, 2003). Las vesículas secretoras son las primeras en liberarse, seguidas de los gránulos de gelatinasa, después los gránulos específicos y finalmente los gránulos

azurófilos (Sengeløv et al., 1995). Los neutrófilos también pueden llevar a cabo el proceso de NETosis (Branzk et al., 2014), el cual consiste en la liberación de fibras de cromatina decoradas con proteínas de los gránulos (Li & Tablin, 2018). Estas fibras de DNA y proteínas forman estructuras tipo red que pueden atrapar a microorganismos extracelulares grandes y por tanto se han denominado trampas extracelulares de neutrófilos o NET, por sus siglas en inglés: neutrophil extracellular traps. Durante la NETosis, la elastasa migra de los gránulos azurófilos al núcleo donde degrada parcialmente a las histonas y promueve de esta forma la descondensación de la cromatina (Papayannopoulos et al., 2010). Posteriormente, la membrana nuclear desaparece y las NET son liberadas al medio extracelular.

Los neutrófilos también son capaces de secretar citocinas o expresar ciertas moléculas en su membrana para comunicarse con otras células del sistema inmunológico como los linfocitos, las células asesinas naturales y células dendríticas (Rosales, 2020). Al parecer, la comunicación de los neutrófilos con otros leucocitos contribuye a dar forma a la respuesta inmunológica debido a que los neutrófilos participan en el reclutamiento y activación de las células linfocitos (Costa et al., 2019) y pueden actuar como células presentadoras de antígenos (Vono et al., 2017).

v. Muerte de los neutrófilos

Gran parte de los neutrófilos que llevaron a cabo sus funciones en el tejido inflamado mueren por apoptosis *in situ* y son eliminados principalmente por los macrófagos y células dendríticas residentes del tejido (Bratton & Henson, 2011). Algunos de los neutrófilos reclutados al tejido pueden salir del tejido y volver a entrar al torrente sanguíneo mediante el proceso llamado trans migración reversa y posteriormente dirigirse a la médula ósea para su eliminación (Wang et al., 2017). La eliminación de neutrófilos apoptóticos regula negativamente la producción de neutrófilos en la médula ósea (Bardoel et al., 2014). Cuando los macrófagos y células dendríticas fagocitan a los neutrófilos apoptóticos en los tejidos extramedulares se desencadena una respuesta antiinflamatoria que provoca una menor producción de G-CSF. En consecuencia, la granulopoyesis disminuye y los neutrófilos maduros son retenidos en la médula ósea (Stark et al., 2005). Sin embargo, si las infecciones no se controlan y éstas se propagan sistémicamente, la demanda de

neutrófilos aumenta (Cain et al., 2011). Entonces, para reponer la reserva de neutrófilos y proporcionar continuidad a la alta demanda de neutrófilos durante la infección, se genera una granulopoyesis de emergencia. La granulopoyesis de emergencia implica una mayor proliferación de los progenitores mieloides, por ende, la generación de *novo* de neutrófilos. Posteriormente neutrófilos maduros e inmaduros se liberan de la médula ósea a la circulación sanguínea para satisfacer la mayor demanda de neutrófilos durante una infección grave (Manz & Boettcher, 2014). Por otro lado, en ausencia de estímulos inflamatorios, los neutrófilos en la circulación comienzan a desarrollar un fenotipo "envejecido" (Adrover et al., 2016). La naturaleza circadiana del envejecimiento de los neutrófilos sugiere que los neutrófilos envejecen dentro de las 6 a 8 horas posteriores a la salida de la médula ósea (Visan, 2015). Los neutrófilos envejecidos regulan positivamente la expresión de CXCR4, lo que les permite regresar a la médula ósea para su eliminación (Casanova-Acebes et al., 2013).

vi. Heterogeneidad en la población de neutrófilos

El estudio del fenotipo de los neutrófilos ha desafiado la idea tradicional de que los neutrófilos son una población homogénea de células terminalmente diferenciadas con una función bien definida y altamente conservada. En la última década se ha hecho más evidente que los neutrófilos pueden ser una población celular heterogénea (Rosales, 2018). La evidencia sugiere que los neutrófilos tienen un alto grado de plasticidad y su fenotipo puede cambiar en respuesta a señales microambientales y sistémicas o ser el resultado de envejecimiento celular. En la literatura, se han definido diferentes poblaciones de neutrófilos en función de una serie de características que incluyen: tamaño, densidad, morfología nuclear y expresión de moléculas de superficie. Las diferencias en estas características de los neutrófilos se han relacionado con estados transcripcionales, síntesis de proteínas, estados de activación y diferentes fenotipos funcionales (Ng et al., 2019). Por ejemplo, en condiciones normales, en circulación se pueden encontrar neutrófilos maduros, neutrófilos inmaduros y neutrófilos envejecidos. Se ha sugerido que el envejecimiento de los neutrófilos está regulado por el microbioma del organismo vía receptores tipo Toll, que están presentes en la membrana plasmática de los neutrófilos (Zhang et al., 2015). Los

neutrófilos envejecidos se diferencian de los neutrófilos recién liberados a circulación ya que tienen una morfología nuclear hipersegmentada, mayor expresión de CXCR4 y menor expresión de CD62L (Adrover et al., 2016). Funcionalmente, los neutrófilos envejecidos parecen tener una mayor capacidad para formar NET que los neutrófilos recién liberados a circulación (Zhang et al., 2015).

Cabe destacar que todavía es incierto si las subpoblaciones observadas en los neutrófilos se asemejan a subpoblaciones celulares definidas de los linfocitos. Las subpoblaciones de linfocitos representan células comprometidas con un linaje, con amplias diferencias epigenéticas y transcripcionales que sustentan este compromiso y que se refleja en sus funciones altamente específicas. Por ejemplo, las células T CD8⁺ matan directamente a las células infectadas por virus, mientras que las células T CD4⁺ asisten en la activación de la respuesta inmunológica. Estas subpoblaciones de linfocitos T tienen una plasticidad más limitada y carecen de la capacidad de realizar las funciones de la otra subpoblación celular. Por el contrario, la heterogeneidad de neutrófilos parece ser definida por diferentes estados de preactivación, activación, polarización o maduración. Además, parece que las señales sistémicas y microambientales pueden inducir cambios en los neutrófilos durante su desarrollo, cuando se encuentren la circulación o cuando hayan migrado al tejido, dando como resultado neutrófilos con diferentes fenotipos (Rosales, 2018)

vii. Neutrófilos de baja densidad

Los neutrófilos tradicionalmente se purifican mediante un gradiente de densidad (García-García et al., 2013) donde los neutrófilos aparecen en el fondo del tubo (fracción de alta densidad), separados de las células mononucleares (fracción de baja densidad) (**Figura 3**). Sin embargo, en 1986, se identificó por primera vez que existen neutrófilos que se localizan en la fracción de baja densidad, junto con las células mononucleares (Hacbarth & Kajdacsy-Balla, 1986). Células con morfología de neutrófilos fueron identificadas por microscopía entre las células mononucleares. A estos neutrófilos identificados en la fracción de baja densidad, se les denominó neutrófilos de baja densidad (LDN, por sus siglas en inglés: low-density neutrophils) contaminantes de la capa de células mononucleares. Además, en este estudio se encontró que se obtenían más LDN de la sangre de personas que padecen fiebre reumática aguda, lupus eritematoso sistémico y artritis

reumatoide que de la sangre de personas sanas. Los investigadores atribuyeron estos hallazgos a la presencia de factores humorales, en el plasma de las personas enfermas, que pueden activar a los neutrófilos. Los investigadores especulan que la activación de los neutrófilos provoca degranulación y aumento en el volumen celular por lo que la densidad de los neutrófilos disminuye (Hacbarth & Kajdacsy-Balla, 1986).

A partir de este reporte inicial, los LDN han sido identificados en personas adultas sanas (Blanco, et al., 2021; Hassani et al., 2020) y en personas con varias condiciones patológicas, como lupus (Villanueva et al., 2011), artritis reumatoide (Wright et al., 2017), sepsis (Morisaki et al., 1992), psoriasis (Lin et al., 2011), asma (Fu et al., 2014a), cáncer (Brandau et al., 2011), infecciones por VIH (Cloke et al., 2012), malaria (Rocha et al., 2015) y tuberculosis (La Manna et al., 2019). Sin embargo, la morfología y función de los LDN todavía no están bien definidas y parecen depender de la patología o condición de las personas (Hassani et al., 2020). Se ha encontrado que los LDN pueden tener un fenotipo inmaduro caracterizado por poseer un núcleo en banda y expresar CD10 (Brandau & Hartl, 2017). Por otro lado, funcionalmente, se han identificado LDN con propiedades proinflamatorias y LDN con propiedades antiinflamatorias (Scapini et al., 2016). Estos hallazgos sugieren que pueden existir diferentes subtipos de LDN.

Actualmente se desconoce el posible origen de los LDN. Se ha visto que la población de LDN puede estar compuesta por neutrófilos inmaduros, principalmente células en banda y por neutrófilos maduros que poseen un núcleo multilobulado. Por lo tanto, se piensa que la población de LDN está compuesta por neutrófilos inmaduros que fueron liberados de la médula ósea en respuesta a inflamación crónica o inmunosupresión y por neutrófilos activados que sufrieron el proceso de degranulación y por lo tanto tienen una densidad menor (Rosales, 2018). La evidencia sugiere que la activación de neutrófilos *in vitro* induce que los neutrófilos densidad normal, pierdan su densidad y aparezcan en la capa de células mononucleares tras la centrifugación por gradiente de densidad. Por ejemplo, la exposición al suero de personas con leishmaniasis visceral puede provocar que los neutrófilos pierdan densidad y aparezcan en la fracción de baja densidad, tras la purificación por gradiente de densidad (Sharma et al., 2016). Así mismo, la incubación directa de neutrófilos o sangre completa con *Mycobacterium tuberculosis* puede alterar la densidad de los neutrófilos y

convertirlos en LDN (Deng et al., 2016). También se reportó que la incubación de neutrófilos con citocinas como el factor de crecimiento transformante- β induce cambios que llevan a la aparición de LDN (Sagiv et al., 2015).

En los últimos años el estudio de los LDN se ha convertido en objeto de interés clínico debido a que diversos reportes sugieren que el número de LDN parece estar correlacionado positivamente con la gravedad de algunas enfermedades como asma (Fu et al., 2014a), esclerosis múltiple (Ostendorf et al., 2019), COVID-19 (Morrissey et al., 2020), infecciones por HIV (Cloke et al., 2012). Entonces, al parecer las situaciones de inflamación crónica e inmunosupresión inducen un aumento en la cantidad de LDN. Aunque todavía no es claro el papel que juegan los LDN en salud y enfermedad, se ha reportado que el fenotipo funcional de los LDN puede contribuir a la patogénesis de las enfermedades. Por ejemplo, los LDN de personas con lupus son más propensos a liberar NET que los neutrófilos de personas sanas. Además, en el suero de las personas enfermas se encontraron autoanticuerpos que reconocen los componentes de las NET como DNA de doble cadena y catelicidina LL-37. Por este motivo, se ha propuesto que los LDN de las personas con lupus pueden contribuir a la patogénesis de la enfermedad (Villanueva et al., 2011).

OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad caracterizada por la acumulación anormal o excesiva de grasa que representa un riesgo para la salud. Se considera que la obesidad se origina cuando la ingesta calórica es mayor que el gasto energético. Sin embargo, la etiología de la obesidad es muy diversa, en donde participan factores, ambientales, genéticos, estilo de vida y nivel socioeconómico (Bhupathiraju & Hu, 2016). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la obesidad afecta al 13% de la población mundial y una tercera parte de la población mexicana padece obesidad. El Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) indica que la prevalencia de obesidad ha incrementado a nivel mundial en las últimas décadas y México es uno de los dos países con mayor prevalencia de obesidad en el mundo (Rivera et al., 2018). La obesidad es el principal factor de riesgo modificable para el desarrollo de enfermedades crónicas como: desórdenes endócrinos (resistencia a la insulina y diabetes) (Bhupathiraju & Hu, 2016; Esser et al., 2014), enfermedades cardiovasculares

(hipertensión, aterosclerosis), dislipidemias (Vekic et al., 2019), problemas respiratorios y cáncer (Bardou et al., 2013; Engin, 2017).

Los indicadores más utilizados para identificar y clasificar a las personas con obesidad son el índice de masa corporal (IMC) y la circunferencia de cintura. El IMC se calcula al dividir el peso (kg) para el cuadrado de la altura (m) de una persona. La Organización Mundial de la Salud indica que una persona adulta puede padecer obesidad cuando su IMC es mayor a $30 \text{ kg}/(\text{m})^2$ (Organización Mundial de la Salud, 2021). Por otro lado, la grasa localizada alrededor del abdomen se asocia a un mayor riesgo de desarrollar comorbilidades (Després & Lemieux, 2006; McLaughlin et al., 2011). Por este motivo, la Norma Oficial Mexicana indica que los adultos padecen obesidad abdominal cuando su circunferencia abdominal es mayor a 80 cm en mujeres y mayor a 90 cm en hombres. El objetivo general de clasificar a las personas con obesidad es identificar a los individuos y grupos de personas que tienen un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad y así poder prevenir y tratar las posibles complicaciones derivadas de la obesidad.

i. El tejido adiposo

El tejido adiposo se distribuye por todo el cuerpo y está compuesto principalmente de adipocitos células endoteliales y fibroblastos. El tejido adiposo desempeña un papel importante en el metabolismo de lípidos. Los ácidos grasos libres se acumulan en los adipocitos y se esterifican en triglicéridos para su almacenamiento. Los principales depósitos de lípidos (grasa) son los tejidos adiposos subcutáneo, intraabdominal, omental y visceral. Una vez que se requiere la utilización de triglicéridos para obtener energía, los triglicéridos se someten a lipólisis y se hidrolizan a glicerol y ácidos grasos libres que entran a circulación y son transportados a otros tejidos, principalmente músculo e hígado. Además, el tejido adiposo tiene funciones de un órgano endocrino ya que secreta hormonas, como leptina, adiponectina y resistina; y citocinas como IL-6, IL-1 β e IL-10 (Vázquez-Vela et al., 2008). En conjunto las proteínas secretadas por el tejido adiposo se denominan adipocinas y juegan un papel importante en el metabolismo y la respuesta inmunológica. En el tejido adiposo también están presentes leucocitos especialmente macrófagos que fagocitan a los adipocitos apoptóticos (Russo & Lumeng, 2018). Se ha demostrado que los leucocitos presentes en el tejido adiposo tienen funciones tanto antiinflamatorias como

proinflamatorias. Por ejemplo, el subtipo antiinflamatorio de macrófagos, M2 participa en la inmunosupresión, reparación de tejidos y la eliminación de adipocitos necróticos. Mientras que el subtipo proinflamatorio de macrófagos M1 se caracteriza por la liberación de citocinas que impulsa la respuesta inmune (Castoldi et al., 2016). En el tejido adiposo de las personas delgadas o de peso normal predominan los macrófagos M2, manteniendo así un estado no inflamatorio en el tejido (Chylikova et al., 2018).

ii. Inflamación en obesidad

La inflamación es una respuesta biológica que forma parte del mecanismo de defensa del cuerpo en respuesta a agentes dañinos. Existen dos tipos principales de inflamación, inflamación aguda e inflamación crónica. La inflamación aguda, comienza rápidamente (minutos u horas) y generalmente refleja la respuesta del cuerpo a una infección o lesión. Por el contrario, la inflamación crónica se caracteriza por una progresión lenta y severa (semanas, meses o años). Generalmente, los efectos de la inflamación crónica varían según la causa de la lesión y la capacidad del cuerpo para reparar el daño. Un estado de inflamación crónica puede causar respuestas inapropiadas que a su vez pueden provocar daño al organismo.

En el caso de la obesidad, el desbalance entre la ingesta y el gasto energético provoca que el tejido adiposo aumente su capacidad de almacenamiento de triglicéridos, dando como resultado un crecimiento del tejido adiposo por aumento en el número de adipocitos (hiperplasia). Si el tejido adiposo ya no puede expandirse por hiperplasia de los adipocitos, el exceso de las moléculas de triglicéridos que se almacenan en los adipocitos provoca el agrandamiento de las células individuales (hipertrofia) hasta que los adipocitos se saturan y ya no son capaces de expandirse y mueren principalmente por necrosis (Reilly & Saltiel, 2017). La rápida expansión del tejido adiposo en la obesidad puede proporcionar señales intrínsecas generadas por la muerte de adipocitos, hipoxia y mecanotransducción de interacciones entre las células y la matriz extracelular. Estas señales intrínsecas pueden desencadenar una respuesta inflamatoria por el aumento en la liberación de adipocinas proinflamatorias, disminución en la liberación de adipocinas antiinflamatorias e infiltración de leucocitos en el tejido adiposo (Reilly & Saltiel, 2017).

La evidencia actual demuestra que existe una asociación entre la obesidad y la inflamación sistémica. En obesidad los niveles de mediadores inflamatorios, como proteína C reactiva (Aronson et al., 2004), IL-6 (Eder et al., 2009) e IL-8 (Strackowski et al., 2002) están elevados en circulación. Además, se ha demostrado que, en obesidad, aumentan los niveles circulantes de ácidos grasos libres (Boden, 2008), que posiblemente actúan como ligandos del receptor tipo Toll 4 (TLR-4) activando así a los macrófagos (Nguyen et al., 2007). Los niveles circulantes de marcadores de activación endotelial como E-selectina, P-selectina también aumentan en la obesidad (Vázquez et al. 2005) lo que se ha relacionado con una disminución en la sensibilidad a la insulina (Caballero, 2003).

iii. Neutrófilos y obesidad

Aunque la actividad de los neutrófilos está relacionada directamente con la inflamación aguda, recientemente se ha descrito que los neutrófilos también pueden participar en la patogénesis de ciertas enfermedades inflamatorias crónicas, como cáncer (Uribe-Querol & Rosales, 2015), aterosclerosis (Silvestre-Roig et al., 2020), enfermedades neurodegenerativas (Rossi et al., 2020) y artritis reumatoide (Wright et al., 2014). Los mecanismos principales de los neutrófilos que contribuyen a la patogénesis de las enfermedades inflamatorias crónicas incluyen a la liberación de especies reactivas de oxígeno y a la producción de NET. Algunos reportes sugieren que los neutrófilos infiltran el tejido adiposo en humanos (T. J. Shah et al., 2010). En un estudio realizado en ratones obesos se encontró que los neutrófilos infiltran el tejido adiposo durante la primera semana de tratamiento con una dieta alta en grasas (Talukdar et al., 2012). Esto sugiere que, como en la respuesta inmune clásica, los neutrófilos pueden ser unos de los primeros leucocitos en migrar al tejido adiposo inflamado. Sin embargo, el número de neutrófilos en tejido adiposo parece mantenerse constante después de la primera semana (Talukdar et al., 2012). Por lo que se ha sugerido que los neutrófilos pueden desempeñar diferentes funciones durante las diferentes etapas de la obesidad en el tejido adiposo (B. C. Lee & Lee, 2014). Por otro lado algunos reportes indican que existe una correlación positiva entre obesidad y un número elevado de neutrófilos en circulación (Herishanu et al., 2006). Sin embargo, se desconoce las implicaciones clínicas de estas observaciones.

Planteamiento del problema

Los neutrófilos de baja densidad constituyen una población celular que se ha identificado en la capa de células mononucleares durante la purificación de leucocitos por gradiente de densidad. Se ha reportado que el número de LDN aumenta en diversas condiciones fisiológicas y patológicas particularmente en enfermedades inflamatorias crónicas. La obesidad es una enfermedad asociada a inflamación crónica de bajo grado y al aumento en la cantidad de neutrófilos en circulación sanguínea. Sin embargo, no se ha estudiado a los LDN en el contexto de obesidad y se desconoce si el número de LDN en circulación sanguínea aumenta en obesidad.

Hipótesis

En la sangre de personas existen neutrófilos de baja densidad que aumentan en obesidad.

Objetivos

Objetivo general

Identificar neutrófilos de baja densidad en sangre de personas con obesidad para establecer si existe una relación entre el número de neutrófilos de baja densidad y la obesidad.

Objetivos específicos

- a) Purificar neutrófilos y células de la capa mononuclear de sangre de personas con un IMC menor a $30 \text{ kg}/(\text{m})^2$ y de personas con obesidad, teniendo un IMC mayor a $30 \text{ kg}/(\text{m})^2$.
- b) Realizar inmunofluorescencia para identificar neutrófilos y neutrófilos de baja densidad por citometría de flujo.
- c) Cuantificar los neutrófilos de baja densidad sanguíneos de los dos grupos de personas.

Materiales y métodos

a) Disoluciones

- **Disolución amortiguadora de fosfatos – PBS (phosphate buffer saline)**

2.12 mM KH_2PO_4 , 11.35 mM Na_2HPO_4 , NaCl 0.321 M, disueltos en agua Mili Q;
pH = 7.4

El PBS se utilizó para purificar leucocitos, para lavar las células y para mantener las suspensiones celulares en óptimas condiciones.

- **Disoluciones de lisis de eritrocitos**

- **Hipotónica**

0.2 % NaCl, HEPES 20 mM, 1 % BSA, disueltos en agua Mili Q ; pH=7.4

- **Hipertónica**

1.6 % NaCl, HEPES 20 mM, 1 % BSA, disueltos en agua Mili Q; pH=7.4

Las disoluciones de lisis de eritrocitos se utilizaron para eliminar los eritrocitos restantes en la fracción de neutrófilos después de la purificación de leucocitos por gradiente de densidad. Primero los neutrófilos se centrifugan y se elimina el líquido sobrenadante. Los neutrófilos se resuspenden en la disolución hipotónica-y se mezclan suavemente durante 1 min. Inmediatamente después se agrega el mismo volumen de la disolución hipertónica. La disolución hipotónica causa hinchazón celular y eventual lisis de los eritrocitos por el movimiento osmótico del disolvente. Mientras que, la disolución hipertónica se añade para recuperar la isotonicidad en la suspensión celular y así prevenir la hinchazón y lisis de los neutrófilos.

- **Disolución de lavado para inmunofluorescencia directa**

1 % SFB, 0.1 % NaN_3 disueltos en PBS

La disolución de lavado se utiliza durante la incubación de las células con los anticuerpos dirigidos a las moléculas de superficie. Esta disolución sirve para reducir las interacciones no específicas de los anticuerpos y para prevenir agregación celular durante la incubación.

b) Donadores

Para la realización de este estudio, se obtuvieron muestras sanguíneas por punción intravenosa de donadores adultos no obesos y de donadores adultos que padecen obesidad ($IMC > 30 \text{ kg}/(\text{m})^2$). Las muestras sanguíneas se obtuvieron con el consentimiento informado de todos los donadores y siguiendo los protocolos de extracción de sangre aprobados por el comité de ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas y del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

c) Obtención de sangre

Se extrajeron 10 ml de sangre periférica por punción venosa de los donadores. La sangre se transfirió a un tubo de centrifuga cónico de 15 ml y se mezcló con 0.25 ml de heparina sódica 1000 UI/ml (Laboratorios Pisa, Guadalajara, México) para prevenir que la sangre se coagulara. Las muestras de sangre heparinizadas se mantuvieron a 4°C hasta ser procesadas, siempre en menos de 1 hora.

d) Purificación de leucocitos por gradiente de densidad

Las muestras de sangre heparinizadas se transfirieron a un tubo de centrifuga cónico de 15 ml de que contenía 2 ml de Dextrán T500 al 6 % (Pharmacia Fine Chemicals; N° de catálogo: 170320-01, Upsala, Suecia) en PBS. La sangre heparinizada y el dextrán se mezclaron invirtiendo el tubo dos o tres veces. La burbuja que se forma en la parte superior del tubo se reventó y el tubo se dejó en reposo por 45 min a temperatura ambiente. De esta forma, el dextrán induce a que los eritrocitos se aglutinan y se sedimenten dejando así en la parte superior del tubo al plasma rico en leucocitos.

Después, se tomó el plasma rico en leucocitos con una pipeta Pasteur de plástico y se transfirió a un tubo de centrifuga cónico de 15 ml que contenía 5 ml de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Chicago, Illinois) frío. Durante la transferencia, se cuidó que el plasma no se mezclara con el Ficoll-Paque PLUS. Así el plasma rico en leucocitos forma una segunda capa sobre el Ficoll-Paque Plus. Posteriormente, el tubo se centrifugó a $516 \times g$ a 4°C durante 20 min. Al término de la centrifugación, los componentes del plasma rico en

leucocitos se separan por densidad. Entonces, en la parte superior del tubo se ubica el plasma, en la interfase entre el plasma y el Ficoll-Paque se encuentran las células mononucleares (monocitos y linfocitos) y en el fondo del tubo se encuentran los neutrófilos.

Para poder recolectar a las células separadas por la gradiente de densidad se eliminó el plasma. Primero, se recolectaron las células mononucleares y se transfirieron a un tubo de centrífuga de 15 ml que contenía 5 ml de PBS frío. Luego, se eliminó el Ficoll-Paque y los neutrófilos se transfirieron a un tubo de centrífuga cónico de 50 ml.

Las células mononucleares se centrifugaron a $290 \times g$ a $4^\circ C$ durante 5 min. Posteriormente, el sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en PBS frío. Por otro lado, junto con los neutrófilos todavía se encuentran algunos eritrocitos. Para eliminar a estos eritrocitos contaminantes, se realizó un choque hipotónico. Para esto, los neutrófilos se centrifugan y después de eliminar el sobrenadante, se resuspenden en 10 ml de disolución hipotónica fría. Después de agitar suavemente por 1 min se agregaron 10 ml de disolución hipertónica fría. A continuación, las células se centrifugaron a $290 \times g$ a $4^\circ C$ durante 5 min y se resuspendieron en PBS frío. Con este tratamiento los eritrocitos se rompen y los neutrófilos quedan puros.

Finalmente, el conteo de las células mononucleares y de los neutrófilos se realizó con un hemocitómetro bajo el microscopio óptico. La suspensiones celulares se mantuvieron a $4^\circ C$ a una concentración de 1×10^6 cell/ml. La viabilidad celular se determinó utilizando la prueba de exclusión del azul de tripano para determinar si las células absorben o excluyen el tinte. Una célula viable tendrá un citoplasma claro, mientras que una célula no viable tendrá un citoplasma azul.

e) Caracterización de neutrófilos por citometría de flujo

i. Inmunofluorescencia directa para moléculas de superficie de neutrófilos

En tubos para microcentrífuga de 1.5 ml, se colocaron 1×10^6 células purificadas (neutrófilos o células mononucleares). Las células se resuspendieron en 100 μ l de disolución de lavado y se añadieron los anticuerpos requeridos para detectar las moléculas de superficie de interés (**Tabla 1**). Las suspensiones celulares se incubaron por 30 min a 4°C en la oscuridad, agitando suavemente los tubos cada 10 min. Posteriormente las células se lavaron con 1 ml de PBS centrifugando a 1300 x g durante 2 min. Finalmente, las células se fijaron en 1 % paraformaldehído disuelto en PBS.

Los anticuerpos fueron titulados previamente para obtener una señal de detección óptima en el citómetro de flujo.

Tabla 1: Anticuerpos contra moléculas de superficie				
Molécula (antígeno)	Nombre del anticuerpo monoclonal	Fluorocromo	Fabricante	N° de catálogo
CD16b humano	CLB-gran11.5	PE	BD Bioscience	550868
CD11b humano	ICRF44	AF 488	BioLegend	301317
CD66b humano	G10F5	AF 647	BioLegend	305109
CD14 humano	63D3	APC-Cy7	BioLegend	367107
CD15 humano	W6D3	PE-Cy5	BioLegend	323013

ii. Citometría de flujo

Las suspensiones celulares se procesaron en un citómetro de flujo modelo Attune Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, Foster City, California) (**Tabla 2**) del Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Se utilizaron células sin teñir para establecer los voltajes de captura de las poblaciones de neutrófilos y de células mononucleares. Así mismo, se utilizaron tinciones individuales para compensar y definir los voltajes de las poblaciones positivas. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa FlowJo versión 10.7.1 (Becton, Dickinson and Company, Ashland, Orlando).

Láseres	Canales de detección	Programa de captura
Azul 488 nm	BL1 – 530/30 nm BL2 – 574/26 nm BL3 – 690/50 nm	Attune Cytometric Software
Rojo 638 nm	RL1 – 660/20 nm RL2 – 780/60 nm	

La estrategia de análisis utilizada en este estudio se estableció al examinar a los neutrófilos purificados por citometría de flujo. Primero, se excluyeron del análisis a los aglomerados celulares definiendo la región *Singlets* del dot plot FSC-A vs FSC-H. De la región *Singlets*, se seleccionó a la región *R1* en el dot plot FSC vs SSC, en donde aparece una población homogénea de neutrófilos. A partir de *R1*, se seleccionó a la región *R2* en el dot plot FSC vs CD16b. La región *R2* representa a las células CD16b⁺. Luego, desde *R2* se realizó un dot plot de CD66b vs CD11b y se seleccionaron las células CD66b⁺CD11b⁺ que corresponden a la región *R3*. Finalmente, a partir de *R3* se realizó un dot plot de CD15 vs CD14 y se seleccionaron las células CD15⁺CD14⁺ que corresponden a la región *R4* (**Figura 4**).

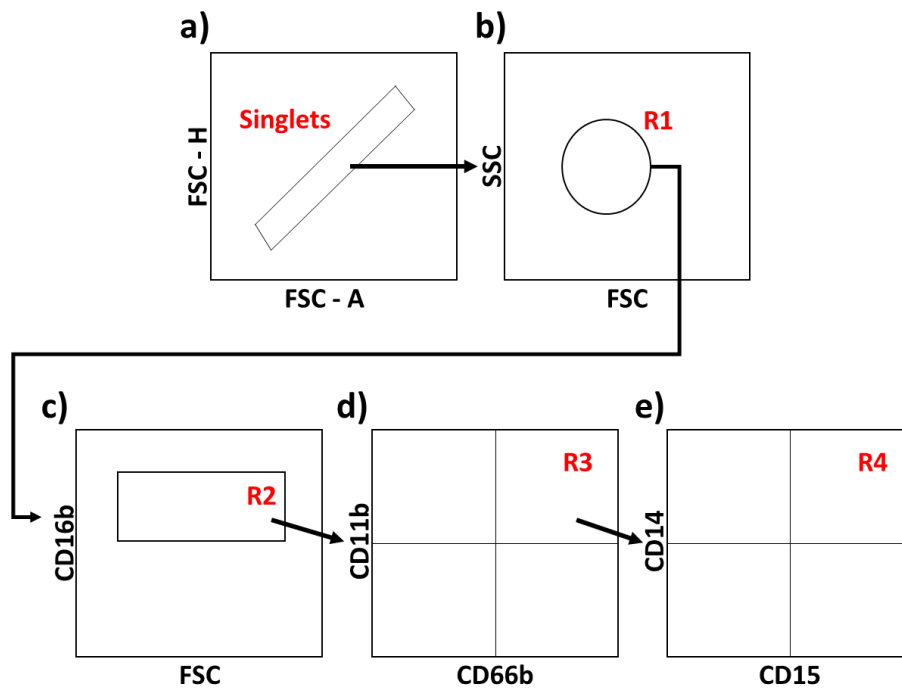


Figura 4. Estrategia de análisis para caracterizar neutrófilos. Ilustración que indica los dot plots a) FSC-A vs FSC-H, b) FSC vs SSC, c) FSC vs CD16b, d) CD66b vs CD11b y e) CD15 vs CD14 realizados para definir las regiones (rojo) y seleccionar a las poblaciones de interés al analizar neutrófilos sanguíneos por citometría de flujo.

f) Prueba Estadística

El análisis estadístico se realizó con el programa Prism 9.0.2 de (GraphPad Software). Para analizar las diferencias entre el número de neutrófilos purificados con respecto al factor obesidad y el porcentaje de LDN con respecto al factor obesidad, se utilizó la prueba U-Mann Whitney con un nivel de significancia de 0.05. Por otro lado, para comparar datos pareados se utilizó la prueba de Wilcoxon, la cual indica si la mediana de las diferencias entre la MFI para de neutrófilos y de LDN es diferente de cero, con un nivel de significancia de 0.05. Finalmente, para evaluar el efecto de la obesidad y el tipo de células (neutrófilos vs LDN) sobre el porcentaje de células CD16b⁺, se realizó una ANOVA de dos vías con un nivel de significancia de 0.05.

Resultados

i. Se obtienen más neutrófilos purificados de sangre de personas obesas que de personas no obesas.

Para estudiar a los neutrófilos provenientes de sangre periférica, las células se purificaron por gradiente de densidad. De esta forma se obtuvieron por un lado neutrófilos purificados y por otro células mononucleares. Posteriormente, para estimar la viabilidad celular, se utilizó la prueba de exclusión de azul de tripano. La viabilidad celular fue mayor o igual a 95% en todos los casos. Finalmente, para conocer el número de células obtenidas por la purificación, se realizó el conteo celular con un hemocitómetro bajo el microscopio óptico. Al contar el número de neutrófilos purificados, se encontró que se obtienen más neutrófilos de la sangre de personas obesas que de la sangre de personas no obesas (**Figura 5**). La mediana y el rango intercuartílico (IQR) del número de los neutrófilos purificados de las personas obesas fue 32.94 (IQR = 26.07 – 41.85) $\times 10^6$ neutrófilos; Mientras que la mediana del número de los neutrófilos purificados de personas no obesas fue 20.02 (IQR = 18.02 – 26.21) $\times 10^6$ neutrófilos.

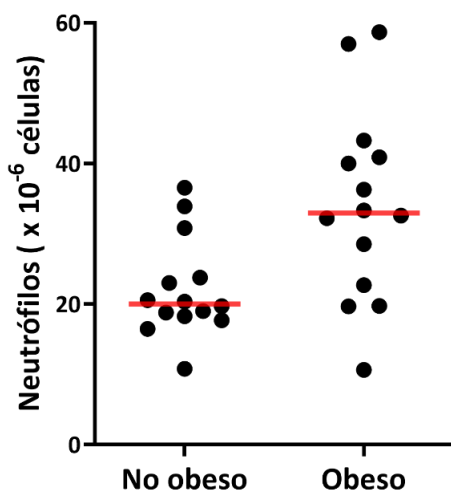


Figura 5. De la sangre de personas obesas se obtienen más neutrófilos que de la sangre de personas no obesas. Número de neutrófilos purificados por gradiente de densidad (Ficoll-Paque PLUS) de sangre periférica de personas no obesas y personas obesas. Cada punto representa a una persona. La línea horizontal roja indica la mediana de cada grupo. Los datos se analizaron utilizando la prueba U-Mann Whitney ($p=0.01$).

ii. En sangre de personas no obesas y en sangre de personas con obesidad existen neutrófilos de baja densidad

Entonces, para examinar el fenotipo de los neutrófilos purificados de la sangre periférica de los donadores, se realizó inmunofluorescencia directa y las células se analizaron por citometría de flujo. Primero, se analizaron a los neutrófilos, de tres personas no obesas. Para esto se siguió la estrategia de análisis que se muestra en la **Figura 4**. De este modo, se identificó que los neutrófilos de personas no obesas expresan las moléculas $CD16b^+$ $CD66b^+$ $CD11b^+$ $CD15^+$ $CD14^+$. La expresión de estas moléculas en conjunto indica que los neutrófilos tienen un fenotipo maduro (**Figura 6**).

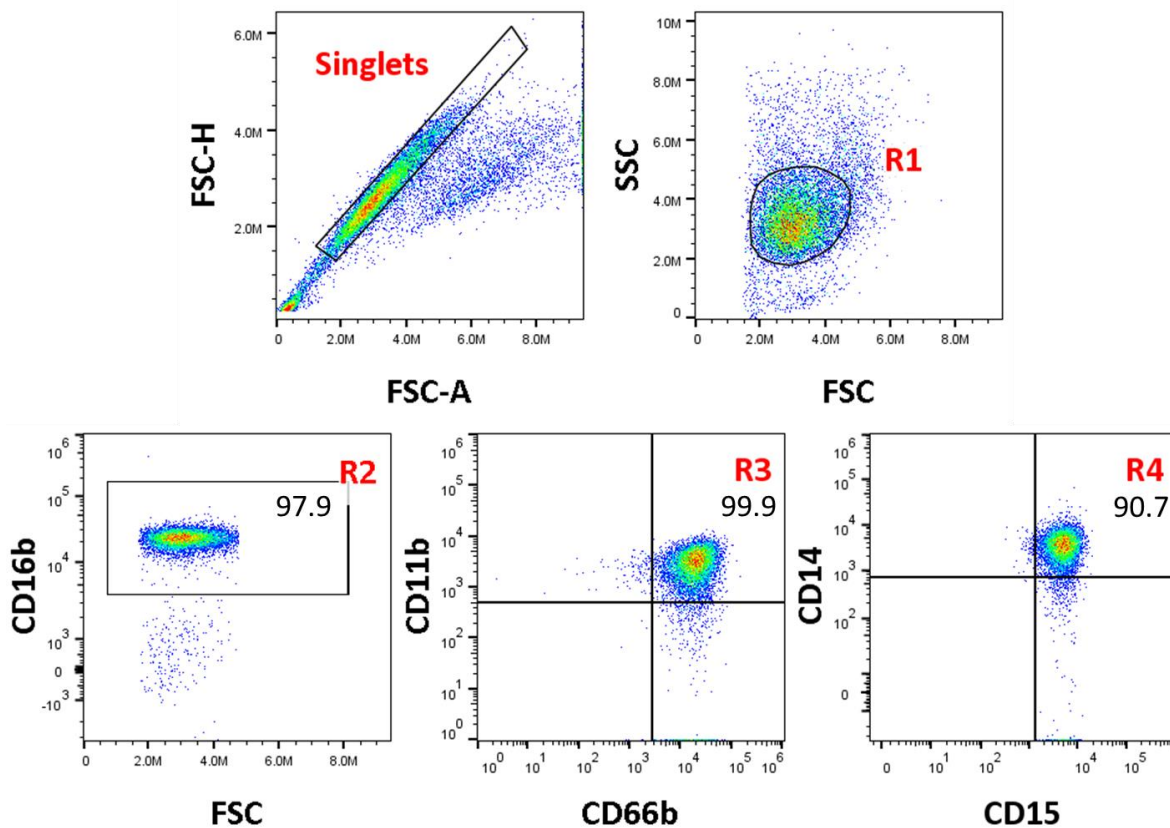


Figura 6. Los neutrófilos purificados de sangre de personas no obesas tienen un fenotipo maduro. Análisis por citometría de flujo de neutrófilos purificados por gradiente de densidad Ficoll-Paque para detectar moléculas de superficie de neutrófilos. Los neutrófilos tienen un fenotipo $CD16b^+$ $CD66b^+$ $CD11b^+$ $CD15^+$ $CD14^+$. Imagen representativa de tres experimentos independientes.

Posteriormente, para determinar si en la sangre de personas no obesas se obtienen neutrófilos que co-purifiquen con las células mononucleares, se analizaron las células mononucleares utilizando la misma estrategia de análisis que se definió para neutrófilos purificados (**Figura 4**). La mayoría de las células caen por debajo la región R1, lo cual significa que la mayoría de las células no son neutrófilos. Sin embargo, hay células que caen en la región R1. Estas células tienen las mismas características de dispersión de luz en FSC y SSC que los neutrófilos purificados. Además, las células de la región R1 también son $CD16b^+CD66b^+CD11b^+CD15^+CD14^+$ (**Figura 7**). Estos datos sugieren que efectivamente hay neutrófilos entre las células mononucleares y por tanto son neutrófilos de baja densidad.

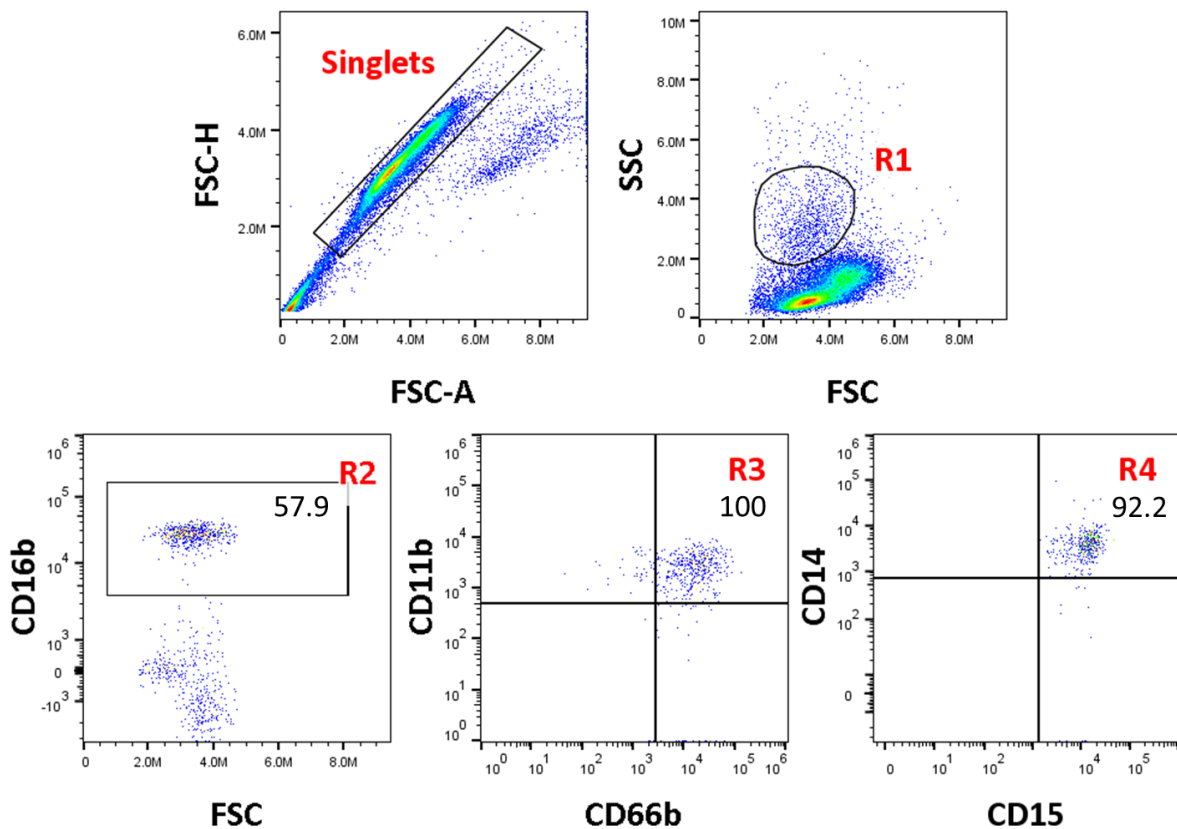


Figura 7. Entre las células mononucleares purificadas de sangre de personas no obesas hay células con características de neutrófilos maduros. Análisis por citometría de flujo para detectar moléculas de superficie de neutrófilos, entre las células mononucleares de sangre periférica obtenida de personas no obesas. Algunas células purificadas junto con las células mononucleares caen en la región R1 y tienen un fenotipo de neutrófilos maduros: $CD16b^+CD66b^+CD11b^+CD15^+CD14^+$. Imagen representativa de tres experimentos independientes.

Habiendo definido que existen de neutrófilos que co-purifican con las células mononucleares en la sangre de personas no obesas, se investigó si existen neutrófilos entre las células mononucleares purificadas de sangre de personas obesas. Primero, se analizaron a los neutrófilos purificados de la sangre de una persona obesa. Se encontró que los neutrófilos de la persona obesa también son $CD16b^+CD66b^+CD11b^+CD15^+CD14^+$ (**Figura 8**). La expresión de estas moléculas es similar a la expresión de los neutrófilos de las personas no obesas (**Figura 6**). Entonces, tanto los neutrófilos de las personas no obesas como los neutrófilos de las personas obesas tienen un fenotipo maduro.

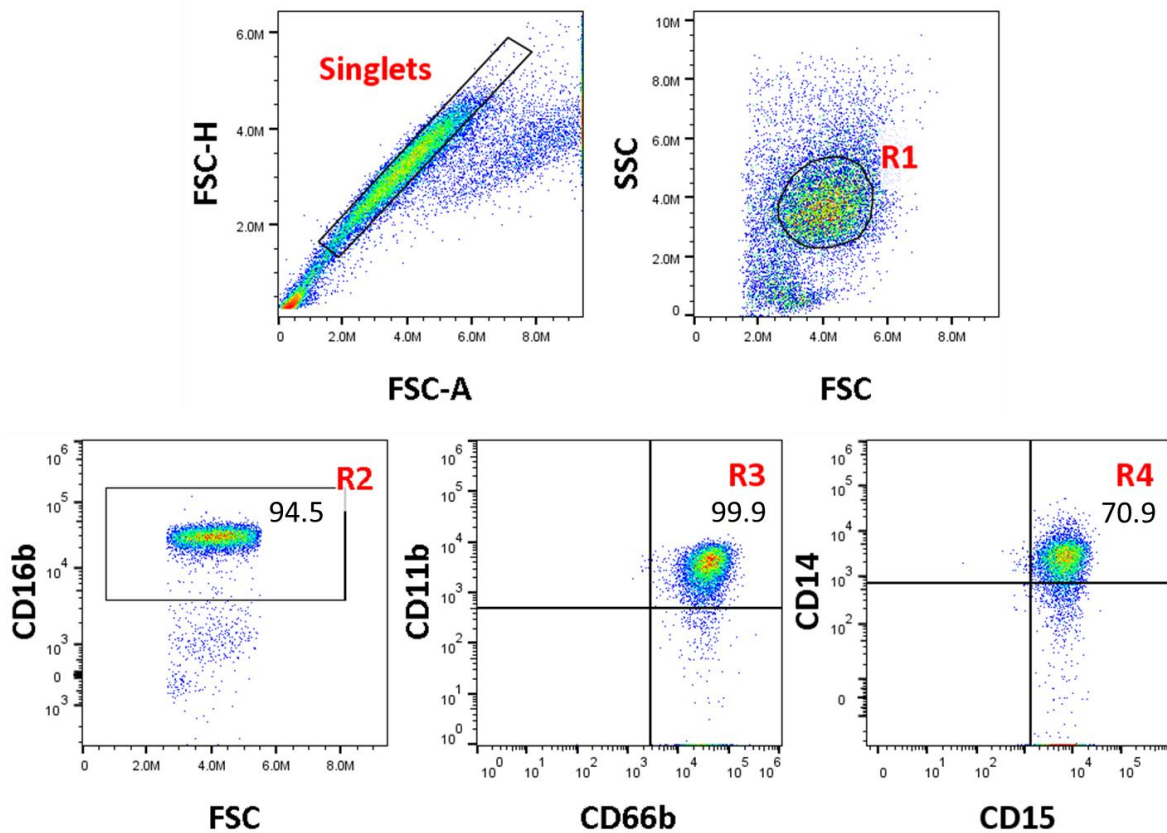


Figura 8. Los neutrófilos purificados de sangre de una persona obesa tienen un **fenotipo maduro**. Análisis por citometría de flujo de neutrófilos purificados por gradiente de densidad Ficoll-Paque para detectar moléculas de superficie de neutrófilos. La mayoría de los neutrófilos tienen un fenotipo $CD16b^+CD66b^+CD11b^+CD15^+CD14^+$.

Una vez definidos los parámetros para identificar neutrófilos por citometría de flujo, se analizaron las células mononucleares de una persona obesa (**Figura 9**). Se encontró que existen células que caen en la región de los neutrófilos R1. Además, estas células tienen un fenotipo $CD16b^+CD66b^+CD11b^+CD15^+CD14^+$. Este resultado sugiere hay células con características de neutrófilos maduros en la capa de células mononucleares proveniente de la sangre de personas obesas.

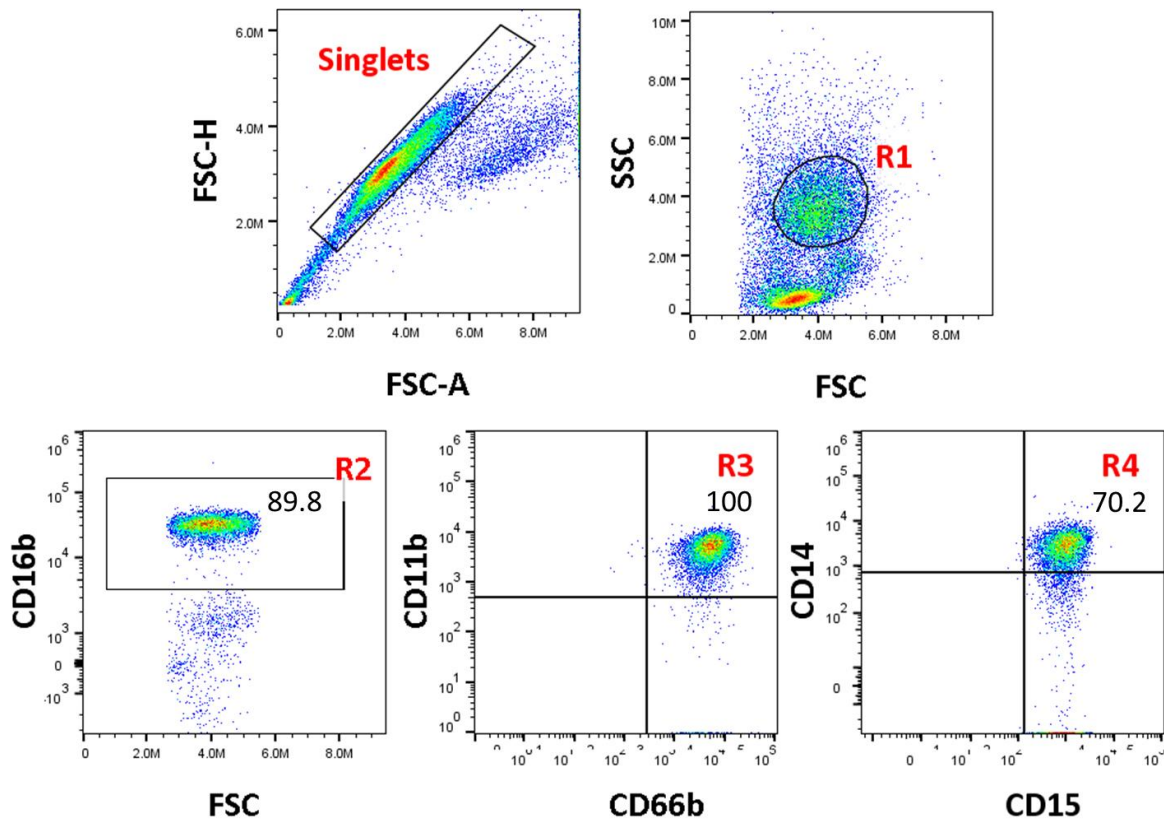


Figura 9. En la capa de células mononucleares proveniente de la sangre de una persona obesa existen células con características de neutrófilos maduros. Análisis por citometría de flujo para detectar moléculas de superficie de neutrófilos entre las células mononucleares de sangre periférica obtenida de una persona obesa. Algunas células purificadas junto con las células mononucleares caen en la región R1 y tienen un fenotipo de neutrófilos maduros: $CD16b^+CD66b^+CD11b^+CD15^+CD14^+$.

En las **Figuras 7 y 9** se puede observar que entre las células mononucleares hay células que caen en la región R1 y pueden ser diferenciadas de las células mononucleares por sus características de dispersión de luz en FSC y SSC. Además, las células que caen en R1, expresan las mismas moléculas que expresan los neutrófilos maduros. Estos resultados sugieren que en sangre de personas no obesas y de personas obesas hay neutrófilos de baja densidad. Cabe destacar que al comparar el análisis de las células mononucleares aisladas de la sangre de las personas no obesas (**Figura 7**) con el análisis de las células mononucleares aisladas de la sangre de la persona obesa (**Figura 9**), se encontró que en la sangre de la persona obesa hay más LDN que en la sangre de personas no obesas.

A continuación, para explorar si los neutrófilos y los LDN son células con las mismas características, analizamos la expresión de las moléculas de superficie CD16b, CD66b, CD11b, CD15 y CD14 tanto en los neutrófilos como en los LDN de personas sin obesidad (**Figura 10**). Se encontró que los LDN expresan más CD15 y ligeramente más CD16b que los neutrófilos (**Figura 10**). Por otro lado, la expresión de las moléculas CD66b, CD11b y CD14 fue similar en neutrófilos y en LDN (**Figura 10**). Estos resultados sugieren que los LDN tienen un fenotipo distinto al fenotipo de los neutrófilos.

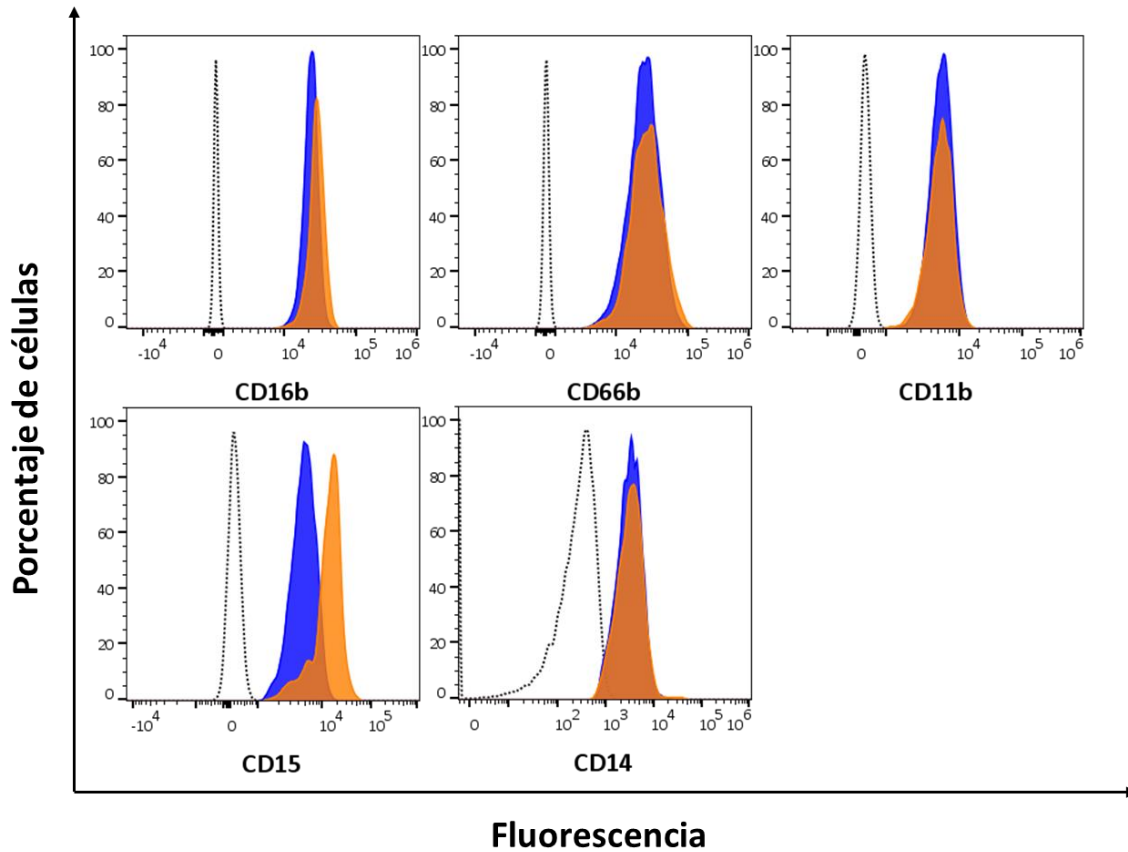


Figura 10. Niveles de expresión de las moléculas CD16b, CD66b, CD11b, CD15 y CD14 en neutrófilos y neutrófilos de baja densidad (LDN) de personas sin **obesidad**. Histogramas obtenidos por citometría de flujo. Los histogramas azules corresponden a neutrófilos y los histogramas naranjas representan a los neutrófilos de baja densidad (LDN). El histograma en blanco indica el control sin tinción. Imagen representativa de tres experimentos independientes.

Un análisis similar de los neutrófilos y los LDN de una persona con **obesidad** (**Figura 11**) mostró que los LDN expresan más CD15 y ligeramente más CD16b que los neutrófilos (**Figura 11**). De igual forma se vio que la expresión de las moléculas CD66b, CD11b y CD14 fue similar en neutrófilos y en LDN (**Figura 11**). Estos resultados indican que tanto en personas de peso normal como en personas obesas se encuentran neutrófilos y LDN con características similares. Pero además que los LDN tienen un fenotipo distinto al fenotipo de los neutrófilos.

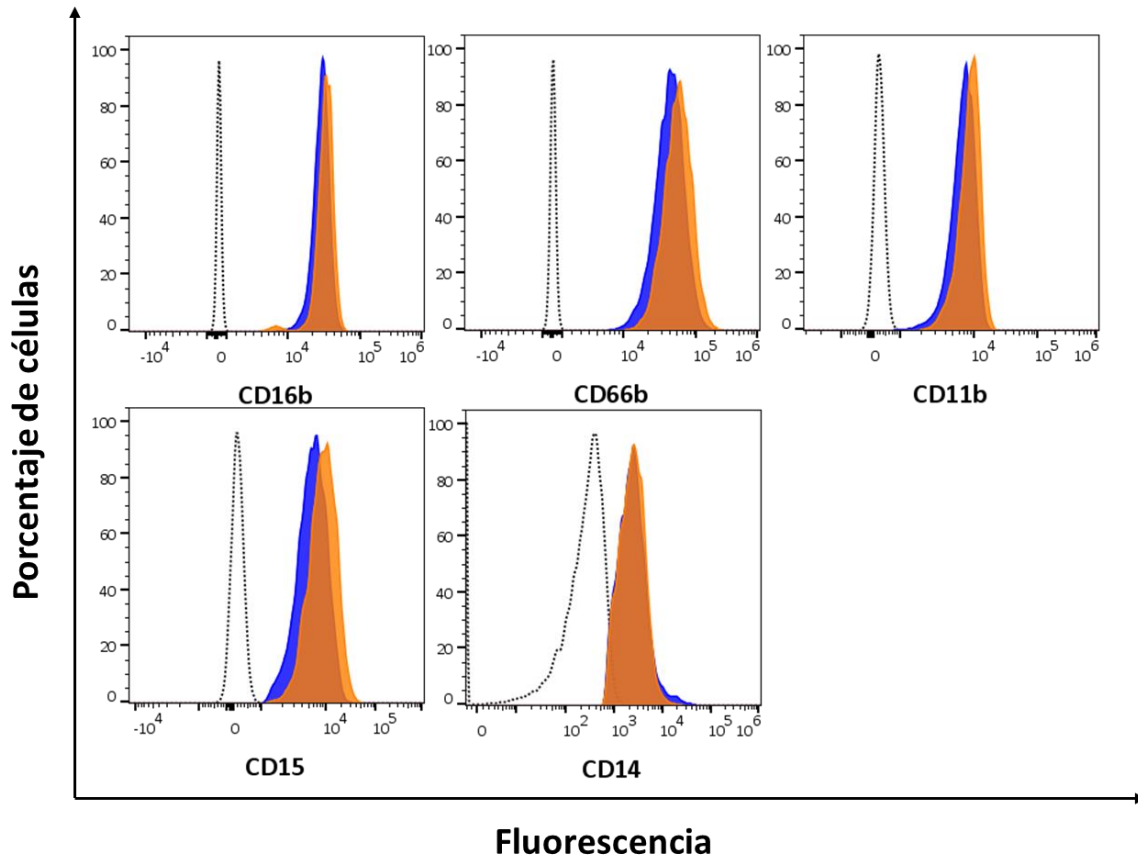


Figura 11. Niveles de expresión de las moléculas CD16b, CD66b, CD11b, CD15 y CD14 en neutrófilos y neutrófilos de baja densidad (LDN) de una persona obesa. Histogramas obtenidos por citometría de flujo. Los histogramas azules corresponden a neutrófilos y los histogramas naranjas representan a los neutrófilos de baja densidad (LDN). El histograma en blanco indica el control sin tinción.

Sin embargo, un análisis más detenido de los histogramas presentados en las **Figuras 10 y 11**, mostró que tanto los neutrófilos como los LDN obtenidos de una persona obesa expresan más CD66b que los neutrófilos y LDN obtenidos de las personas no obesas (**Figura 12**). Estos datos sugieren que los neutrófilos en las personas obesas ya tienen un cierto grado de activación mayor que los neutrófilos de personas no obesas.

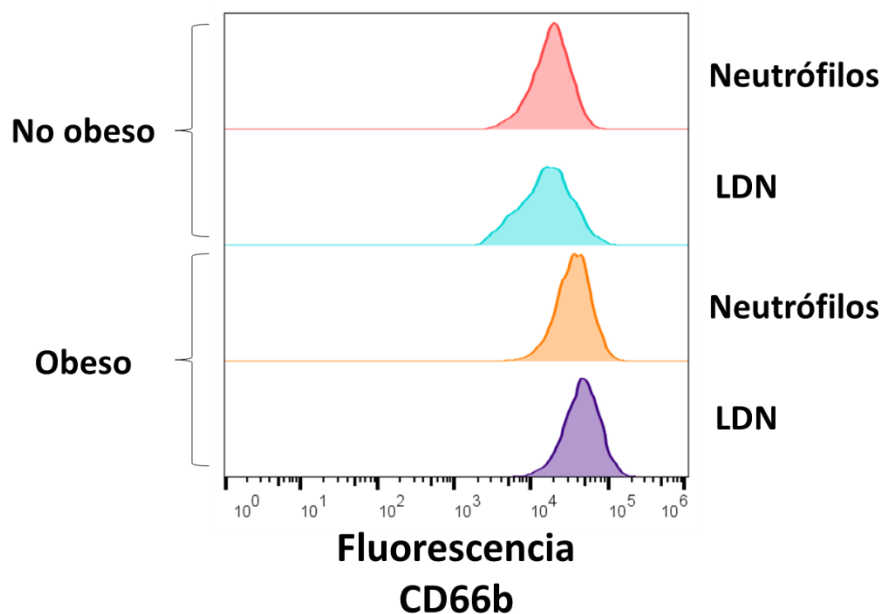


Figura 12. Los neutrófilos y neutrófilos de baja densidad (LDN) de una persona obesa expresan más CD66b que los neutrófilos y LDN de personas no obesas. Histogramas obtenidos por citometría de flujo. Se muestran los histogramas sobrepuestos de neutrófilos (rojo) y LDN (azul) de una persona no obesa; y neutrófilos (naranja) y LDN (morado) de una persona obesa.

iii. Hay más neutrófilos de baja densidad en personas obesas que en personas de peso normal

Para cuantificar los LDN que se obtienen de la sangre de los distintos donadores, se utilizó la citometría de flujo. Dado que CD16b se expresa exclusivamente en neutrófilos y el anticuerpo CLB-gran11.5 parece sólo reconocer a esta molécula, sin cruzar con la moléculas CD16a (presente en monocitos y macrófagos), decidimos usar la detección de la molécula CD16b como marcador de neutrófilos. Por tanto, en los ensayos posteriores los neutrófilos y los LDN se identifican por sus características de dispersión de luz en FSC y SSC y por la expresión de CD16b únicamente. Primero, se analizaron neutrófilos purificados y se definieron las regiones de interés: Singlets, R1 (región de neutrófilos) y R2 (células CD16b⁺), tal como se describió en materiales y métodos. Para este análisis se consideró que la región de Singlets representa el 100 % de las células. De esta forma se

confirmó que la mayoría de los neutrófilos purificados (más del 98%) son células CD16b⁺ tanto en personas obesas como en personas no obesas (**Figura 13**).

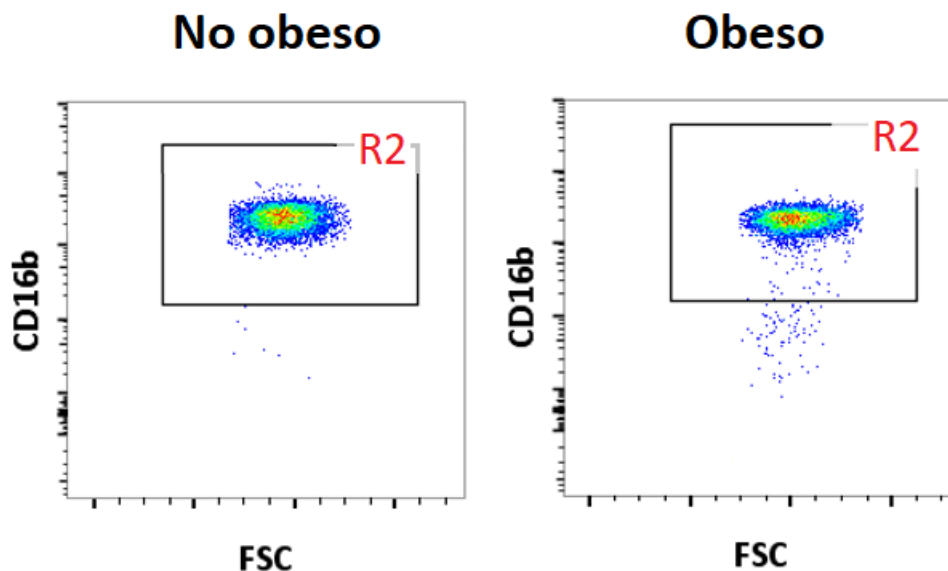


Figura 13. Los neutrófilos purificados de sangre periférica son CD16b⁺. Análisis por citometría de flujo de neutrófilos purificados de sangre periférica. Las células se tiñeron para detectar a la molécula CD16b. Se muestra el porcentaje de células CD16b⁺ de la región Singlets. Imagen representativa de siete experimentos con células de personas no obesas y trece experimentos con células de personas con obesidad.

De la misma manera, se analizaron las células mononucleares. Así se encontró que-entre las células mononucleares provenientes de sangre de personas obesas hay más LDN que entre las células mononucleares provenientes de sangre de personas no obesas (**Figura 14**).

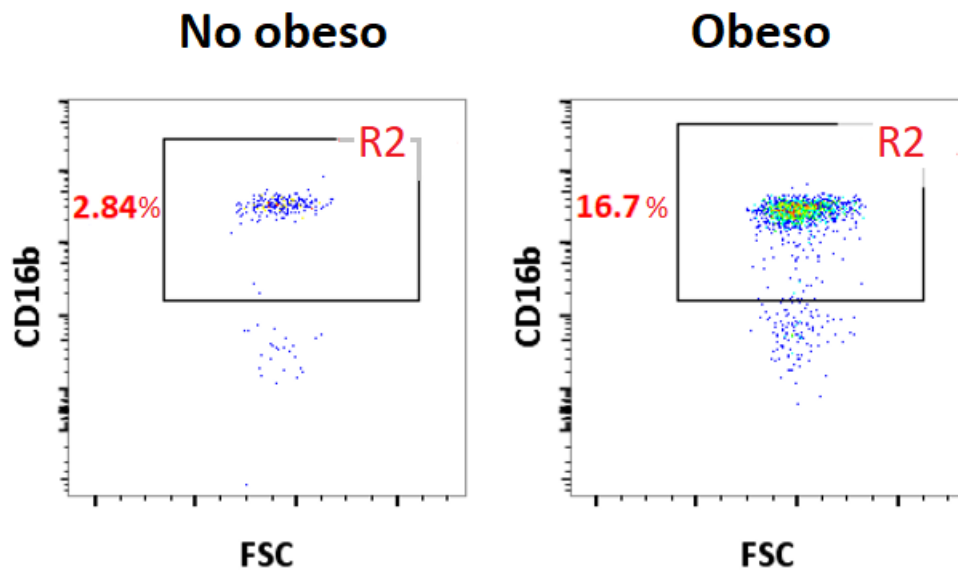


Figura 14. En personas con obesidad hay más neutrófilos de baja densidad (LDN) que en personas no obesas. Análisis por citometría de flujo de células mononucleares purificadas por gradiente de densidad. Las células se tiñeron para detectar a la molécula CD16b. Se muestra el porcentaje de células CD16b⁺ de la región R2 provenientes de la región Singlets (100 %), tal como se describe en materiales y métodos. Imagen representativa de siete experimentos con células de personas no obesas y trece experimentos con células de personas con obesidad.

Las personas no obesas tienen 2.44 % (mediana) de LDN entre las células mononucleares (**Figura 15**) mientras que las personas obesas tienen 9.86 % (mediana) de LDN entre las células mononucleares (**Figura 15**). Estos resultados sugieren que las personas con obesidad tienen aproximadamente cinco veces más LDN que las personas no obesas.

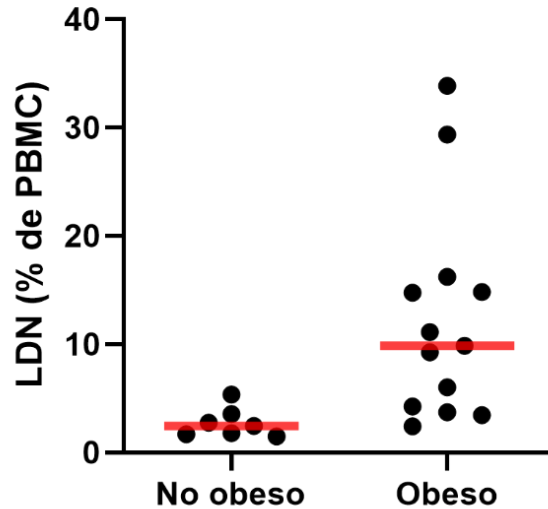


Figura 15. En la capa de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de personas obesas hay más neutrófilos de baja densidad (LDN) que en la capa PBMC de personas no obesas. Porcentaje de LDN en la capa de células mononucleares (PBMC). Las líneas horizontales rojas indica las medianas de cada grupo. Cada punto representa a un individuo. Los datos se analizaron utilizando la prueba U-Mann Whitney ($p=0.0017$).

Previamente, mostré que los LDN parecen expresar una mayor cantidad de la molécula CD16b, tanto en personas no obesas (Figura 11) como en una persona obesa (Figura 12). Para analizar con más detalle esta observación, se comparó el nivel de expresión (MFI) de CD16b en neutrófilos y en LDN de cada una de las personas que donaron sangre (**Figura 16**). La MFI para CD16b de los LDN de una persona siempre fue mayor que la MFI para CD16b de los neutrófilos de la misma persona, independientemente de si la persona tenía obesidad o no (**Figura 16**). Estos datos confirman que los LDN expresan más CD16b que los neutrófilos.

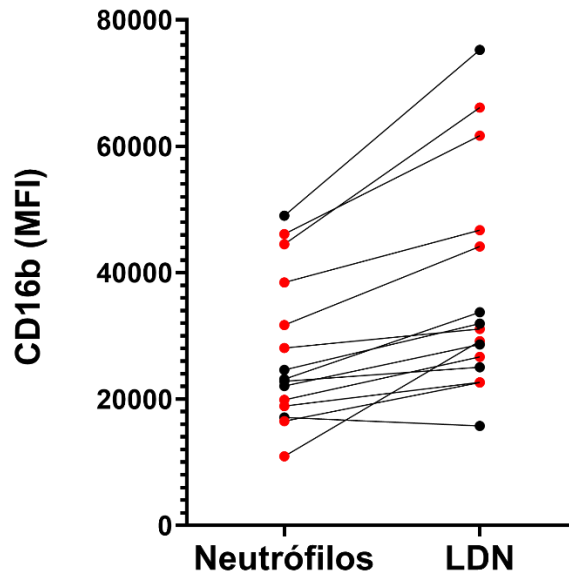


Figura 16. Los neutrófilos de baja densidad (LDN) expresan más CD16b neutrófilos de la misma persona. Neutrófilos y LDN aislados de una misma persona fueron teñidos con anticuerpos específicos para la molécula CD16b y analizados por citometría de flujo. La intensidad media de fluorescencia (MFI) de los neutrófilos y de los LDN de la misma persona están unidos por una línea. Cada punto representa a una persona. Los círculos negros representan a personas no obesas y símbolos rojos representan a personas obesas. Los datos se analizaron con la prueba de Wilcoxon ($p=0.0001$).

Discusión

Durante varios años, la población de neutrófilos fue considerada como una población celular fenotípicamente homogénea con funciones netamente microbicidas que participan en la respuesta inmunológica innata. Sin embargo, estudios más recientes indican una heterogeneidad fenotípica y funcional de los neutrófilos (Ng, Ostuni y Hidalgo, 2019). De entre el amplio espectro de posibles subpoblaciones de neutrófilos, destacan los neutrófilos de baja densidad (LDN) debido a que aparecen en mayor número en diversas condiciones patológicas como inflamación crónica, inmunosupresión y cáncer (Rosales, 2018). Los neutrófilos de baja densidad están definidos como neutrófilos que se encuentran en la capa de células mononucleares obtenida después de la separación de leucocitos sanguíneos por centrifugación en un gradiente de densidad. Aunque el término “neutrófilos de baja densidad” se utiliza comúnmente para definir a una posible subpoblación de neutrófilos, este, en realidad abarca a su vez a una diversidad de neutrófilos con distintas características fenotípicas y funcionales que varían en morfología, estado de maduración y de activación dependiendo de la enfermedad o condición subyacente en la que fueron identificados (Scapini et al., 2016).

Sin embargo, hasta el momento no existen reportes que describan y caractericen a la población de LDN en obesidad. Por este motivo, en el presente trabajo se analizaron los leucocitos sanguíneos de personas obesas para poder identificar e inmunofenotipificar y cuantificar a los LDN. Los leucocitos sanguíneos se separaron por centrifugación en Ficoll, tal y como se ha realizado previamente (García-García et al., 2013). Desafortunadamente, no existe un marcador específico que permita distinguir a los neutrófilos de otros leucocitos. Por lo que a menudo se utiliza una combinación de dos o más marcadores celulares que permitan identificar a los neutrófilos. Por ese motivo, primero se realizó la inmunofenotipificación utilizando un panel de anticuerpos que reconocen las moléculas CD16b, CD11b, CD15, CD14 y CD66b, presentes en la superficie de neutrófilos, para identificar adecuadamente a los LDN.

i) Identificación de LDN en obesidad

Los neutrófilos puros de una persona obesa (IMC > 30 kg/m²) se analizaron por citometría de flujo y se establecieron los parámetros que permitirían identificar a los LDN, tal y como se detalla en la sección de métodos (**Figura 4**). La expresión de las moléculas de superficie de los neutrófilos analizados permite sugerir que la mayoría de los neutrófilos de una persona obesa (**Figura 8**) son neutrófilos maduros. Los neutrófilos maduros poseen un fenotipo CD16b⁺CD66b⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁺ como se ha reportado con anterioridad (Lakschevitz et al., 2016). Al analizar a las células de la capa de células mononucleares, se encontró que hay células que comparten características morfológicas (tamaño y granularidad) con los neutrófilos y además expresan las mismas moléculas de superficie que los neutrófilos puros (**Figura 9**), por lo tanto, en el presente trabajo se identifican por primera vez a los LDN en la sangre de personas obesas. La expresión de las moléculas de superficie de los LDN indica que la población LDN de las personas obesas está compuesta principalmente de neutrófilos maduros. Sin embargo, esto debe ser tomado con cautela ya que este resultado se obtuvo al analizar a los LDN de sangre de sólo una persona obesa. Además, el estado de maduración de los neutrófilos y los LDN también debe ser confirmado mediante el análisis de la morfología del núcleo y el contenido de los gránulos citoplasmáticos en estas células. Diferentes reportes sugieren que la población de LDN es heterogénea, e incluye neutrófilos maduros e inmaduros (Brandau et al., 2011; Darcy et al., 2014). El ambiente inflamatorio crónico que se asocia a la obesidad podría inducir una granulopoyesis de emergencia. La granulopoyesis de emergencia y el aumento de factores quimioatrayentes de neutrófilos en circulación sanguínea inducen generación *de novo* de neutrófilos, así como también, la liberación de progenitores de neutrófilos y neutrófilos inmaduros a circulación sanguínea en obesidad (Bowers & Singer, 2021). Los precursores de neutrófilos tienen una densidad menor que los neutrófilos (J B Cowland & Borregaard, 1999). Entonces, en casos de inflamación sistémica, como en obesidad, es posible que la población de LDN también esté compuesta por neutrófilos inmaduros. Por esta razón, es necesario que en futuras investigaciones se realice un análisis más exhaustivo que permita concluir con mayor certeza el fenotipo/fenotipos de los LDN de personas obesas.

El receptor de inmunoglobulinas FcγRIIIb (CD16b) es una molécula que se expresa exclusivamente en neutrófilos y afortunadamente el anticuerpo anti-CD16b (clon CLB-gran11.5) se volvió comercialmente disponible recientemente. Después de haber caracterizado a los neutrófilos e identificado a los LDN con el panel completo de anticuerpos, se notó efectivamente que las células CD16b⁺, en su totalidad, expresan las moléculas de superficie de neutrófilos. Por lo tanto, CD16b puede ser utilizado por sí solo para identificar neutrófilos humanos. Vale la pena mencionar que, el alto nivel de expresión de CD16b en los LDN de personas obesas y personas de peso normal (**Figura 16**) sugiere que los LDN poseen fenotipo de neutrófilo maduro. Sin embargo, si se examina más detalladamente los datos de neutrófilos y de LDN obtenidos por citometría de flujo, (**Figuras 13 y 14**) se puede notar que existen células que no caen en la región R2, correspondiente a las células CD16b⁺, y que por tanto fueron excluidas del análisis. Sin embargo, no se puede descartar que estas células sean neutrófilos o LDN, ya que caen en R1. Es decir, comparten las características morfológicas de los neutrófilos. Aunque, CD16b se utiliza comúnmente para determinar el estado de maduración de los neutrófilos, la activación de los mismos puede provocar que la expresión de estos receptores de superficie se pierda (Middelhoven et al., 2001). Entonces, CD16b por sí solo, si permite identificar a los neutrófilos, sin embargo, es necesario utilizar un panel más extenso de marcadores celulares que permitan analizar en su totalidad a la población de neutrófilos y LDN, sin excluir a aquellos que no expresen CD16b como, los neutrófilos inmaduros y los neutrófilos activados. Al usar un panel más extenso se podrá estudiar si los LDN en personas obesas representan una población homogénea o si existen diferencias en su fenotipo.

ii) LDN en personas de peso normal/saludables

El enfoque principal de los reportes de LDN disponibles hasta la fecha, ha sido estudiar cómo los LDN se ven o se comportan en ciertas patologías. Por esto, a menudo no se reportan las características y la cantidad de LDN que están presentes en la capa de células mononucleares obtenida de los individuos de los grupos control. Estos individuos son por lo general personas saludables. Por este motivo, ha surgido la idea errónea de que los LDN son células que están presentes sólo en condiciones patológicas. Sin embargo,

recientemente se ha brindado más atención al estudio del fenotipo y funcionalidad de los LDN en condiciones fisiológicas normales (Hassani et al., 2020; Köstlin et al., 2014). En el presente trabajo analizamos a las células de la capa de células mononucleares de personas de peso normal ($IMC < 30 \text{ kg/m}^2$) por citometría de flujo. Así, se observó que en la capa de células mononucleares existen células que comparten las mismas características de dispersión de luz en FSC y SSC que los neutrófilos. Es decir, encontramos que en la capa de células mononucleares de personas de peso normal existen células que comparten las características de tamaño y granularidad de los neutrófilos. Estas características permitieron que las células mononucleares (linfocitos y monocitos) fueran excluidos del análisis. Además, se encontró que en la capa de células mononucleares hay células que expresan las moléculas CD16b, CD66b, CD11b, CD15 y CD14. Estas moléculas son características de los neutrófilos maduros y por tanto entre las células mononucleares hay células que expresan las moléculas de superficie de los neutrófilos maduros. Previamente se reportó que los LDN de personas saludable poseen el fenotipo de neutrófilo maduro (Blanco et al., 2021), por lo que no es una sorpresa que los resultados presentados en el presente trabajo confirmen la presencia de LDN en personas de peso normal (**Figura 7**).

iii) Relevancia de la sobreexpresión de CD66b en obesidad

Al analizar los niveles de expresión de las moléculas, se encontró que tanto los neutrófilos como los LDN de la persona obesa expresan más CD66b que lo encontrado en las personas de peso normal (**Figura 12**). CD66b es una glicoproteína de membrana anclada a glicosilfosfatidilinositol. CD66b está envuelta en la interacción homotípica entre neutrófilos y la activación de los neutrófilos provoca que aumente la expresión de CD66b en la membrana plasmática. Así mismo, la activación de los neutrófilos induce que CD66b se libere al medio extracelular por degranulación de los gránulos específicos (Schmidt et al., 2012). Entonces, el aumento de la expresión de CD66b en la membrana de los neutrófilos de la persona obesa sugiere que la obesidad podría provocar la activación de los neutrófilos. Aunque todavía se desconocen los posibles mecanismos, esta idea se ve respaldada por reportes previos que indican un incremento en la expresión del gen que codifica para CD66b en neutrófilos de hombres adultos obesos (Xu et al., 2015) y que en el plasma de personas obesas hay una mayor cantidad de CD66b que en el plasma de las personas

delgadas (Nijhuis et al., 2009). El incremento de la expresión de CD66b en neutrófilos también se ha observado en personas con diabetes mellitus tipo II con hiperglucemia (Horvath et al., 2013). Por este motivo, en estudios posteriores se podría evaluar si aumento en la expresión de CD66b en neutrófilos y LDN de personas obesas está relacionado con los niveles de glucosa en sangre.

Asimismo, es en pacientes sépticos se ha observado una la sobreexpresión de CD66b (Muller Kobold et al., 2000) lo que podría provocar la formación de los agregados de neutrófilos descritos en pacientes sépticos (Schmidt et al., 2012). Además, modelos *in vitro* han demostrado que la sobreexpresión de CD66b en respuesta a la activación de los neutrófilos por incubación con *Staphylococcus aureus*, está inversamente relacionada con la cantidad de neutrófilos fagocíticos y la capacidad fagocítica de los mismos (Schmidt et al., 2015). Es decir que la sobreexpresión de CD66b parece relacionarse con la disminución de la actividad y capacidad fagocítica de los neutrófilos. La fagocitosis deficiente de los neutrófilos en pacientes sépticos estaría ligada a una mala prognosis de la enfermedad (Schmidt et al., 2012). Estas observaciones son relevantes en el contexto de obesidad, ya que las personas obesas son más susceptibles a infecciones (Schmidt et al., 2012). Por lo tanto, en futuras investigaciones resultaría interesante investigar si la sobreexpresión de CD66b en los neutrófilos y LDN de las personas obesas está relacionada con la actividad y capacidad fagocítica de los neutrófilos y sus posibles consecuencias en la susceptibilidad a infecciones observada en personas obesas.

iv) Posible origen de los LDN en obesidad

En cuanto al origen de los LDN, se piensa que la activación y posterior degranulación de los neutrófilos conduce a la disminución de su densidad celular, posiblemente provocada por la pérdida de contenido de los gránulos citoplasmáticos (Pember et al., 1983). Por lo tanto, los neutrófilos activados/degranulados co-purifican con las células mononucleares al realizar la purificación de leucocitos. Aunque todavía, todavía no existe evidencia directa que describa a este proceso *in vivo*, se ha observado que los LDN de pacientes con adenocarcinoma de pulmón avanzado, expresan niveles más altos de los marcadores de activación y degranulación CD66b y CD11b que los neutrófilos de la misma persona (Liu et al., 2017). De la misma forma nosotros encontramos que los LDN de la persona obesa

expresan más CD66b y CD11b que los neutrófilos de la misma persona (**Figura 11**) por lo que los LDN identificados en la persona obesa persona podrían ser neutrófilos activados/degranulados que perdieron su densidad. A diferencia de lo encontrado en la persona obesa, los niveles de expresión de CD66b y CD11b de los neutrófilos y LDN de las personas de peso normal son muy similares. Por lo que es probable que los LDN de personas obesas tengan un origen distinto al de los LDN de personas saludables.

v) **Incremento del número de neutrófilos y LDN en obesidad**

En la obesidad, los neutrófilos son probablemente las primeras células del sistema inmunológico en infiltrar al tejido adiposo en respuesta a una dieta alta en grasas (Talukdar et al., 2012). Además, los neutrófilos infiltrantes en el tejido adiposo obeso parecen contribuir a la inflamación del tejido y al desarrollo de resistencia a la insulina (Soehnlein et al., 2017). Se ha propuesto que la obesidad está relacionada con el aumento de la expresión de genes que codifican para elastasa y mieloperoxidasa de los neutrófilos (Xu et al., 2015). Sin embargo, todavía se desconoce las posibles causas e implicaciones de estas observaciones en la patogénesis de la obesidad. Por otro lado, recientemente se describió que la obesidad conduce a un deterioro de la integridad vascular debido a la actividad de los neutrófilos (McDowell et al., 2021). El deterioro de la integridad vascular observado parece estar relacionado con el estrés oxidativo de los neutrófilos.

La inflamación crónica de bajo grado que acompaña a la obesidad da como resultado niveles elevados de citocinas, principalmente IL-6 e IL-8, y adipocinas como la leptina, que pueden inducir el aumento de neutrófilos en circulación a través de diferentes mecanismos, como el aumento de la granulopoyesis en la médula ósea, la aceleración de la liberación de neutrófilos de la médula ósea y movilizar a los neutrófilos intravasculares de comportamiento marginal (Purdy & Shatzel, 2021). En el presente trabajo se encontró que se obtienen 1.6 veces más neutrófilos de sangre de personas obesas que de personas de peso normal (**Figura 5**). Este resultado, concuerda con la evidencia actual que sugiere que la obesidad va acompañada del incremento en el número de neutrófilos en circulación sanguínea (Herishanu et al., 2006; Xu et al., 2015) y que existe una correlación positiva entre el índice de masa corporal y el número de neutrófilos sanguíneos (Dixon & O'Brien, 2006). Sin embargo, la causa del incremento de neutrófilos circulantes en personas obesas

todavía se desconoce. Se ha sugerido que la cantidad de neutrófilos en circulación descritos en obesidad puede ser el resultado del incremento de la producción de G-CSF en la médula ósea provocando así aumento de la granulopoyesis (do Carmo et al., 2013). Además, se ha encontrado que las personas obesas tienen altos niveles de leptina circulante (Izquierdo et al., 2019). La leptina puede actuar como estimulador de la granulopoyesis (Claycombe et al., 2008) y por lo tanto podría estar relacionada con el aumento de neutrófilos en circulación sanguínea en personas obesas.

Por otro lado, diferentes estudios demuestran que la cantidad de LDN aumenta en diferentes condiciones patológicas, especialmente en inflamación crónica, cáncer e inmunosupresión (Rosales, 2018). Debido a que la obesidad se caracteriza por inflamación crónica de bajo grado era de esperarse que la cantidad de LDN en sangre de personas obesas también aumente. Efectivamente, encontramos que los LDN de las personas obesas constituyen aproximadamente el 10% de las células mononucleares (**Figura 15**), lo que representa un porcentaje aproximadamente cinco veces más grande que el porcentaje de LDN encontrado en la sangre de personas de peso normal. Se han obtenido resultados similares en estudios de neutrófilos y LDN en otras condiciones inflamatorias, como en asma (Fu et al., 2014b), psoriasis (Janols et al., 2014) y lupus (Denny et al., 2010). Ahora bien, debido a que actualmente se desconoce el origen de los LDN, no se puede asegurar que el aumento de la cantidad de LDN sea independiente del incremento global de neutrófilos. Bajo el supuesto de la hipótesis de los LDN con fenotipo de neutrófilo activado/degranulado, se puede predecir que la cantidad de LDN en obesidad dependerá del número de neutrófilos liberados de la médula ósea a circulación. Por este motivo, sería interesante evaluar si en obesidad la cantidad de neutrófilos en circulación se relaciona a la cantidad de LDN con fenotipo de neutrófilo activado/degranulado (CD66b⁺CD11b⁺).

vi) Funcionalidad de los LDN

La capacidad funcional de los LDN, en individuos saludables, se ha reportado que tienen una mayor capacidad fagocítica, producen más ROS y son capaces de producir NET de manera similar a los neutrófilos (Blanco et al., 2021). Además, algunos estudios sugieren que los LDN identificados en ciertas patologías presentan un fenotipo proinflamatorio (Denny et al., 2010; Grayson et al., 2015; Lin et al., 2011; Lood et al., 2016).

Particularmente, los LDN de personas con lupus tienen una mayor capacidad para liberar NET, a diferencia de los reportado en individuos saludables, y además liberan más citocinas proinflamatorias como IFN- γ y TNF- α , que los neutrófilos de densidad “normal” de personas sanas (Denny et al., 2010). Sin embargo, todavía no está claro hasta qué punto las propiedades proinflamatorias de los LDN en lupus son propias de estas células, porque se ha demostrado que los neutrófilos de densidad “normal” de personas con lupus también tienen un fenotipo proinflamatorio, es decir, producen más IFN y más NET que los neutrófilos de personas sanas (Garcia-Romo et al., 2011; Van Avondt et al., 2013). Por lo tanto, sería muy importante investigar si los LDN con características proinflamatorias son neutrófilos funcionalmente diferentes a los neutrófilos de densidad “normal” autólogos. Por otro lado, algunos estudios demuestran que los LDN poseen un fenotipo inmunosupresor (Cloke et al., 2012; Darcy et al., 2014; Köstlin et al., 2014; Marini et al., 2016). Se han reportado LDN inmunosupresores en cáncer, infección por VIH y sepsis. La actividad inmunosupresora de los LDN se basa en su capacidad de sobreproducir arginasa-1 y ROS. Se ha visto que de esta manera los LDN suprimen la respuesta de las células T, ya sea inhibiendo su proliferación o la producción de IFN γ . Por tanto, parece que las funciones de los LDN varían entre las diferentes condiciones en donde se encuentran estas células. Por ese motivo, es necesario realizar ensayos funcionales con los LDN de personas obesas para poder dilucidar si los LDN poseen un papel proinflamatorio o inmunosupresor en las personas obesas.

vii) Consideraciones finales

Todavía no está claro si la baja densidad de los LDN es una característica que se determina durante el proceso de maduración o es la consecuencia de degranulación de los neutrófilos y cuál es su posible contribución a los procesos patológicos. Tampoco existe un consenso sobre el estado de maduración de los LDN. La evidencia actual apunta a que la población de LDN está compuesta de neutrófilos maduros e inmaduros. Sin embargo, existen discrepancias en los reportes y parece que el estado de maduración de los LDN depende de la condición subyacente en la que fueron identificados. Teniendo esto en cuenta, es necesario desarrollar nuevos enfoques experimentales que permitan una separación precisa y una caracterización cuidadosa de los LDN para poder determinar su estado de

maduración. La mayoría de estudios funcionales de los LDN publicados hasta el momento se han realizado utilizando las células CD66b⁺ aisladas de la capa de células mononucleares, con una pureza declarada de más de 95%. Por lo tanto, es probable que en la población de LDN existan eosinófilos, precursores de granulocitos y neutrófilos inmaduros, así como también algunos monocitos y linfocitos contaminantes. Es importante tener esto en cuenta, ya que puede dar lugar a resultados falsos positivos, especialmente cuando se evalúa la capacidad funcional de los neutrófilos. La pureza de los LDN aislados es necesaria para una correcta evaluación sus características fenotípicas y funcionales. De esta forma, se podría confirmar que los LDN son en realidad una subpoblación de neutrófilos, que muestran fenotipo y funciones específicas.

Los resultados presentados y los estudios discutidos en el presente trabajo atestiguan el interés por comprender mejor el fenómeno de la heterogeneidad de la población de neutrófilos y su relevancia fisiológica. Es necesaria una caracterización más profunda de los LDN para poder identificar cómo estas células interactúan con otras células y cuál es su posible participación en la respuesta inmunológica. Nuestros hallazgos, aunque claramente preliminares, basados en tamaño de muestra pequeño, pueden tener cierta relevancia conceptual que podría traducirse, si se confirma mediante ensayos a mayor escala, al manejo clínico de personas con obesidad. Además, debido a que se observó que el número de LDN aumenta en obesidad, así como también se ha observado en otras condiciones, resulta interesante examinar el potencial de los LDN como indicadores en la prognosis de la obesidad.

Conclusiones

- Se obtienen 1.6 veces más neutrófilos de la sangre de personas obesas que de personas de peso normal. Lo que sugiere que las personas obesas tienen más neutrófilos en circulación sanguínea que las personas de peso normal.
- En personas no obesas los LDN constituyen 2% de células de la capa de células mononucleares mientras que en personas obesas los LDN constituyen el 10%. Por lo tanto, la obesidad podría estar relacionada con un incremento de LDN en sangre, así como lo reportado en otras condiciones inflamatorias crónicas.
- Los LDN tanto de personas obesas como de personas de peso normal expresan más CD16b que los neutrófilos de la misma persona. Lo que indica que los LDN posiblemente tienen un fenotipo diferente que los neutrófilos independientemente del IMC de las personas.
- Tanto los LDN como los neutrófilos de una persona obesa expresan más CD66b que los LDN y los neutrófilos de una persona de peso normal. El aumento de la expresión de CD66b en la membrana de los neutrófilos de la persona obesa sugiere que la obesidad podría provocar la activación de los neutrófilos.

Perspectivas

Aunque la expresión de CD16b parece ser suficiente para identificar a los neutrófilos maduros, todavía es incierto si la población de LDN en personas obesas es una población homogénea. Además, la activación de los neutrófilos podría inducir la pérdida de la expresión de CD16b en la membrana plasmática. Entonces, es necesario realizar una inmunofenotipificación con el panel de anticuerpos completo (CD16b CD66b, CD11b, CD14, CD15), además, se recomienda incluir como marcador de maduración a la molécula CD10. De esta forma, se podrán analizar diferencias en la expresión de las moléculas de superficie e identificar adecuadamente a la población de LDN sin excluir a aquellos que no expresen CD16b como, los neutrófilos inmaduros y los neutrófilos activados.

Actualmente se desconoce el papel que desempeñan los LDN en obesidad. Por lo tanto, se requiere evaluar la capacidad funcional (fagocitosis, producción de ROS, producción de NET, degranulación, producción/liberación de citocinas) de los LDN de personas obesas para poder investigar si los LDN poseen un papel proinflamatorio o inmunosupresor en las personas obesas y el posible impacto clínico.

La cantidad de LDN comúnmente incrementa con la severidad de las enfermedades, por lo resulta interesante investigar si esto también ocurre en obesidad. Por lo mismo, se pretende cuantificar a los LDN de personas con obesidad grado I, obesidad grado II y obesidad grado III, para establecer si existe una relación positiva entre el grado de obesidad y la cantidad de LDN en circulación sanguínea. Además, se aspira a evaluar las características fenotípicas y funcionales de los LDN de las personas con diferentes grados de obesidad para determinar si dichas características están relacionadas con el grado de obesidad.

Referencias

- Adrover, J. M., Nicolás-Ávila, J. A., & Hidalgo, A. (2016). Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils. *Trends in Immunology*, 37(5), 334–345. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.03.005>
- Aronson, D., Bartha, P., Zinder, O., Kerner, A., Markiewicz, W., Avizohar, O., Brook, G. J., & Levy, Y. (2004). Obesity is the major determinant of elevated C-reactive protein in subjects with the metabolic syndrome. *International Journal of Obesity*, 28(5), 674–679. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802609>
- Bardoel, B. W., Kenny, E. F., Sollberger, G., & Zychlinsky, A. (2014). The Balancing Act of Neutrophils. *Cell Host & Microbe*, 15(5), 526–536. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.04.011>
- Bardou, M., Barkun, A. N., & Martel, M. (2013). Obesity and colorectal cancer. *Gut*, 62(6), 933–947. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-304701>
- Bhupathiraju, S. N., & Hu, F. B. (2016). Epidemiology of obesity and diabetes and their cardiovascular complications. *Circulation Research*, 118(11), 1723–1735. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306825>
- Blanco, C., Alemán, O. R., & Rosales, C. (2021). Low-Density Neutrophils in Healthy Individuals Display a Mature Primed Phenotype. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.672520>
- Boden, G. (2008). Obesity and Free Fatty Acids. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 37(3), 635–646. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2008.06.007>
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* 33(5), 657–670. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011>
- Bowers, E., & Singer, K. (2021). Obesity-induced inflammation: The impact of the hematopoietic stem cell niche. *JCI Insight* 6(3). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.145295>
- Brandau, S., & Hartl, D. (2017). Lost in neutrophil heterogeneity? CD10!. *Blood* 129(10), 240–241. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-01-761585>
- Brandau, S., Trellakis, S., Bruderek, K., Schmaltz, D., Steller, G., Elian, M., Suttman, H., Schenck, M., Welling, J., Zabel, P., & Lang, S. (2011). Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(2), 311–317. <https://doi.org/https://doi.org/10.1189/jlb.0310162>
- Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S. E., Wang, Q., Gutierrez, M. G., Brown, G. D., & Papayannopoulos, V. (2014). Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nature Immunology*,

15(11), 1017–1025. <https://doi.org/10.1038/ni.2987>

- Bratton, D. L., & Henson, P. M. (2011). Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends in Immunology*, 32(8), 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.04.009>
- Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin?. *Journal of Cell Biology* 198(5), 773–783. <https://doi.org/10.1083/jcb.201203170>
- Caballero, A. E. (2003). Endothelial Dysfunction in Obesity and Insulin Resistance: A Road to Diabetes and Heart Disease. *Obesity Research*, 11(11), 1278–1289. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/oby.2003.174>
- Cain, D. W., Snowden, P. B., Sempowski, G. D., & Kelsoe, G. (2011). Inflammation Triggers Emergency Granulopoiesis through a Density-Dependent Feedback Mechanism. *PLOS ONE*, 6(5), e19957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019957>
- Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L. A., Nombela-Arrieta, C., Chèvre, R., A-González, N., Kunisaki, Y., Zhang, D., Van Rooijen, N., Silberstein, L. E., Weber, C., Nagasawa, T., Frenette, P. S., Castrillo, A., & Hidalgo, A. (2013). XRhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell*, 153(5), 1025. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.040>
- Castoldi, A., Naffah de Souza, C., Câmara, N. O. S., & Moraes-Vieira, P. M. (2016). The Macrophage Switch in Obesity Development. *Frontiers in Immunology*, 6, 637. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00637>
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 SUPPL. 2), S3–S23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>
- Chiffolleau, E. (2018). C-type lectin-like receptors as emerging orchestrators of sterile inflammation represent potential therapeutic targets. *Frontiers in Immunology*, 9(FEB), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00227>
- Chylikova, J., Dvorackova, J., Tauber, Z., & Kamarad, V. (2018). M1/M2 macrophage polarization in human obese adipose tissue. *Biomedical Papers*, 162(2), 79–82. <https://doi.org/10.5507/bp.2018.015>
- Claycombe, K., King, L. E., & Fraker, P. J. (2008). A role for leptin in sustaining lymphopoiesis and myelopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), 2017–2021. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712053105>
- Cloke, T., Munder, M., Taylor, G., Müller, I., & Kropf, P. (2012). Characterization of a Novel Population of Low-Density Granulocytes Associated with Disease Severity in HIV-1 Infection. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048939>
- Costa, S., Bevilacqua, D., Cassatella, M. A., & Scapini, P. (2019). Recent advances on the crosstalk between neutrophils and B or T lymphocytes. *Immunology*, 156(1), 23–32.

<https://doi.org/10.1111/imm.13005>

- Cowland, J B, & Borregaard, N. (1999). Isolation of neutrophil precursors from bone marrow for biochemical and transcriptional analysis. *Journal of Immunological Methods*, 232(1–2), 191–200. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(99\)00176-3](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(99)00176-3)
- Cowland, Jack B., & Borregaard, N. (2016). Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunological Reviews* 273(1), pp. 11–28. <https://doi.org/10.1111/imr.12440>
- Darcy, C. J., Minigo, G., Piera, K. A., Davis, J. S., McNeil, Y. R., Chen, Y., Volkheimer, A. D., Weinberg, J. B., Anstey, N. M., & Woodberry, T. (2014). Neutrophils with myeloid derived suppressor function deplete arginine and constrain T cell function in septic shock patients. *Critical Care*, 18(4). <https://doi.org/10.1186/cc14003>
- Denny, M. F., Yalavarthi, S., Zhao, W., Thacker, S. G., Anderson, M., Sandy, A. R., McCune, W. J., & 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. *The Journal of Immunology*, 184(6), 3284–3297. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902199>
- Després, J.-P., & Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, 444(7121). <https://doi.org/10.1038/nature05488>
- Dinauer, M. C. (2016). Primary immune deficiencies with defects in neutrophil function. *Hematology*, 2016(1), 43–50. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.43>
- Dixon, J. B., & O'Brien, P. E. (2006). Obesity and the white blood cell count: Changes with sustained weight loss. *Obesity Surgery*, 16(3), 251–257. <https://doi.org/10.1381/096089206776116453>
- do Carmo, L. S., Rogero, M. M., Paredes-Gamero, E. J., Nogueira-Pedro, A., Xavier, J. G., Cortez, M., Borges, M. C., Fujii, T. M., Borelli, P., & Fock, R. A. (2013). A high-fat diet increases interleukin-3 and granulocyte colony-stimulating factor production by bone marrow cells and triggers bone marrow hyperplasia and neutrophilia in wistar rats. *Experimental Biology and Medicine*, 238(4), 375–384. <https://doi.org/10.1177/1535370213477976>
- Eder, K., Baffy, N., Falus, A., & Fulop, A. K. (2009). The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflammation Research* 58(11), 727–736. <https://doi.org/10.1007/s00011-009-0060-4>
- Ekman, A. K., & Cardell, L. O. (2010). The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. *Immunology*, 130(1), 55–63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03212.x>
- Elghetany, M. T. (2002). Surface antigen changes during normal neutrophilic development: A critical review. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 28(2), 260–274. <https://doi.org/10.1006/bcmd.2002.0513>

- Engin, A. (2017). Obesity-associated breast cancer: Analysis of risk factors. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 960, 571–606. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_25
- Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A. J., & Paquot, N. (2014). Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 105(2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2014.04.006>
- Evrard, M., Kwok, I. W. H., Chong, S. Z., Teng, K. W. W., Becht, E., Chen, J., Sieow, J. L., Penny, H. L., Ching, G. C., Devi, S., Adrover, J. M., Li, J. L. Y., Liong, K. H., Tan, L., Poon, Z., Foo, S., Chua, J. W., Su, I.-H., Balabanian, K., & Ng, L. G. (2018). Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions. *Immunity*, 48(2). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.02.002>
- Faurschou, M., & Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection* 5(14) 1317–1327. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.008>
- Fu, J., Tobin, M. C., & Thomas, L. L. (2014a). Neutrophil-like low-density granulocytes are elevated in patients with moderate to severe persistent asthma. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 113(6), 635-640.e2. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2014.08.024>
- Fu, J., Tobin, M. C., & Thomas, L. L. (2014b). Neutrophil-like low-density granulocytes are elevated in patients with moderate to severe persistent asthma. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 113(6), 635-640.e2. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2014.08.024>
- Gabrilovich, D. (2013). *The Neutrophils* (Third). IMPERIAL COLLEGE PRESS. <https://doi.org/10.1142/p823>
- García-García, E., Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2013). A simple and efficient method to detect nuclear factor activation in human neutrophils by flow cytometry. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 74. <https://doi.org/10.3791/50410>
- Garcia-Romo, G. S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., Punaro, M., Baisch, J., Guiducci, C., Coffman, R. L., Barrat, F. J., Banchereau, J., & Pascual, V. (2011). Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Science Translational Medicine*, 3(73). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001201>
- Grayson, P. C., Carmona-Rivera, C., Xu, L., Lim, N., Gao, Z., Asare, A. L., Specks, U., Stone, J. H., Seo, P., Spiera, R. F., Langford, C. A., Hoffman, G. S., Kallenberg, C. G. M., St. Clair, E. W., Tchao, N. K., Ytterberg, S. R., Phippard, D. J., Merkel, P. A., Kaplan, M. J., & Monach, P. A. (2015). Neutrophil-related gene expression and low-density granulocytes associated with disease activity and response to treatment in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis and Rheumatology*, 67(7), 1922–1932. <https://doi.org/10.1002/art.39153>

- Hacbarth, E., & Kajdacsy-Balla, A. (1986). Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever. *Arthritis & Rheumatism*, 29(11), 1334–1342. <https://doi.org/10.1002/art.1780291105>
- Hassani, M., Hellebrekers, P., Chen, N., van Aalst, C., Bongers, S., Hietbrink, F., Koenderman, L., & Vrisekoop, N. (2020). On the origin of low-density neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 107(5), 809–818. <https://doi.org/10.1002/JLB.5HR0120-459R>
- Hassanpour, S., Lakschevitz, F. S., Fine, N., Glogauer, J., Batistella, E., Tanwir, F., & Glogauer, M. (2016). Role of low density neutrophils in human health and disease. *Trends in Cell and Molecular Biology*, 11, 1–17.
- Herishanu, Y., Rogowski, O., Polliack, A., & Marilus, R. (2006). Leukocytosis in obese individuals: Possible link in patients with unexplained persistent neutrophilia. *European Journal of Haematology*, 76(6), 516–520. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2006.00658.x>
- Horvath, P., Oliver, S. R., Ganesan, G., Zaldivar, F. P., Radom-Aizik, S., & Galasseti, P. R. (2013). Fasting glucose level modulates cell surface expression of CD11b and CD66b in granulocytes and monocytes of patients with type 2 diabetes. *Journal of Investigative Medicine*, 61(6), 972–977. <https://doi.org/10.2310/JIM.0b013e3182961517>
- Hyun, K. K., De La Luz Sierra, M., Williams, C. K., Gulino, A. V., & Tosato, G. (2006). G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells. *Blood*, 108(3), 812–820. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-4162>
- Izquierdo, A. G., Crujeiras, A. B., Casanueva, F. F., & Carreira, M. C. (2019). Leptin, obesity, and leptin resistance: where are we 25 years later? *Nutrients* 11(11). <https://doi.org/10.3390/nu11112704>
- Janols, H., Bergenfelz, C., Allaoui, R., Larsson, A.-M., Rydén, L., Björnsson, S., Janciauskiene, S., Wullt, M., Bredberg, A., & Leandersson, K. (2014). A high frequency of MDSCs in sepsis patients, with the granulocytic subtype dominating in gram-positive cases. *Journal of Leukocyte Biology*, 96(5), 685–693. <https://doi.org/10.1189/jlb.5hi0214-074r>
- Köstlin, N., Kugel, H., Spring, B., Leiber, A., Marmé, A., Henes, M., Rieber, N., Hartl, D., Poets, C. F., & Gille, C. (2014). Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses. *European Journal of Immunology*, 44(9), 2582–2591. <https://doi.org/10.1002/eji.201344200>
- La Manna, M. P., Orlando, V., Paraboschi, E. M., Tamburini, B., Di Carlo, P., Cascio, A., Asselta, R., Dieli, F., & Caccamo, N. (2019). Mycobacterium tuberculosis Drives Expansion of Low-Density Neutrophils Equipped With Regulatory Activities. *Frontiers in Immunology*, 10, 2761. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02761>

- Lacy, P. (2006). Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 2(3), 98. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-2-3-98>
- Lakschevitz, F. S., Hassanpour, S., Rubin, A., Fine, N., Sun, C., & Glogauer, M. (2016). Identification of neutrophil surface marker changes in health and inflammation using high-throughput screening flow cytometry. *Experimental Cell Research*, 342(2), 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.03.007>
- LeBien, T. W., & McCormack, R. T. (1989). The common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10). Emancipation from a functional enigma. *Blood* 73(3), 625–635. <https://doi.org/10.1182/blood.v73.3.625.625>
- Lee, B. C., & Lee, J. (2014). Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 1842(3), 446–462. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.017>
- Lee, W. L., Harrison, R. E., & Grinstein, S. (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection*, 5(14), 1299–1306. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.014>
- Lerchenberger, M., Uhl, B., Stark, K., Zuchtriegel, G., Eckart, A., Miller, M., Pühr-Westerheide, D., Praetner, M., Rehberg, M., Khandoga, A. G., Lauber, K., Massberg, S., Krombach, F., & Reichel, C. A. (2013). Matrix metalloproteinases modulate ameboid-like migration of neutrophils through inflamed interstitial tissue. *Blood*, 122(5), 770–780. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-472944>
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology* 7(9), 678–689. <https://doi.org/10.1038/nri2156>
- Li, R. H. L., & Tablin, F. (2018). A comparative review of neutrophil extracellular traps in sepsis. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00291>
- Lin, A. M., Rubin, C. J., Khandpur, R., Wang, J. Y., Riblett, M., Yalavarthi, S., Villanueva, E. C., Shah, P., Kaplan, M. J., & Bruce, A. T. (2011). Mast Cells and Neutrophils Release IL-17 through Extracellular Trap Formation in Psoriasis. *The Journal of Immunology*, 187(1), 490–500. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100123>
- Liu, M., Chen, K., Yoshimura, T., Liu, Y., Gong, W., Wang, A., Gao, J. L., Murphy, P. M., & Wang, J. M. (2012). Formylpeptide receptors are critical for rapid neutrophil mobilization in host defense against *Listeria monocytogenes*. *Scientific Reports*, 2, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep00786>
- Lood, C., Blanco, L. P., Purmalek, M. M., Carmona-Rivera, C., De Ravin, S. S., Smith, C. K., Malech, H. L., Ledbetter, J. A., Elkon, K. B., & Kaplan, M. J. (2016). Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nature Medicine*, 22(2), 146–153. <https://doi.org/10.1038/nm.4027>

- Manz, M. G., & Boettcher, S. (2014). Emergency granulopoiesis. *Nature Reviews Immunology*, 14(5), 302–314. <https://doi.org/10.1038/nri3660>
- Marini, O., Spina, C., Mimiola, E., Cassaro, A., Malerba, G., Todeschini, G., Perbellini, O., Scupoli, M., Carli, G., Facchinelli, D., Cassatella, M., Scapini, P., & Tecchio, C. (2016). Identification of granulocytic myeloid-derived suppressor cells (G-MDSCs) in the peripheral blood of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma patients. *Oncotarget*, 7(19), 27676–27688. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8507>
- Mayadas, T. N., Cullere, X., & Lowell, C. A. (2014). The multifaceted functions of neutrophils. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9(1), 181–218. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-164023>
- McCormack, R. T., Nelson, R. D., & LeBien, T. W. (1986). Structure/function studies of the common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA/CD10) expressed on human neutrophils. *The Journal of Immunology*, 137(3), 1075–1082. <http://www.jimmunol.org/content/137/3/1075.abstract>
- McDonald, B., & Kubes, P. (2011). Cellular and molecular choreography of neutrophil recruitment to sites of sterile inflammation. *Journal of Molecular Medicine*, 89(11), 1079–1088. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0784-9>
- McDowell, S. A. C., Luo, R. B. E., Arabzadeh, A., Doré, S., Bennett, N. C., Breton, V., Karimi, E., Rezanejad, M., Yang, R. R., Lach, K. D., Issac, M. S. M., Samborska, B., Perus, L. J. M., Moldoveanu, D., Wei, Y., Fiset, B., Rayes, R. F., Watson, I. R., Kazak, L., ... Quail, D. F. (2021). Neutrophil oxidative stress mediates obesity-associated vascular dysfunction and metastatic transmigration. *Nature Cancer*, 2(5), 545–562. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00194-9>
- McLaughlin, T., Lamendola, C., Liu, A., & Abbasi, F. (2011). Preferential Fat Deposition in Subcutaneous Versus Visceral Depots Is Associated with Insulin Sensitivity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(11). <https://doi.org/10.1210/jc.2011-0615>
- Metzemaekers, M., Gouwy, M., & Proost, P. (2020). Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. *Cellular and Molecular Immunology* 17(5), 433–450. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0412-0>
- Middelhoven, P. J., Van Buul, J. D., Hordijk, P. L., & Roos, D. (2001). Different proteolytic mechanisms involved in FcγRIIIB shedding from human neutrophils. *Clinical and Experimental Immunology*, 125(1), 169–175. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2001.01548.x>
- Miralda, I., Uriarte, S. M., & McLeish, K. R. (2017). Multiple phenotypic changes define neutrophil priming. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00217>
- Morisaki, T., Goya, T., Ishimitsu, T., & Torisu, M. (1992). The increase of low density subpopulations and CD10 (CALLA) negative neutrophils in severely infected patients.

Surgery Today, 22(4), 322–327. <https://doi.org/10.1007/BF00308740>

- Morrissey, S. M., Geller, A. E., Hu, X., Tieri, D., Cooke, E. A., Ding, C., Woeste, M., Zhang, H., Cavallazzi, R., Clifford, S. P., Chen, J., Cai, L., Kong, M., Watson, C. T., Huang, J., & Yan, J. (2020). Emergence of Low-density Inflammatory Neutrophils Correlates with Hypercoagulable State and Disease Severity in COVID-19 Patients. *medRxiv*, 2020.05.22.20106724. <https://doi.org/10.1101/2020.05.22.20106724>
- Muller Kobold, A. C., Tulleken, J. E., Zijlstra, J. G., Sluiter, W., Hermans, J., Kallenberg, C. G. M., & Cohen Tervaert, J. W. (2000). Leukocyte activation in sepsis: Correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Medicine*, 26(7), 883–892. <https://doi.org/10.1007/s001340051277>
- Nakayama, F., Nishihara, S., Iwasaki, H., Kudo, T., Okubo, R., Kaneko, M., Nakamura, M., Karube, M., Sasaki, K., & Narimatsu, H. (2001). CD15 Expression in Mature Granulocytes is Determined by α 1,3-Fucosyltransferase IX, but in Promyelocytes and Monocytes by α 1,3-Fucosyltransferase IV. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 16100–16106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007272200>
- Ng, L. G., Ostuni, R., & Hidalgo, A. (2019). Heterogeneity of neutrophils. *Nature Reviews Immunology*, 19(4). <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0141-8>
- Nguyen, M. T. A., Favelyukis, S., Nguyen, A. K., Reichart, D., Scott, P. A., Jenn, A., Liu-Bryan, R., Glass, C. K., Neels, J. G., & Olefsky, J. M. (2007). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 282(48), 35279–35292. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706762200>
- Nijhuis, J., Rensen, S. S., Slaats, Y., Van Dielen, F. M. H., Buurman, W. A., & Greve, J. W. M. (2009). Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation. *Obesity*, 17(11), 2014–2018. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.113>
- O'Brien, C. D., Lim, P., Sun, J., & Albelda, S. M. (2003). PECAM-1-dependent neutrophil transmigration is independent of monolayer PECAM-1 signaling or localization. *Blood*, 101(7), 2816–2825. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-08-2396>
- Ostendorf, L., Mothes, R., van Koppen, S., Lindquist, R. L., Bellmann-Strobl, J., Asseyer, S., Ruprecht, K., Alexander, T., Niesner, R. A., Hauser, A. E., Paul, F., & Radbruch, H. (2019). Low-Density Granulocytes Are a Novel Immunopathological Feature in Both Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02725>
- Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A., & Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, 191(3), 677–691. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006052>
- Pillay, J., Ramakers, B. P., Kamp, V. M., Loi, A. L. T., Lam, S. W., Hietbrink, F., Leenen, L. P., Tool, A. T., Pickkers, P., & Koenderman, L. (2010). Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental

- endotoxemia. *Journal of Leukocyte Biology*, 88(1), 211–220. <https://doi.org/10.1189/jlb.1209793>
- Prince, L. R., Whyte, M. K., Sabroe, I., & Parker, L. C. (2011). The role of TLRs in neutrophil activation. *Current Opinion in Pharmacology*, 11(4), 397–403. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.06.007>
- Purdy, J. C., & Shatzel, J. J. (2021). The hematologic consequences of obesity. *European Journal of Haematology*, 106(3), 306–319. <https://doi.org/10.1111/ejh.13560>
- Reilly, S. M., & Saltiel, A. R. (2017). Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nature Reviews Endocrinology* 13(11), 633–643. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.90>
- 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., & Gazzinelli, R. T. (2015). Type I Interferon Transcriptional Signature in Neutrophils and Low-Density Granulocytes Are Associated with Tissue Damage in Malaria. *Cell Reports*, 13(12), 2829–2841. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.055>
- Rosales, C. (2017). Fcγ receptor heterogeneity in leukocyte functional responses. *Frontiers in Immunology*, 8(MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00280>
- Rosales, C. (2018). Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Frontiers in Physiology*, 9(FEB). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00113>
- Rosales, C. (2020). Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 108(1), 377–396. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MIR0220-574RR>
- Rosales, C., & Uribe-Querol, E. (2019). Neutrophil Activation by Antibody Receptors. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80666>
- Rossi, B., Constantin, G., & Zenaro, E. (2020). The emerging role of neutrophils in neurodegeneration. *Immunobiology* 225(1). <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.10.014>
- Russo, L., & Lumeng, C. N. (2018). Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity. *Immunology*, 155(4), 407–417. <https://doi.org/10.1111/imm.13002>
- Scapini, P., Marini, O., Tecchio, C., & Cassatella, M. A. (2016). Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunological Reviews* 273(1), 48–60. <https://doi.org/10.1111/imr.12448>
- Schmidt, T., Brodesser, A., Schnitzler, N., Grüger, T., Brandenburg, K., Zinserling, J., & Zündorf, J. (2015). CD66b overexpression and loss of C5a receptors as surface markers for Staphylococcus aureus-induced neutrophil dysfunction. *PLoS ONE*, 10(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132703>

- Schmidt, T., Zündorf, J., Gröger, T., Brandenburg, K., Reiners, A.-L., Zinserling, J., & Schnitzler, N. (2012). CD66b overexpression and homotypic aggregation of human peripheral blood neutrophils after activation by a gram-positive stimulus. *Journal of Leukocyte Biology*, *91*(5), 791–802. <https://doi.org/10.1189/jlb.0911483>
- Semerad, C. L., Liu, F., Gregory, A. D., Stumpf, K., & Link, D. C. (2002). G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity*, *17*(4), 413–423. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00424-7)
- Sengeløv, H., Follin, P., Kjeldsen, L., Løllike, K., Dahlgren, C., & Borregaard, N. (1995). Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *154*(8), 4157–4165. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7535822>
- Shah, T. J., Leik, C. E., & Walsh, S. W. (2010). Neutrophil infiltration and systemic vascular inflammation in obese women. *Reproductive Sciences*, *17*(2), 116–124. <https://doi.org/10.1177/1933719109348252>
- Shah, V. O., Civin, C. I., & Loken, M. R. (1988). Flow cytometric analysis of human bone marrow. IV. Differential quantitative expression of T-200 common leukocyte antigen during normal hemopoiesis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *140*(6), 1861–1867.
- Silva, M. T., & Correia-Neves, M. (2012). Neutrophils and macrophages: The main partners of phagocyte cell systems. *Frontiers in Immunology*, *3*(JUL). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00174>
- Silvestre-Roig, C., Braster, Q., Ortega-Gomez, A., & Soehnlein, O. (2020). Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation. *Nature Reviews Cardiology* *17*(6), 327–340). <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0326-7>
- Soehnlein, O., Steffens, S., Hidalgo, A., & Weber, C. (2017). Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nature Reviews Immunology* *17*(4), 248–261). <https://doi.org/10.1038/nri.2017.10>
- Stark, M. A., Huo, Y., Burcin, T. L., Morris, M. A., Olson, T. S., & Ley, K. (2005). Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*, *22*(3), 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.01.011>
- Strackowski, M., Dzienis-Strackowska, S., Stêpień, A., Kowalska, I., Szelachowska, M., & Kinalska, I. (2002). Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor- α system. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *87*(10), 4602–4606. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020135>
- Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, A. M., & Chilvers, E. R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology* *31*(8), 318–324). <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.05.006>
- Talukdar, S., Oh, D. Y., Bandyopadhyay, G., Li, D., Xu, J., McNelis, J., Lu, M., Li, P.,

- Yan, Q., Zhu, Y., Ofrecio, J., Lin, M., Brenner, M. B., & Olefsky, J. M. (2012). Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nature Medicine*, *18*(9), 1407–1412. <https://doi.org/10.1038/nm.2885>
- Tamassia, N., Le Moigne, V., Rossato, M., Donini, M., McCartney, S., Calzetti, F., Colonna, M., Bazzoni, F., & Cassatella, M. A. (2008). Activation of an Immunoregulatory and Antiviral Gene Expression Program in Poly(I:C)-Transfected Human Neutrophils. *The Journal of Immunology*, *181*(9), 6563–6573. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.6563>
- Terstappen, L. W., Safford, M., & Loken, M. R. (1990). Flow cytometric analysis of human bone marrow. III. Neutrophil maturation. *Leukemia*, *4*(9), 657–663.
- Thomas, C. J., & Schroder, K. (2013). Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends in Immunology*, *34*(7), 317–328. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.02.008>
- Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2015). Neutrophils in cancer: Two sides of the same coin. *Journal of Immunology Research*. <https://doi.org/10.1155/2015/983698>
- Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2020). Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Frontiers in Immunology*, *11*(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01066>
- Van Avondt, K., Fritsch-Stork, R., Derksen, R. H. W. M., & Meyaard, L. (2013). Ligation of Signal Inhibitory Receptor on Leukocytes-1 Suppresses the Release of Neutrophil Extracellular Traps in Systemic Lupus Erythematosus. *PLoS ONE*, *8*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078459>
- van Kesse, K. P. M., Bestebroer, J., & van Strijp, J. A. G. (2014). Neutrophil-mediated phagocytosis of Staphylococcus aureus. *Frontiers in Immunology*, *5*(SEP), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00467>
- Van Lochem, E. G., Van Der Velden, V. H. J., Wind, H. K., Te Marvelde, J. G., Westerdaal, N. A. C., & Van Dongen, J. J. M. (2004). Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, *60*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20008>
- Vandendriessche, S., Cambier, S., Proost, P., & Marques, P. E. (2021). Complement Receptors and Their Role in Leukocyte Recruitment and Phagocytosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*(FEB), 1–25. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.624025>
- Vázquez-Vela, M. E. F., Torres, N., & Tovar, A. R. (2008). White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. *Archives of Medical Research* *39*(8), 715–728. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2008.09.005>
- Vekic, J., Zeljkovic, A., Stefanovic, A., Jelic-Ivanovic, Z., & Spasojevic-Kalimanovska, V. (2019). Obesity and dyslipidemia. *Metabolism: Clinical and Experimental*. *92*, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.005>

- Villanueva, E., Yalavarthi, S., Berthier, C. C., Hodgins, J. B., Khandpur, R., Lin, A. M., Rubin, C. J., Zhao, W., Olsen, S. H., Klinker, M., Shealy, D., Denny, M. F., Plumas, J., Chaperot, L., Kretzler, M., Bruce, A. T., & Kaplan, M. J. (2011). Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology*, *187*(1), 538–552. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100450>
- Visan, I. (2015). Aging neutrophils. *Nature Immunology*, *16*(11), 1113–1113. <https://doi.org/10.1038/ni.3304>
- von Vietinghoff, S., & Ley, K. (2008). Homeostatic Regulation of Blood Neutrophil Counts. *The Journal of Immunology*, *181*(8), 5183–5188. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.8.5183>
- Vono, M., Lin, A., Norrby-Teglund, A., Koup, R. A., Liang, F., & Loré, K. (2017). Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4(+) T cells in vitro and ex vivo. *Blood*, *129*(14), 1991–2001. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-744441>
- Wang, J., Hossain, M., Thanabalasuriar, A., Gunzer, M., Meininger, C., & Kubes, P. (2017). Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair. *Science*, *358*(6359), 111–116. <https://doi.org/10.1126/science.aam9690>
- Wright, H. L., Makki, F. A., Moots, R. J., & Edwards, S. W. (2017). Low-density granulocytes: functionally distinct, immature neutrophils in rheumatoid arthritis with altered properties and defective TNF signalling. *Journal of Leukocyte Biology*, *101*(2), 599–611. <https://doi.org/10.1189/jlb.5A0116-022R>
- Wright, H. L., Moots, R. J., & Edwards, S. W. (2014). The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, *10*(10), 593–601. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.80>
- Xu, X., Su, S., Wang, X., Barnes, V., De Miguel, C., Ownby, D., Pollock, J., Snieder, H., & Chen, W. (2015). Obesity is associated with more activated neutrophils in African American male youth. *International Journal of Obesity*, *39*(1), 26–32. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.194>
- Yang, D., Han, Z., & Oppenheim, J. J. (2017). Alarmins and immunity. *Immunological Reviews*, *280*(1), 41–56. <https://doi.org/10.1111/imr.12577>
- Yao, Y., Matsushima, H., Ohtola, J. A., Geng, S., Lu, R., & Takashima, A. (2015). Neutrophil Priming Occurs in a Sequential Manner and Can Be Visualized in Living Animals by Monitoring IL-1 β Promoter Activation. *The Journal of Immunology*, *194*(3), 1211–1224. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402018>
- Zhang, D., Chen, G., Manwani, D., Mortha, A., Xu, C., Faith, J. J., Burk, R. D., Kunisaki, Y., Jang, J. E., Scheiermann, C., Merad, M., & Frenette, P. S. (2015). Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature*, *525*(7570), 528–532. <https://doi.org/10.1038/nature15367>

Zipursky, A., Bow, E., Seshadri, R. S., & Brown, E. J. (1976). Leukocyte density and volume in normal subjects and in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 48(3), 361–371. <https://doi.org/10.1182/blood.v48.3.361.361>