



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“La participación de CD43 en los mecanismos efectores de neutrófilos”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biól. Alan Isaac Fuentes Izalde

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay
[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Carlos Rosales Ledezma
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)
Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz
[Facultad de Medicina, UAEM](#)

Cuernavaca, Morelos. Marzo, 2022



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.

CGEP/PMDCB/2200/2021
Asunto: Jurado de examen

Alan Isaac Fuentes Izalde
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del 15 de diciembre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestría en Ciencias**, con la réplica de tesis **“La participación de CD43 en los mecanismos efectores de neutrófilos”**, dirigida por la Dra. Yvonne Jane Rosestein Azoulay .

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE: Dr. Baltazar Becerril Luján
Vocal : Dra . Araceli Pérez López
Vocal : Dr. Jorge Morales Montor
Vocal : Dr. Michael Schnoor
Secretario : Dra. Hilda María Lomelí Buyoli

MIEMBROS DEL JURADO:

Es obligación de los tutores de este programa participar en éstas y otras actividades académicas encomendadas por nuestro Comité Académico. Sin embargo, en caso de que tenga un impedimento académico o de salud para cumplir con esta encomienda, es muy importante contar con su respuesta (Formato anexo) en un plazo no mayor a una semana. Tome en cuenta que usted tiene 20 días hábiles para emitir su voto con las rondas de revisión que considere necesarias..

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
“POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuernavaca, Morelos, a 15 de diciembre de 2021
COORDINADORA DEL SUBCOMITÉ CAMPUS MORELOS



Dra. Marcela Ayala Aceves

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), campus Morelos, bajo la dirección de la Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay.

Para su realización, el proyecto contó con fondos provenientes de los proyectos PAPIIT # IN212519, y CONACYT #A1-S-15601.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante el posgrado (Núm. Becario: 1002733) y al apoyo otorgado del "Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP)" para la asistencia a cursos y congresos.

Agradecimientos

A la **Universidad Autónoma de México**, y en especial al **Instituto de Biotecnología** por haberme brindado la oportunidad de pertenecer a su hermosa comunidad y por permitirme vivir las experiencias más inolvidables de mi vida en el ámbito académico y profesional.

A la **Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay** por haberme brindado la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, impulsarme a desenvolverme en todos los ámbitos y sobre todo a su atención para asegurar mi formación académica. También agradezco sus valiosos consejos, experiencias, paciencia, tiempo y dedicación a la realización de este trabajo. ¡Muchas gracias!

A los miembros del comité tutorial, el **Dr. Carlos Rosales Ledezma** y al **Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz** por sus valiosas aportaciones, observaciones y consejos para el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del jurado, conformado por: **Dr. Baltazar Becerril Luján**, **Dra. Araceli Pérez López**, **Dr. Jorge Morales Montor**, **Dr. Michael Schnoor** y la **Dr. Hilda María Lomelí Buyolí**, por sus valiosas observaciones y aportaciones al presente trabajo.

A la **M. en C. Erika Isabel Melchy Perez** por sus aportaciones y a su excelente apoyo técnico.

Al **Dr. Angel Francisco Flores Alcantar** por sus aportaciones y a su excelente apoyo técnico.

Contenido

Abreviaturas	I
Resumen	III
I Introducción	1
1) Neutrófilos	3
Generalidades	3
Características morfológicas de neutrófilos	3
Producción y maduración de neutrófilos	4
Moléculas de reconocimiento de PAMPs presentes en la membrana del neutrófilo	7
Mecanismos efectores de neutrófilos	7
<i>Fagocitosis</i>	8
<i>Degranulación</i>	10
<i>Estallido respiratorio</i>	10
<i>Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)</i>	11
Reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección	13
El dimorfismo sexual juega un papel importante en la respuesta inmune mediada por neutrófilos	13
2) La proteína CD43.....	15
Ligandos de CD43.....	18
CD43 como una molécula señalizadora y multifuncional	18
CD43 y neutrófilos	20
3) Antecedentes	21
II Hipótesis	22
Objetivo general	22
Objetivos particulares	22
III Materiales y métodos.....	23
1) Animales.....	23
2) Obtención de neutrófilos a partir de sangre periférica y médula ósea.....	23
3) Selección negativa de neutrófilos a partir de médula ósea	25
4) Análisis de pureza, subpoblaciones de neutrófilos Ly6G ^{Lo} /Ly6G ^{Hi} , y de los receptores de quimiocinas CXCR2 y CXCR4 mediante citometría de flujo	25

5) Producción de ROS	26
6) Formación de NETs	28
7) Análisis estadístico	29
IV Resultados	30
VI Conclusiones	49
VII Perspectivas	49
Referencias	50
Apéndice I (Reactivos)	61
Apéndice II (Resultados)	63

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

AP-1: Proteína activadora 1 (del inglés, *activator protein 1*).

CLP: Células progenitoras linfoides (del inglés, *common lymphoid progenitor*).

CMP: Células progenitoras mieloides (del inglés, *common myeloid progenitor*).

DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato.

DAMPs: Moléculas asociadas a daño (del inglés, *damage-associated molecular pattern*).

DHE: Dihidroetidio.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

EEA1: Antígeno endosómico temprano 1 (del inglés, *early endosome antigen 1*).

ERM: Proteínas ezrina, radxina y moesina.

FAD: Flavin adenin dinucleótido.

Fc: Fragmento cristalizante de los anticuerpos.

fMLP: Formil-metionil-leucil-fenilalanil.

HSC: Células troncales hematopoyéticas (del inglés, *hematopoietic stem cells*).

Galgp: Galactoglicoproteína.

GalNAc: N-acetilgalactosamina.

GMP: Progenitor de granulocitos-macrófagos (del inglés, *granulocyte-macrophage progenitor*).

GM-CSF: Factor estimulante de colonia de granulocitos-monocitos (del inglés, *granulocyte colony-stimulating factor*).

HE: 2-hidroetidio.

HOCl: Ácido hipocloroso.

ICAM-1: Molécula de adhesión intracelular 1 (del inglés, *intercellular adhesion molecule 1*).

IFN- α : Interferón α .

iIMF: Intensidad media de fluorescencia integrada

IL-1 β : Interleucina 1 beta.

IL-6: Interleucina 6.

IL-8: Interleucina 8.

IL-10: Interleucina 10.

IL-17: Interleucina 17.

ILCs: Células linfoides innatas (ILCs del inglés, *innate lymphoid cells*)

Ig: Inmunoglobulinas.

ISG: Genes de respuesta a interferones de tipo I (del inglés, *IFN stimulated genes*).

KDa: Kilodaltones.

LAMPs: Proteínas de membrana asociadas a lisosomas (del inglés, *lysosomal-associated membrane proteins*).

LPS: Liposacárido.

Mac-1: Integrina CD11b/CD18

MAPKs: Cinasas activadas por mitógenos (del inglés, *mitogen-activated protein kinase*).

MHC-1: Complejo principal de histocompatibilidad de tipo I (del inglés, *major-histocompatibility class I*).

MPO: Mieloperoxidasa.

MMP: Metaloproteinasas de la matriz (del inglés, *matrix metalloproteinases*).

NADPH oxidasa: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (del inglés, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*).

MUC: Mucinas

NE: Elastasa de neutrófilo.

NETs: Trampas extracelulares de neutrófilo (del inglés, *neutrophil extracellular traps*).

NFAT: Factor nuclear de células T activadas (del inglés, *nuclear factor of activated T cells*).

NF- κ B: Factor nuclear kappa B (del inglés, *nuclear factor kappa B*).

NK: Células asesinas naturales (del inglés, *natural killer*).

NLR: Receptores citosólicos tipo NOD.

PA: Ácido fosfatídico.

PAF: Factor activador de plaquetas.

PAD4: Peptidilarginina desaminasa 4.

PAM: Poliangeítis microscópica.

PAMPS: Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés, *pathogen-associated molecular patterns*).

PBS: Solución salina amortiguadora de fosfatos (del inglés, *phosphate buffered saline*).

PC: Fosfatidil colina.

PI [4,5]P₂: Fosfatidil inositol-4,5-bifosfato.

PI [3,4,5]P₃: Fosfatidil inositol-3-fosfato.

PI-3K: Fosfatidil inositol 3-cinasa.

PFA: Paraformaldehído.

PKC: Proteína cinasa C.

PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato (del inglés *phorbol-12-myristate-13-acetate*).

PME: Progenitor megacarioto-eritroide.

PMN: Células polimorfonucleares.

PDL: Fosfolipasa D.

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones (del inglés, *pattern recognition receptor*).

PSGL-1: Ligando de la glicoproteína P-selectina (del inglés, *P-selectin glycoprotein ligand-1*).

RIG: Receptores citoplasmáticos para ácidos ribonucleicos.

ROS: Especies reactivas de oxígeno (del inglés, *reactive oxygen species*).

RPMI 1640: Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute 1640 (del inglés, *Roswell Park Memorial Institute Medium*).

SAH: Seroalbúmina humana

SFB: Suero fetal bovino.

SR-A: Receptor basurero A (del inglés, *scavenger receptor A*).

SOD: Superóxido dismutasa.

TLR: Receptor tipo Toll (del inglés, *Toll-like receptor*).

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α .

TGF- β : Factor de crecimiento tumoral β (del inglés, *tumor growth factor β*).

U.R.F: Unidades relativas de fluorescencia.

VAA-ANCA: Vasculitis asociada a anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos

VPV: Vasculitis de pequeños vasos.

VIA: Virus de la influenza A.

WAS: Síndrome recesivo Wiskott-Aldrich.

Resumen

CD43 es una glicoproteína de membrana presente en todas las células hematopoyéticas excepto en eritrocitos y linfocitos B en reposo. En linfocitos T, CD43 participa en múltiples funciones como: proliferación, migración, supervivencia y activación celular. En neutrófilos, los leucocitos más abundantes en circulación sanguínea, se ha propuesto que CD43 contribuye también en la locomoción y activación. En el presente trabajo se evaluó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), dos mecanismos efectores por los que los neutrófilos realizan funciones antimicrobianas y reguladoras de la inflamación. Se comparó la respuesta de neutrófilos de médula ósea de ratones C57BL/6 silvestres (WT) y deficientes en CD43 (CD43 KO), machos y hembras, mediante citometría de flujo y microscopia de fluorescencia. Independientemente de la presencia de CD43, los resultados mostraron un dimorfismo sexual entre la funcionalidad de los neutrófilos de machos y hembras, conforme a lo reportado. Asimismo, se encontró que la presencia de CD43 repercute en la funcionalidad de los neutrófilos de manera sexo-dependiente, siendo que los neutrófilos de ratones macho CD43 KO producen menos ROS y NETs que los de machos WT. En cambio, los neutrófilos de hembras CD43 KO producen más ROS y NETs que los de hembras WT. Aunado a lo anterior, se encontró que las hembras tienen un porcentaje mayor de neutrófilos inmaduros, además de un mayor diámetro en comparación a los machos. En conjunto, estos resultados sugieren que además de participar en la locomoción y migración, CD43 participa en funciones efectoras como la producción de ROS y la formación de NETs de los neutrófilos, y que expresar o no CD43 impacta sobre las diferencias resultantes del dimorfismo sexual, lo cual repercute a su vez sobre la funcionalidad de los neutrófilos.

I Introducción

El sistema inmunológico está conformado por un conjunto de células, tejidos, órganos, y moléculas (péptidos, proteínas, hormonas y lípidos). A través de una compleja red de interacciones entre sus componentes, y de manera orquestada, el sistema inmunológico se encarga del reconocimiento y eliminación de agentes potencialmente patógenos. El funcionamiento conjunto de todos los elementos del sistema inmunológico está organizado en etapas: el estímulo, la fase efectora y la fase de contracción; con lo cual se mantiene un estado de homeostasis en el organismo (Chaplin, 2010). Las células del sistema inmunológico reciben el nombre de glóbulos blancos o leucocitos en mamíferos, y se originan en la médula ósea. Existe una gran diversidad de leucocitos entre las cuales se incluyen los linfocitos B, linfocitos T, linfocitos NK, mastocitos, células dendríticas, monocitos, macrófagos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos y las llamadas células linfoides innatas (ILCs del inglés, *innate lymphoid cells*) (Chaplin, 2010). La respuesta inmunológica se divide en dos grandes ramales: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa.

La respuesta inmune innata, la primera en entrar en acción, se desencadena cuando el sistema inmunológico detecta los llamados “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs) o bien moléculas propias del organismo, asociadas a algún tipo de daño, llamadas DAMPs (del inglés, *damage-associated molecular pattern*). Los PAMPs tienen la capacidad de promover una respuesta inmunitaria que contribuye a reconocer y combatir a los microorganismos. En cambio, las DAMPs son moléculas que provienen del hospedero y promueven la activación del sistema inmune sin la presencia de un microorganismo. En situaciones normales las DAMPs contribuyen a la remodelación y reparación del tejido pero en situaciones muy particulares pueden ser perjudiciales debido a que son fuentes de autoantígenos y contribuyen a una respuesta autoinmune constante como ocurre en las enfermedades autoinmunes (Abbas, 2012; Murphy *et al.*, 2009; Warrington *et al.*, 2011). A través de los receptores para PAMPs y DAMPs las células de la respuesta inmune innata perciben las señales de alarma y echan a andar su maquinaria efectora. La respuesta de la inmunidad innata es muy rápida, ocurriendo en un lapso de horas o incluso días, pero sin generar memoria inmunológica. Las células consideradas efectoras de la respuesta inmune innata son los neutrófilos, mastocitos, basófilos, eosinófilos, las células linfoides innatas, células dendríticas y macrófagos.

A diferencia de la inmunidad innata que reconoce patrones moleculares, la inmunidad adaptativa reconoce “antígenos” es decir porciones de moléculas que pueden ser de origen exógeno o endógeno al organismo y que desencadenan una respuesta inmunitaria por mecanismos celulares y moleculares distintos a los de la respuesta innata. (Abbas, 2012). Los principales efectores de este tipo de respuesta

son los linfocitos T y B. Cada linfocito T o B tiene un receptor único que reconoce específicamente un antígeno. Los linfocitos B y T permanecen en estado latente hasta tener un encuentro con su antígeno específico y el enfrentamiento repetido con el mismo antígeno aumenta la efectividad y mejora la respuesta de los linfocitos ante el antígeno, otorgándoles la capacidad de generar memoria inmunológica y “recordar” al antígeno. Contrario a la rápida respuesta de la inmunidad innata, el tiempo de respuesta de la inmunidad adaptativa es lento, ocurriendo aproximadamente de los 10 a 15 días (Warrington *et al.*, 2011).

1) Neutrófilos

Generalidades

Los neutrófilos, también conocidos como leucocitos polimorfonucleares (PMN) desempeñan un papel fundamental durante las primeras etapas de infecciones, causadas por agentes patógenos, particularmente hongos y bacterias (Hidalgo *et al.*, 2019). Los neutrófilos, son las primeras células en tener contacto con los antígenos o patógenos y constituyen una de las primeras líneas de defensa del organismo. Además, juegan un papel fundamental en patologías de origen autoinmune como el lupus eritematoso sistémico, la psoriasis, la artritis reumatoide, el síndrome antifosfolípidos y la vasculitis asociada a anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (VAA-ANCA) (Lee *et al.*, 2017).

Los neutrófilos fueron descritos por primera vez en 1865 por Max Johann Sigismund Schultze (Schultze, 1865; Cavaillon, 2011) aunque en un principio no se nombraban así. Paul Ehrlich les asignó el nombre de neutrófilos debido a que estas células presentan una coloración neutra al teñirlos con colorantes aniónicos o catiónicos (Ehrlich & Lazarus, 1900; Kay, 2016). Contemporáneo de Paul Ehrlich, Elie Metchnikoff, el descubridor de la fagocitosis, les asignó a estas células un segundo nombre, dicho nombre fue leucocitos polimorfonucleares (PMN) debido a la particular forma del núcleo (Cavaillon, 2011).

En humanos, los neutrófilos constituyen la población de leucocitos más abundante en la circulación sanguínea (aproximadamente del 50 al 70 % de los leucocitos circulantes; Mayadas *et al.*, 2014), mientras que en ratones, solo representan del 10 al 25 % de los leucocitos circulantes (Hidalgo *et al.*, 2019). A diferencia de otros leucocitos, los neutrófilos son células con un tiempo de vida media muy corto. Tanto en humanos como en ratones se calcula una vida media entre 6 a 12 horas en circulación sanguínea (Adrover *et al.*, 2016; Lord *et al.*, 1991; Price *et al.*, 1996), mientras que en tejidos pueden vivir de 1 a 2 días (Mayadas *et al.*, 2014).

Características morfológicas de neutrófilos

El tamaño y las características morfológicas de los neutrófilos maduros varía entre especies, pero presentan características en común que los hace fácilmente reconocibles. La principal característica que permite diferenciar a los neutrófilos de otros leucocitos es la peculiar forma de su núcleo. En humanos, el núcleo de los neutrófilos tiene una forma multilobulada con segmentos de tres a cinco lóbulos (Veda, 2011). En ratones, el núcleo presenta lóbulos con forma anillada con poca distinción de la segmentación del núcleo (Biermann *et al.*, 1999; Hidalgo *et al.*, 2019; O'Connell

et al., 2015). Aunque se desconoce porque los núcleos de los neutrófilos tienen esa forma, se ha propuesto que la forma lobulada facilita la migración de los neutrófilos a través de los tejidos respecto a otras células con un núcleo en forma ovoide o esférico (Veda, 2011).

El tamaño de los neutrófilos humanos es aproximadamente de 10 μm de diámetro, y los de ratón tienen un diámetro aproximado de 7 μm (Hidalgo *et al.*, 2019). Su citoplasma contiene abundantes gránulos y vesículas secretoras, por lo que se incluye a los neutrófilos en el grupo de granulocitos en conjunto con los basófilos y eosinófilos (Warrington *et al.*, 2011). Por su contenido de gránulos y las vesículas secretoras, los neutrófilos tienen una densidad mayor ($> 1.080 \text{ g/mL}$) en comparación con leucocitos mononucleares que presentan una densidad menor ($< 1.077 \text{ g/mL}$) (Zipursky *et al.*, 1976), una propiedad que se ha explotado para desarrollar métodos de separación basados en gradientes de densidad (Boyum, 1968; Ferrante & Thong, 1980).

Los gránulos de los neutrófilos tienen la principal función de almacenar y liberar sustancias microbidas (Lacy, 2006; Sheshachalam *et al.*, 2014a) y utilizarlas como herramientas para combatir bacterias y agentes patógenos, ya sea liberando el contenido de los gránulos al medio extracelular o mediante la fusión de los gránulos con fagosomas producto de las fagocitosis (Cassatella *et al.*, 2019; Lacy, 2006; Sheshachalam *et al.*, 2014)(Cassatella *et al.*, 2019).

Producción y maduración de neutrófilos

Los componentes celulares de la sangre son generados por el proceso de hematopoyesis, el cual se realiza en la médula ósea, a partir de las células troncales hematopoyéticas (HSC, del inglés, *hematopoietic stem cell*) que pueden diferenciarse en células progenitoras linfoides (CLP, del inglés, *common lymphoid progenitor*) o en células progenitoras mieloides (CMP, del inglés, *common myeloid progenitor*). Las CLP darán origen a linfocitos T, B, células NK, y células dendríticas (Doulatov *et al.*, 2012) mientras que las CMPs pueden diferenciarse en un progenitor megacarioto-eritroide (PME) o en un progenitor de granulocitos-macrófagos (GMP, del inglés, *granulocyte-macrophage progenitor*) a partir de los cuales se producirán eritrocitos/megacariocitos y células mieloides (macrófagos, mastocitos, basófilos, eosinófilos y neutrófilos), respectivamente (Doulatov *et al.*, 2012; Lawrence *et al.*, 2018). En presencia del factor estimulante de colonia de granulocitos-monocitos (GM-CSF, del inglés, *granulocyte colony-stimulating factor*), el GMP compromete a los mieloblastos a generar granulocitos a través de un proceso conocido como granulopoyesis (Lawrence *et al.*, 2018; Rosales, 2018). Río abajo de la señal del GM-

CSF se han identificado a los factores de transcripción C/EBP (α , β , δ , γ y ζ), PU.1, RUNX1 y GFI1 como piezas clave en la diferenciación y generación de neutrófilos en mamíferos (Yvan-Charvet & Ng, 2019).

El proceso de granulopoyesis comienza cuando los mieloblastos producen células precursoras comprometidas hacia el linaje de neutrófilos (*pre-Neu*), es decir los promielocitos y su posterior estado de diferenciación, los mielocitos (Figura 1.1). Ambas células retienen sus capacidades de proliferación por lo que forman el principal reservorio de “neutrófilos con capacidad mitótica” (Lawrence *et al.*, 2018). Durante el estadio de promielocitos, se generan los gránulos primarios (nombrados así por ser los primeros gránulos en desarrollarse), que forman parte del arsenal microbicida de los neutrófilos. En el siguiente estadio de maduración, los precursores pierden su capacidad mitótica, y pasan a formar parte de un reservorio post-mitótico (*Neu inmaduros*). En este reservorio, los promielocitos maduran a un estadio de metamielocito, en el cual el núcleo comienza a adquirir una morfología en forma de “riñón” y desarrollan un segundo grupo de gránulos conocidos como gránulos secundarios (Figura 1.1). Conforme continúa la maduración de las células, el núcleo sufre una segmentación y adquiere una morfología de “herradura”, y se desarrollan los gránulos terciarios que constituyen el último grupo de gránulos en ser generados. En este punto, las células aún se encuentran en la médula ósea y son inmaduras; se les conoce como neutrófilos en banda (Hidalgo *et al.*, 2019). En condiciones homeostáticas, los neutrófilos en banda no se encuentran en circulación sanguínea, pero durante una inflamación o infección aguda pueden ser liberados prematuramente al torrente sanguíneo (Hidalgo *et al.*, 2019; Lawrence *et al.*, 2018). Finalmente, cuando el núcleo adquiere la forma lobulada (*Neu maduro*), el neutrófilo está listo para ser liberado a la circulación sanguínea, concluyendo así su ciclo de maduración (Biermann *et al.*, 1999) (Figura 1.1). La transición de la última división del mielocito a un neutrófilo maduro ocurre en un lapso de cinco a seis días en humanos y en roedores ocurre en un lapso más corto, de dos a tres días (Hidalgo *et al.*, 2019). Por otra parte, en murinos la celularidad de la médula ósea se mantiene estable en edades que van de las ocho semanas a un año de edad, a diferencia de otros mamíferos en los que la celularidad se ve afectada conforme avanza la edad (O’Connell *et al.*, 2015).

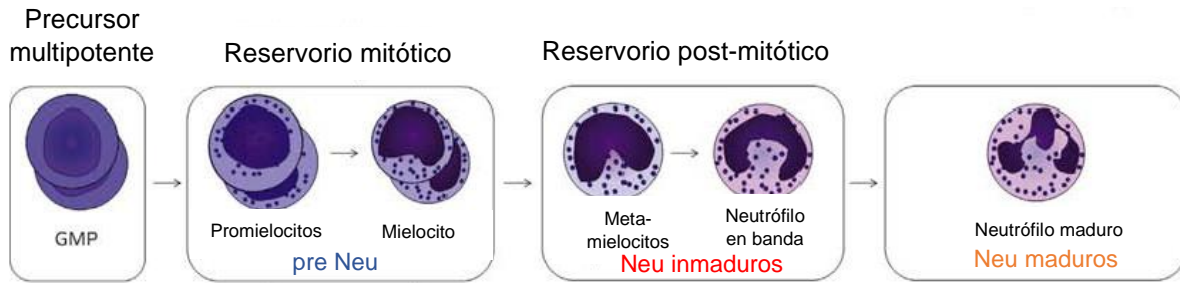


Figura 1.1. Diferentes estadios de maduración de los neutrófilos en la médula ósea. A partir de un precursor multipotente GMP, se producen los precursores de neutrófilos (pre Neu), los promielocitos y los mielocitos, ambas células constituyen el reservorio mitótico de neutrófilos, conforme transcurre la maduración de estos precursores se convierten en metamielocitos y neutrófilos en banda (Neu inmaduros), ambos constituyendo parte de un reservorio post-mitótico de neutrófilos. Finalmente, cuando los neutrófilos en banda alcanzan su maduración son liberados a la circulación sanguínea como neutrófilos maduros (Neu maduros). Tomado de Hidalgo *et al.*, (2019).

Durante el proceso de maduración de los neutrófilos murinos ocurren cambios en marcadores de membrana, tal es el caso de la molécula Ly6G, la cual incrementa su expresión conforme el neutrófilo alcanza su maduración (Hestdal *et al.*, 1991; Ueda *et al.*, 2005). Además de expresarse exclusivamente en neutrófilos, Ly6G es utilizado como un marcador para definir subpoblaciones de neutrófilos de acuerdo a su estado de maduración en médula ósea, identificando dos subpoblaciones de neutrófilos, denominadas Ly6G^{Low} y Ly6G^{High}, consideradas como neutrófilos inmaduros o maduros, respectivamente (Kim *et al.*, 2017; Lagasse & Weissman, 1996; Panopoulos *et al.*, 2006).

Otro grupo de moléculas que van cambiando conforme maduran los neutrófilos, son los receptores de quimiocinas CXCR2 y CXCR4. A través de las señales del receptor CXCR4 que reconoce a la quimiocina CXCL12 (SDF1), producida por las células del estroma de la médula ósea, los neutrófilos inmaduros son retenidos en la médula ósea en un estadio de reservorio mitótico y postmitótico. Conforme maduran, los neutrófilos dejan de expresar CXCR4 e incrementan la expresión del receptor de quimiocina IL-8, CXCR2 (Evrard *et al.*, 2018). Los neutrófilos CXCR2⁺ también expresan una gran cantidad de CD62L (L-selectina) en la membrana, estos son neutrófilos maduros listos para salir a la circulación sanguínea (Hidalgo *et al.*, 2019). Cuando los neutrófilos completan su tiempo de vida promedio en circulación sanguínea, se vuelven neutrófilos senescentes, disminuyendo su expresión de CXCR2 y CD62L, y de nuevo expresan CXCR4 en la membrana, lo cual les permite retornar a la médula ósea en respuesta a CXCL12. Una vez en el estroma, los neutrófilos senescentes son fagocitados por macrófagos para renovar el ciclo de producción de neutrófilos (Peng *et al.*, 2021). La generación de neutrófilos está sometida a oscilaciones circadianas. En ratón, el pico de neutrófilos maduros (Ly6G^{Hi} CXCR2⁺ CXCR4⁻ CD62L^{Hi}) circulantes en sangre se encuentra en las horas de vigilia mientras que al final del periodo de sueño se alcanza un segundo pico, pero esta vez

de neutrófilos senescentes (Ly6G^{Hi}, CXCR2⁻, CXCR4⁺ y CD62L^{Lo}) (Capucetti *et al.*, 2020; Hidalgo *et al.*, 2019).

Moléculas de reconocimiento de PAMPs presentes en la membrana del neutrófilo

Los neutrófilos expresan una diversidad de receptores tipo PRR con los que reconocen los PAMPs de los patógenos, como son los receptores de lectina de tipo C (CLR), grupo en el cual se incluye a la dectina-1 (Flannagan *et al.*, 2012), y los TLRs mediante los cuales reconoce lípidos, carbohidratos, péptidos, ADN y ARN de una o doble cadena. Los neutrófilos humanos expresan toda esta familia de receptores TLR con excepción del TLR-3 y TLR-7 mientras que en ratón solo no se expresa el TLR-3 (Thomas & Schroder, 2013). Otros receptores presentes en la membrana del neutrófilo son los receptores de opsoninas como los del complemento (CR3) o para anticuerpos (Fc) y receptores acoplados a proteínas G que se encargan de detectar péptidos bacteriano (fMLP) o para responder ante agentes quimiotácticos como la IL-8, PAF, C3a y C5a (Mayadas *et al.*, 2014). Por otro lado, los neutrófilos tienen receptores citosólicos tipo NOD (NLR) como NOD1 y NOD2 que reconocen peptidoglicanos de gram-negativas y gram-positivas, respectivamente (Mayadas *et al.*, 2014), y los receptores citoplasmáticos para ácidos ribonucleicos (RIG) como RIG1 y MDA5 que reconocen ARN exógeno al anfitrión (Mantovani *et al.*, 2011).

Mecanismos efectores de neutrófilos

Por ser la primeros leucocitos en acudir a los sitios de infección o inflamación, los neutrófilos constituyen una de las primeras líneas de defensa contra los patógenos (Rosales *et al.*, 2016). Haciendo uso del arsenal de moléculas microbidas contenidas en los diferentes tipos de gránulos de su citoplasma, estas células disponen de varios mecanismos microbidas para llevar a cabo su función. Entre estos mecanismos se incluye: la fagocitosis, el estallido respiratorio, la degranulación y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs del inglés, *Neutrophil extracellular traps*) (Nathan, 2006) (Figura 1.2).

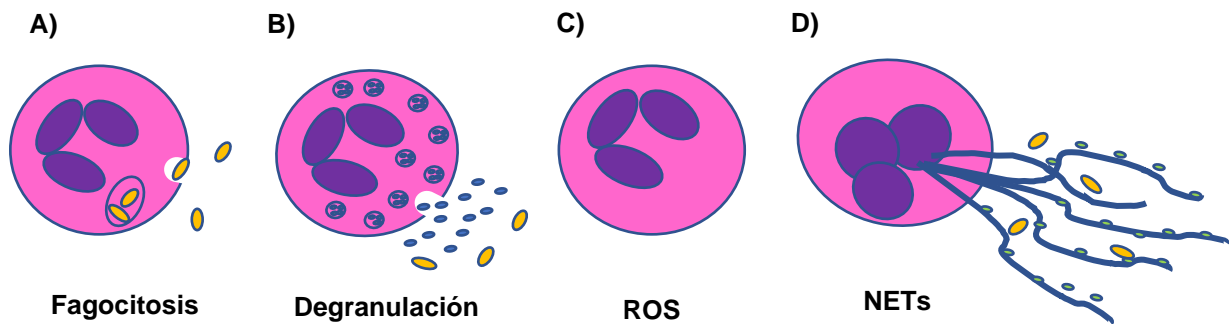


Figura 1.2. Mecanismos efectores de neutrófilos. Los neutrófilos son células que acuden a sitios de infección o inflamación. Una vez en la zona afectada, los neutrófilos reconocen y eliminan microorganismos patógenos, a través de: A) la fagocitosis, B) la degranulación, C) la producción de ROS y D) la formación de NETs.

Fagocitosis

La fagocitosis consiste en el reconocimiento e internalización de partículas $> 0.5 \mu\text{m}$ en vesículas conocidas como fagosomas. Es el principal mecanismo utilizado por los fagocitos profesionales, entre los que se incluyen a los monocitos, macrófagos, células dendríticas, osteoclastos, eosinófilos y neutrófilos. En el caso de neutrófilos es el principal mecanismo utilizado para eliminar patógenos y restos celulares (Rosales & Uribe-Querol, 2017). Para que se lleve a cabo la fagocitosis, las partículas a fagocitar son reconocidas por receptores presentes en la membrana celular de los neutrófilos. Estos receptores se clasifican en tres grandes grupos: los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés, *pattern-recognition receptors*), los receptores de opsoninas y los receptores de cuerpos apoptóticos.

El primer grupo de receptores reconoce a los PAMPs. Por ejemplo, los receptores tipo Dectina-1 o los receptores de manosa (CD206) reconocen polisacáridos específicos de superficie de levaduras, bacterias y parásitos. En cambio los receptores CD14, MARCO y SR-A (del inglés, *Scavenger receptor class A*) identifican fácilmente el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gram-negativas, y los receptores TLR (Del inglés, *Toll like receptor*) aunque no participan directamente en la fagocitosis pueden cooperar con los receptores anteriormente descritos para potenciar la eficiencia de este proceso (Flannagan *et al.*, 2012). En el segundo grupo se incluyen a los receptores para opsoninas, entre las cuales se incluyen a las inmunoglobulinas (principalmente del isotipo IgG), y proteínas del complemento como C3b o C5b que se encuentran en la sangre o líquidos intersticiales. Al unirse a los patógenos o partículas extrañas, las opsoninas que se unieron específicamente al patógeno son reconocidas por los receptores de opsoninas, aumentando la eficiencia

de la fagocitosis. Entre los receptores más representativos para opsoninas se encuentran los receptores para Fc ($Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIIIa$, $Fc\gamma RIIIb$, $Fc\alpha RI$ y $Fc\epsilon RI$) y los receptores del complemento (CR1, CR3 y CR4) que reconocen específicamente el fragmento cristalizable (Fc) de los anticuerpos y moléculas del complemento, respectivamente (Mayadas *et al.*, 2014). El último grupo de PRRs está conformado por los receptores de cuerpos apoptóticos, que se encargan de reconocer la fosfatidilserina o lípidos oxidados de células que se encuentran en el proceso de apoptosis (Rosales & Uribe-Querol, 2017).

Una vez que la partícula interactúa con los receptores de fagocitosis del neutrófilo, se lleva cabo el proceso de internalización. Durante el proceso ocurren importantes reacomodos del citoesqueleto, principalmente la nucleación de la F-actina para formar pseudópodos alrededor de la partícula que será fagocitada en una estructura conocida como “copa fagocítica”. En la membrana celular de esta estructura ocurren cambios importantes; en particular, incrementa la concentración del lípido fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato ($PI[4,5]P_2$) de forma transitoria, siendo rápidamente hidrolizado por $PLC\gamma$, lo cual lleva a la producción de DAG e IP_3 , y la liberación de Ca^{2+} intracelular. Adicionalmente, el $PI [4,5]P_2$ es rápidamente convertido a fosfatidil inositol-3-fosfato ($PI[3,4,5]P_3$) por la fosfatidilinositol 3-cinasa ($PI-3K$). A su vez el $PI [3,4,5]P_3$ coordina la actividad de las pequeñas GTPasas de la familia de RHO, y promueve la polimerización de las fibras de actina. En el caso de la fagocitosis mediada por anticuerpos, la fosfolipasa D (PLD) es reclutada en la copa fagocítica e hidroliza la fosfatidil colina (PC) generando ácido fosfatídico (PA), el PA induce una curvatura negativa en la membrana de la copa fagocítica promoviendo la fisión de las membranas dando lugar a un fagosoma temprano (Flannagan *et al.*, 2012). Tras una compleja red de señales intracelulares, la copa fagocítica rodea y encierra la partícula a ingerir en una vesícula llamada fagosoma. Una vez internalizado, el fagosoma sufrirá diferentes modificaciones hasta alcanzar su completa maduración en un proceso que se conoce como maduración del fagosoma. Durante la primera etapa de este proceso, el fagosoma temprano se fusionará con endosomas tempranos provenientes de la célula, a través de la GTPasa pequeña Rab5 y la proteína antígeno endosómica temprana (EEA1 del inglés, *early endosome antigen 1*). Durante la segunda etapa, se llevará a cabo la formación de un fagosoma tardío, en el cual se eliminará Rab5 mientras que se reclutará Rab7, responsable de la fusión del fagosoma con endosomas tardíos. El resultado de esta fusión reclutará la proteína de membrana LAMPs (Del inglés, *Lysosomal-associated membrane proteins*) y la V-ATPasa, siendo esta última responsable de la acidificación del lumen de fagosoma (~pH 5.5 -6). La culminación de la maduración del fagosoma ocurre cuando se alcanza la formación de un fagolisosoma, un organelo especializado con función microbicida. Este organelo está caracterizado por tener un pH ácido (<4.5) debido a una gran acumulación de V-ATPasa y NADPH oxidasa en su membrana plasmática, y a la acumulación de

proteínas microbicidas en el lumen del fagolisosoma como la catepsinas, la MPO y NE, provenientes de la fusión de los gránulos de (Cassatella *et al.*, 2019; Rosales & Uribe-Querol, 2017).

Degranulación

Los neutrófilos contienen proteínas microbicidas almacenadas en sus tres tipos de gránulos. Los gránulos primarios o azurófilos, los cuales contienen mieloperoxidasa (MPO), elastasa de neutrófilo (NE), azurocidina, sialidasa, proteinasa 3, catepsina G y defensinas (Borregaard *et al.*, 2007; Mayadas *et al.*, 2014). Los gránulos secundarios o específicos almacenan lactoferrina, lisozima, y la catelicidina LL-37. Por último, los gránulos terciarios, que contienen en su interior gelatinasa y grandes cantidades de metaloproteinasas de la matriz (MMP, del inglés *matrix metalloproteinases*) (Lacy, 2006; Mayadas *et al.*, 2014; Sheshachalam *et al.*, 2014a).

Todos los gránulos pueden fusionarse con la membrana plasmática en un proceso conocido como degranulación, a través del cual se liberan de las moléculas microbicidas contenidas en los gránulos hacia el medio extracelular (Cassatella *et al.*, 2019). Mediante este proceso, las células eliminan eficientemente a los patógenos extracelulares. Cuando el neutrófilo es estimulado por algún patógeno, se produce el reclutamiento de sus gránulos a proximidad de la membrana plasmática provocando la liberación de las enzimas digestivas hacia la membrana blanco. Además, la degranulación también provoca inflamación y reclutamiento de otros leucocitos, por lo que es un proceso altamente regulado (Lacy, 2006).

Estallido respiratorio

La producción del anión superóxido (O_2^-) es un mecanismo microbicida muy eficiente llevado a cabo por células del sistema inmune innato. El O_2^- es un precursor para la formación de otra serie de moléculas altamente microbicidas conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS) entre las cuales se incluyen el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el ion hidroxilo (OH^*) y el ácido hipocloroso (HOCl) (Groemping & Rittinger, 2005). En neutrófilos, la generación del O_2^- ocurre a través de un complejo enzimático conocido como nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa o también conocido como NADPH oxidasa. Dicho complejo está compuesto por cinco hetero-subunidades (gp91^{phox}, p22^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox} y p40^{phox}) que normalmente se encuentran desensambladas e inactivas para evitar “daño colateral” a células y tejidos sanos. De tal manera, que la NADPH oxidasa está regulada por la distribución espacial de sus subunidades, y por la modulación reversible de las interacciones proteína-

proteína, restringiéndose su actividad a estímulos apropiados como es el reconocimiento o fagocitosis de un patógeno (Groemping & Rittinger, 2005).

Las subunidades de la NADPH oxidasa están distribuidas de forma membranar y citosólica. Las subunidades gp91^{phox} y p22^{phox} son proteínas integrales de la membrana citoplasmática o de la membrana de los gránulos citosólicos, y conforman el heterodímero flavocitocromo *b*₅₅₈ (cyt *b*₅₅₈), el cual constituye el núcleo catalítico de la enzima. En respuesta a un estímulo, las subunidades citosólicas p67^{phox}, p47^{phox} y p40^{phox} son reclutadas hacia la membrana plasmática o de los gránulos (El-Benna *et al.*, 2016; Mayadas *et al.*, 2014). Una vez ensamblado el complejo enzimático, la GTPasa pequeña Rac 1/2 cambia de un estado inactivo unido a GDP a uno activo unido a GTP. En su estado activo, Rac 1/2 interactúa directamente con la subunidad p67^{phox}, completando la activación del complejo enzimático. Las interacciones entre las subunidades de la NADPH oxidasa también se encuentran reguladas por la fosforilación de los componentes de la NADPH oxidasa. Cuando los fagocitos son expuestos a formil-metionil-leucil-fenilalanil (fMLP), TNF- α , factor activador de plaquetas (PAF), GM-CSF o LPS, se activan las MAPKs, las cuales fosforilan la subunidad p47^{phox}, incrementando la fuerza de interacción con las subunidades gp91^{phox} y p22^{phox}, promoviendo el ensamblado y activación de la NADPH oxidasa (El-Benna *et al.*, 2016). Alternativamente, las proteínas cinasa C (PKC) pueden fosforilar directamente a la subunidad p47^{phox}, desencadenando el ensamblado de la NADPH oxidasa y su posterior activación (El-Benna *et al.*, 2016).

La NADPH oxidasa activada oxida el NADPH citosólico y le transfiere electrones (e⁻) al O₂ a través del flavin adenin dinucleótido (FAD), generando finalmente el O₂⁻. Es un proceso que requiere de un intenso y súbito consumo de glucosa y oxígeno, motivo por el cual este proceso se denomina “estallido respiratorio” (Thomas, 2017). Posteriormente, debido a su gran inestabilidad química, el O₂⁻ interactúa rápidamente con la superóxido dismutasa (SOD), la cual transforma 2 O₂⁻ y 2 H⁺ para generar H₂O₂ + O₂. Espontáneamente, el H₂O₂ generado puede reaccionar con el O₂⁻ generando OH* y O₂ (Thomas, 2017) o, en otras circunstancias, el H₂O₂ y el Cl⁻ sirven de sustrato de la MPO para generar el HOCl + OH*, el cual es también un producto microbicida (Groemping & Rittinger, 2005).

Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)

La formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) consiste en la expulsión de la cromatina al medio extracelular, formando fibras similares a redes acompañadas con proteínas microbicidas de los gránulos del neutrófilo que atrapan y eliminan a los patógenos (Berger-Achituv *et al.*, 2013; Brinkmann *et al.*, 2004). La expulsión de la cromatina para formar NETs representa una decisión importante para

la célula, ya que involucra la muerte del neutrófilo en un tipo de muerte celular altamente regulada llamada NETosis (Fuchs *et al.*, 2007; Steinberg & Grinstein, 2007). A pesar de la diversidad de los estímulos que llevan a la formación de NETs, aún no se conoce con certeza los receptores cuyas señales intracelulares llevan a la formación de NETs. En neutrófilos humanos se han identificado dos receptores para la formación de NETs: los receptores de anticuerpos Fc α RI (Aleyd *et al.*, 2014) y Fc γ RIIIb (Alemán *et al.*, 2016; Behnen *et al.*, 2014), que reconocen los complejos inmunes formados por la IgA e IgG, respectivamente.

El mecanismo de formación de NETs es conservado entre mamíferos, y se ha descrito en perro, gato, ratón, cabra, foca, caballo, humano y bovinos (Li & Tablin, 2018). Se han identificado diversos inductores de NETs, entre los cuales se incluyen agentes químicos y biológicos. En el grupo de agentes biológicos, solo por mencionar algunos, están las bacterias como *S. aureus* y *S. pneumoniae* (Brinkmann *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2012); los parásitos como *T. gondii* (Abdallah *et al.*, 2012) y hongos, como *A. fumigatus* y *C. albicans* (Bruns *et al.*, 2010; Byrd *et al.*, 2013). Entre los agentes químicos, se ha reportado al LPS de bacterias, la IL-8 y agentes sintéticos como el éster de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA del inglés, *Phorbol myristate acetate*) (Brinkmann *et al.*, 2004).

Los cambios que ocurren durante la NETosis inducida por PMA han sido caracterizados con cierto detalle. Durante los primeros minutos después del estímulo de PMA, el neutrófilo se aplana y adhiere al sustrato (Fuchs *et al.*, 2007). En paralelo, la activación de las PKC dará lugar a la fosforilación directa de la subunidad p47^{phox} de la NADPH y/o la activación río abajo de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), Raf/MEK/ERK (Hakkim *et al.*, 2011), promoviendo el ensamblado y activación de la NADPH oxidasa en los gránulos de los neutrófilos, dando como resultado una elevación del Ca²⁺ intracelular y el estallido respiratorio (Nel *et al.*, 2016). El exceso de ROS provoca el colapso de la envoltura nuclear y de la membrana de los gránulos, liberando los componentes de los gránulos como la NE, MPO y la peptidilarginina desaminasa 4 (PAD4) (Papayannopoulos *et al.*, 2010). El colapso de la envoltura nuclear facilitará la migración de la PAD4 al núcleo, en donde promoverá la citrulinación de la arginina de la histona H3, un proceso dependiente de Ca²⁺ (Wang *et al.*, 2009). Concomitantemente, la NE y la MPO migrarán al núcleo contribuyendo a la descondensación de la cromatina (Papayannopoulos *et al.*, 2010). Esto provocará un cambio de carga neta de las histonas de positivo a negativo, dando como resultado la descondensación de la cromatina (Nel *et al.*, 2016). Aproximadamente una hora después del estímulo, después de ocurrida la citrulinación de la histona H3, ocurre la pérdida de la forma multilobulada del núcleo y la degradación completa de los gránulos, y la fusión del nucleoplasma con el citoplasma ocurrirá aproximadamente a las tres horas. Finalmente, el colapso de la membrana plasmática, y la expulsión de

la cromatina al medio extracelular concluirá con el proceso de formación de NETs aproximadamente a las cuatro horas (Fuchs *et al.*, 2007).

Reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección

En individuos sanos, los neutrófilos se encuentran circulando en el torrente sanguíneo. Cuando algún patógeno irrumpe en el hospedero, las células dendríticas, los mastocitos, los macrófagos y las células del endotelio reconocen los PAMPs del patógeno mediante sus PRRs, generando señales de alarma que se traducen por la producción de mediadores proinflamatorios como TNF- α , IL-6, IL-17 e IL-1 β (Nauseef & Borregaard, 2014). Además, se produce un segundo grupo de moléculas entre las cuales se incluyen a la IL-8, el factor activador de plaquetas (PAF), leucotrieno B₄, la fracción del complemento C5a y el péptido bacteriano fMLP (El-Benna *et al.*, 2016). En conjunto, todas estas moléculas amplifican la señal de alarma y atraen a otras células al sitio del insulto.

Los mediadores proinflamatorios actúan directamente sobre las células del endotelio circundante al insulto, generando cambios en la afinidad de proteínas de la superficie celular hacia sus ligandos, principalmente de E-selectina y P-selectina (Margraf *et al.*, 2019; Nauseef & Borregaard, 2014). Estas moléculas interactúan con PSGL-1 y CD44 en la superficie de los neutrófilos, capturándolos y anclándolos débilmente al endotelio, lo cual resulta en una pérdida de velocidad por parte de los neutrófilos, que empiezan a rodar sobre el endotelio. Por último, gracias a la interacción de la integrina CD11b/CD18 (Mac-1) con molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1 del inglés, *Intercellular Adhesion Molecule 1*); cuya expresión en la superficie de las células endoteliales aumenta en respuesta al insulto original, los neutrófilos se anclan fuertemente al endotelio, y pasan entre las uniones estrechas de las células del endotelio para lograr extravasar al sitio de infección y combatir al agente patógeno mediante alguno de sus mecanismos efectores (Margraf *et al.*, 2019; Mayadas *et al.*, 2014).

El dimorfismo sexual juega un papel importante en la respuesta inmune mediada por neutrófilos

El dimorfismo sexual se define como la diferencia física y fisiológica existente entre machos y hembras. En mamíferos, el dimorfismo sexual está determinado por factores genéticos y fisiológicos. En el primer caso, todos los mamíferos tienen un par de cromosomas sexuales, este par es el que determina el sexo en el individuo; en el caso de los machos, su genotipo incluye un par de cromosomas sexuales XY, siendo

el cromosoma Y, un cromosoma con el gen exclusivo SRY que será determinante para generar los testículos. En cambio, las hembras tienen un cromosoma sexual X extra, lo que conlleva a que contengan en su genotipo un par de cromosomas sexuales XX. Esta diferencia, produce que los individuos desarrollen gónadas, ya sea testículos u ovarios para machos y hembras, respectivamente. Ambas gónadas tienen la función reproductora de generar gametos, aunque también tienen una función endocrina, la cual es la responsable de producir la diferencia fisiológica existente entre machos y hembras (Klein & Flanagan, 2016; Libert *et al.*, 2010).

Las hembras se caracterizan por una mayor producción de estrógenos, progesterona y estradiol por parte de los ovarios. En cambio, en los machos predomina una mayor producción de testosterona por los testículos. Las hormonas sexuales son fundamentales para la reproducción y pueden tener influencia en la fisiología de los machos y hembras, como ocurre en la fisiología del sistema inmunológico (Giefing-Kröll *et al.*, 2015). Se ha reportado que el sistema inmunológico de las hembras es más eficiente respecto al de los machos, esta efectividad incluye una inmunidad humoral más eficiente mediante una mayor producción de inmunoglobulinas de tipo M y G, y una mejor respuesta celular (Oertelt-Prigione, 2012). Esta efectividad se ha atribuido al efecto del estradiol y la progesterona sobre las células del sistema inmune de hembras debido a su papel inmunomodulador (Straub, 2007). Lo anterior ha llevado a clasificar a la respuesta inmune de hembras como tipo proinflamatorio con un perfil transcripcional muy definido hacia una elevada producción de citocinas como IL-6, TNF- α e interferones de tipo I (IFN- α) mientras que en machos, debido al efecto inmunosupresor de la testosterona, las células de la respuesta inmune exhiben un perfil transcripcional más dirigido a una respuesta de tipo antiinflamatorio, con una mayor producción de IL-10 y factor de crecimiento tumoral β (TGF- β del inglés, *tumor growth factor β*) (Crockett *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2020). Se ha sugerido que este dimorfismo transcripcional puede deberse en parte a los genes que codifican en los cromosomas sexuales, principalmente del cromosoma X extra presente en hembras. Al tener una copia extra de genes como por ejemplo del gen *Tlr7*, *Tlr8*, *il2rg* y *il13ra2*, que pueden escapar a la inactivación, las hembras pueden generar una respuesta inmune más potente (Libert *et al.*, 2010; Park & Choi, 2017). Estas diferencias y otras contribuyen de manera importante a la diversidad entre la respuesta inmune de machos y hembras, favoreciendo o perjudicando la efectividad del sistema inmunológico. Este dimorfismo de la respuesta inmune se refleja en todas las facetas de la respuesta inmune, y particularmente de los neutrófilos dependiendo del contexto fisiológico.

Se ha propuesto al dimorfismo sexual como la principal causa de una mayor incidencia de enfermedades autoinmunes en hembras, principalmente debido al

efecto potenciador del estradiol, progesterona y al perfil transcripcional de IFN tipo I (Ngo *et al.*, 2014). En humanos, los neutrófilos son importantes mediadores en el desarrollo de enfermedades autoinmunes y recientemente se ha descrito que los neutrófilos de hombres presentan firmas genéticas características de neutrófilos inmaduros, lo que produce que los neutrófilos tengan una reducida respuesta a citocinas y tengan una menor capacidad de formar de NETs (Blazkova *et al.*, 2017). En cambio, los neutrófilos de mujeres presentan firmas genéticas características de neutrófilos maduros y una mayor cantidad de genes de respuesta a interferones de tipo I (ISG del inglés, *IFN stimulated genes*) modulando un fenotipo de activación que podría estar contribuyendo a una mayor capacidad de respuesta de los neutrófilos y al desarrollo de enfermedades autoinmunes (Gupta *et al.*, 2020).

Los neutrófilos de ambos sexos contienen receptores para estrógenos y andrógenos que pueden promover la activación de factores de transcripción para estimular una respuesta funcional, señalando que las hormonas sexuales pueden tener un efecto en la función de los neutrófilos (Hannah *et al.*, 2008; Straub, 2007). Aunque no se conocen todos los mecanismos mediante los cuales actúan las hormonas sexuales en neutrófilos, se ha observado que el estradiol puede beneficiar la actividad quimiotáctica, fagocítica e incrementa la capacidad de degranulación de neutrófilos de hembra (Klein & Flanagan, 2016) mientras que la progesterona incrementa el tiempo de vida de neutrófilos y disminuye su capacidad quimiotáctica (Spitzer & Zhang, 1996).

2) La proteína CD43

Las mucinas (MUC) son proteínas rígidas de alto peso molecular que contienen una gran cantidad de oligosacáridos unidos principalmente por una O-glicosilación en residuos de serinas o treoninas con N-acetilgalactosamina (GalNAc) y que están agrupados en estructuras repetidas en tándem. Las MUC pueden ser secretadas (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC9 y MUC19) por las células para recubrir los epitelios o pueden encontrarse de forma transmembranal (MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17 y MUC20) modulando la adhesión, renovación, polarización y diferenciación celular, además tienen la capacidad de señalizar, gracias a la presencia de su dominio intracelular (Tuccillo *et al.*, 2014). Una de las proteínas abundantes en la membrana de los leucocitos es la sialomucina CD43 (Aguilar *et al.*, 2006; Torres-Huerta *et al.*, 2017).

CD43, también conocida como leucosialina o sialoforina es una proteína integral de membrana (Carlsson *et al.*, 1986; Remold-O'Donnell, Zimmerman, *et al.*, 1987). Esta proteína está altamente glucosilada, es rica en ácido siálico y es muy

abundante en células hematopoyéticas, excepto en eritrocitos y linfocitos B en reposo (Carlsson *et al.*, 1986; Wikén *et al.*, 1988). Aunque inicialmente su presencia se asoció exclusivamente a los linajes hematopoyéticos, también se ha descrito su expresión en células no hematopoyéticas normales y tumorales (Amano *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2004). En los tumores la presencia de CD43 se asocia con un mal pronóstico debido a que prolonga la supervivencia y promueve la evasión de la muerte celular (Bravo-Adame *et al.*, 2016; Kadaja-Saarepuu *et al.*, 2008; Kadaja *et al.*, 2004; Vega-Mendoza *et al.*, 2021).

Originalmente CD43 fue descrita en leucocitos de pacientes del sexo masculino con síndrome recesivo Wiskott-Aldrich (WAS), una enfermedad que se caracteriza por infecciones recurrentes y eczema. En estos pacientes, CD43 se encuentra fenotípicamente defectuosa, y en un inicio se creía que era la responsable de la enfermedad (Remold-O'Donnell, *et al.*, 1984). Pero años después se describió a la proteína WASP como la responsable del WAS, la cual se encuentra codificada en el cromosoma X mientras que CD43 está codificada en el cromosoma 16 en humanos (Shelley *et al.*, 1990) y en el cromosoma 7 en ratones (Cyster *et al.*, 1990), descartando a CD43 como la responsable del WAS. No obstante, se ha propuesto que la forma aberrante de esta proteína en los pacientes con WAS podría estar favoreciendo a la actividad y escape de linfocitos T autorreactivos, los cuales estarían reconociendo antígenos propios en la piel y a su vez contribuyendo a la dermatitis tipo eczema de los pacientes con WAS (Khan *et al.*, 2008).

El gen de CD43 está compuesto por un intrón en la región 5' no codificante y dos exones de los cuales solamente el segundo exón codifica completamente a la proteína además de que el transcrito no sufre splicing alternativo (Cyster *et al.*, 1990; Pallant *et al.*, 1989; Shelley *et al.*, 1990). Transcripcionalmente, CD43 está regulado negativamente por la unión de los represores transcripcionales Pura y hnRNP-K al promotor de CD43 o por la metilación del mismo por parte de la MeCP2 (Del inglés, *Methyl CpG binding protein2*). En cambio, CD43 puede ser regulado positivamente por los factores de transcripción PyRo 1, PyRo 2 y Sp1, este último se une 40 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción promoviendo la transcripción (Kudo & Fukuda, 1994; Farokhzad *et al.*, 2000).

Como proteína, CD43 es una proteína transmembranal tipo I que consta de tres dominios: uno extracelular con 235 aminoácidos, uno transmembranal con 23 aminoácidos y uno intracelular con 123 aminoácidos (Shelley *et al.*, 1990). El dominio extracelular es rígido, alargado y sobresale ~45 nm de la membrana plasmática (Cyster *et al.*, 1991) (Figura 1.3). En este dominio se encuentran cinco repetidos en ándem de 18 aminoácidos cada uno, ricos en serinas y treoninas, la mayoría de las cuales están altamente O-GalNAc glicosiladas, de tal forma que este dominio presenta 70 a 85 cadenas de carbohidratos (Cyster *et al.*, 1991; Remold-O'Donnell^a, *et al.*,

1987). La abundancia de estos carbohidratos hace que constituyan cerca del 50 % del peso molecular. Entre los carbohidratos más abundantes se encuentra la galactosa, N-acetil-galactosamina y el ácido siálico (ácido N-acetil-neuramínico) (Remold-O'Donnell, *et al.*, 1987^a). La abundancia del ácido siálico le proporciona a la molécula una carga parcial negativa y de dichas características deriva su nombre sialoforina (Fukuda, 1991; Remold-O'Donnell^b, *et al.*, 1987). El dominio intracelular tiene un dominio rico en prolinas capaz de interactuar con proteínas con dominios SH3 como son las tirosin cinasas como Lck y Fyn (Pedraza-Alva *et al.*, 1996), así como varios residuos de serinas potencialmente fosforilables. El dominio intracelular de CD43 está altamente conservado entre especies (humano, chimpancé, perro, caballo, rata y ratón). Además, el dominio intracelular contiene sitios de localización nuclear (SLN) enmascarados por sitios de unión a proteínas de la familia ERM (Ezrina-Radixina-Moesina) y es indispensable para que la molécula pueda señalizar (Aguilar *et al.*, 2006) (Figura 1.3).

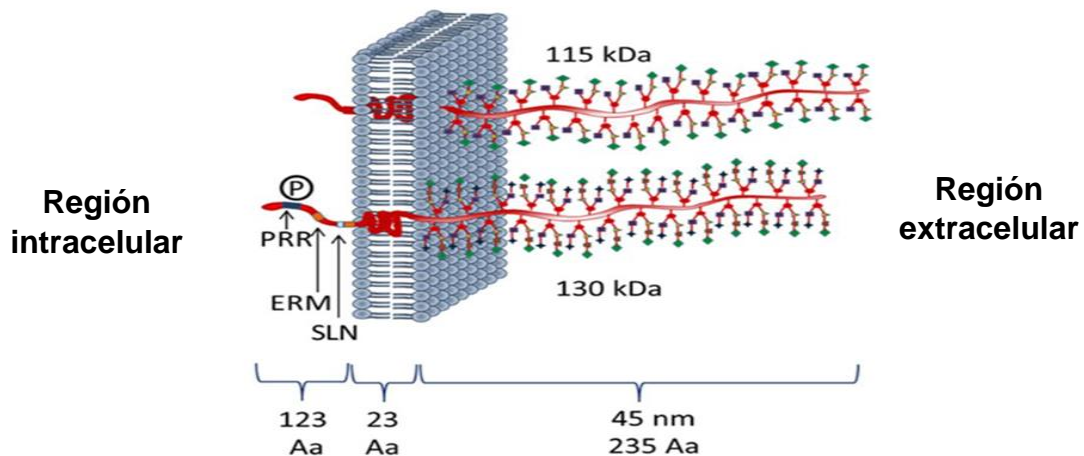


Figura 1.3. Estructura de la proteína CD43. Existen dos isoformas de CD43, distinguidas por su patrón de glicosilación, una de 115 KDa y 130 KDa. Ambas isoformas están compuestas por: un dominio extracelular con 235 aminoácidos, un dominio transmembranal de 23 aminoácidos y un dominio intracelular de 123 aminoácidos. El dominio intracelular contiene sitios de localización nuclear (SLN), sitios de unión a proteínas ERM (Ezrina-Radixina-Moesina) y una región rica en prolinas (PRR) (Torres-Huerta *et al.*, 2017).

Las modificaciones postraduccionales en los patrones de la O-glicosilación de CD43 definen dos isoformas, una isoforma de 115 KDa expresada en timocitos, linfocitos T CD4+ en reposo y monocitos, y otra de 130 KDa expresada en linfocitos T CD8+, linfocitos T CD4+ activadas, plaquetas, neutrófilos, linfocitos B activados y macrófagos (Carlsson *et al.*, 1986; Remold-O'Donnell^b, *et al.*, 1987) (Figura 1.3). La principal diferencia entre las isoformas de 115 KDa y 130 KDa, es la presencia de un Core-1 compuesto de un tetrasacárido NeuAc (α 2-3)-Gal (β 1-3) [NeuAc (β 2-6)] GalNAc y un Core-2 conformado de un hexasacárido ramificado NeuAc (α 2-3)-Gal (β 1-

3) [NeuAc (α 2-3) Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-6) GalNAc, respectivamente (Fukuda *et al.*, 1986; Fukuda, 2002). Las modificaciones de un Core-1 a un Core-2, se produce principalmente a través del incremento en la actividad β 1,6-N-acetilglucosaminiltransferasa Core-2 (Core2GlcNAcT) en el aparato de Golgi. El cambio de un Core a otro ha sido observado durante la activación de linfocitos T CD4⁺ y se piensa que este cambio de isoforma juega un papel importante en la diferenciación celular (Fukuda, 2002; Piller *et al.*, 1988).

Ligandos de CD43

Se han identificado múltiples ligandos para CD43, entre los cuales se incluyen, galectina-1, selectina-E, seroalbúmina humana (SAH), ICAM-1, el complejo principal de histocompatibilidad de tipo I (MHC-1), Siglec-1 y Siglec-7 (Baum *et al.*, 1995; Matsumoto *et al.*, 2005; Nathan *et al.*, 1993; Rosenstein *et al.*, 1991; Stöckl *et al.*, 1996; van den Berg *et al.*, 2001). Asimismo, puede participar como un PRR al reconocer determinadas moléculas de patógenos como la hemaglutinina del virus de la influenza A (VIA), la chaperona DnaK y Cpn60.2 de *M. tuberculosis*, la enterotoxina *heat-labile* y la mucinasa de *E. Coli*, y la sialidasa de *P. falciparum* (Hartshorn *et al.*, 1995; Hickey *et al.*, 2010; Szabady *et al.*, 2009; Zemelman *et al.*, 1989).

Esta capacidad de unirse a múltiples ligandos ha llevado a clasificar a CD43 como una proteína multifuncional involucrada en adhesión, supervivencia, proliferación, migración y activación celular (Kyoizumi *et al.*, 2004; Manjunath *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1991; Seveau *et al.*, 1997; Sperling *et al.*, 1995). Para realizar estas funciones, el dominio intracelular es indispensable debido a que dicho dominio es fundamental para que la molécula pueda señalizar (Allenspach *et al.*, 2001; Park *et al.*, 1991; Pedraza-Alva *et al.*, 1996; Torres-Huerta *et al.*, 2017).

CD43 como una molécula señalizadora y multifuncional

A partir de las señales intracelulares generadas por su dominio intracelular, CD43 actúa como una molécula co-estimuladora en linfocitos T (Park *et al.*, 1991). El entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular mediante anticuerpos monoclonales específicos produce el reclutamiento de cinasas de la familia Src (en particular Lck y Fyn), siendo que el dominio SH3 de estas cinasas reconoce la región rica en prolinas del dominio intracelular de CD43, conduciendo al reclutamiento y activación de las cinasas ZAP70, y subsecuentemente de PLC γ 2, generando una cascada de señalización en la que participan PKC- θ , ERK1/2, JUN, NF- κ B (Pedraza-Alva *et al.*, 1996, 1998; Santana *et al.*, 2000). Las señales de CD43 también activan

vías de señalización que involucran moléculas relacionadas con el metabolismo del linfocito, como es el caso de la isoenzima M2 de la piruvato cinasa (PKM-2) (Bravo-Adame *et al.*, 2016). En conjunto, estas señales llegarán al núcleo, induciendo la activación de factores de transcripción como NF- κ B, NFAT y AP-1 que darán como respuesta la síntesis de citocinas, reacomodos del citoesqueleto, proliferación o inclusive la sobrevida de la célula (Montufar-Solis *et al.*, 2005; Pedraza-Alva *et al.*, 1996; Santana *et al.*, 2000).

No es de extrañarse que en paralelo a la multiplicidad de ligandos de CD43, se hayan descrito múltiples funciones para esta molécula. Inicialmente se pensaba que CD43 era una molécula anti-adhesiva, debido a los primeros trabajos *in vivo*, con ratones CD43 silvestres y CD43^{-/-}, infectados con el virus vaccinia, en los que se reportaron una respuesta menos robusta por parte linfocitos CD8 y una mayor mortalidad de ratones silvestres respecto a ratones CD43^{-/-}, proponiendo que la carga negativa de CD43, así como su longitud y rigidez prevenía el contacto entre células WT (Manjunath *et al.*, 1995). Sin embargo, a pesar de que en condiciones normales CD43 se excluye de la sinápsis inmunológica en respuesta al reconocimiento del antígeno por el TCR, los experimentos de Delon *et al.* (2001) mostraron que cuando se fuerza a CD43 a permanecer en la sinápsis inmunológica entre un linfocito T y una APC, ésta es funcional y la activación celular se lleva cabo, objetando el papel inhibitorio de CD43 en las interacciones célula-célula (Delon *et al.*, 2001). Así mismo, la capacidad de CD43 de unirse a moléculas de adhesión como la E-selectina (Matsumoto *et al.*, 2005) e ICAM-1 (Rosenstein *et al.*, 1991), Siglec-1 (van den Berg *et al.*, 2001) y Siglec-7 (Yoshimura *et al.*, 2021) indican un papel de CD43 como una molécula importante para el reclutamiento, adhesión y migración de leucocitos. Algunos estudios *in vivo* concluyen que la deficiencia de CD43 afecta negativamente al reclutamiento y migración de las células T (Onami *et al.*, 2002) o incluso favorecen la migración de los leucocitos (Matsumoto *et al.*, 2008; Velázquez *et al.*, 2016).

Además de los linfocitos T en los que también participa en la adhesión/migración, CD43 funciona como una molécula coestimuladora, independiente de la actividad de CD28 (Sperling *et al.*, 1995), las señales dependientes de CD43 aumentan la efectividad de respuesta de otras células del sistema inmune, como ocurre en los linfocitos NK, células en las que se ha observado que el entrecruzamiento de CD43 con un anticuerpo anti CD43, resulta en una mayor actividad citotóxica (Vargas-Cortes *et al.*, 1988).

En particular, en neutrófilos, las señales de CD43 favorecen la agregación homotípica, sugiriendo que participa en la regulación de la adhesión entre leucocitos y la matriz extracelular mediante integrinas (Kuijpers *et al.*, 1992). Además, de los linfocitos T, CD43 puede ser relocalizado en los urópodos de los neutrófilos, un movimiento orquestado por el relajamiento de la interacción de CD43 con las proteínas

ERM (Ezrina, radxina y moesina) las cuales a su vez interactúan con la actina (Allenspach *et al.*, 2001; Seveau *et al.*, 1997)

CD43 y neutrófilos

La abundancia de CD43 en la membrana del neutrófilo (Rieu *et al.*, 1992), sugiere un papel importante en la fisiología de estas células. Acorde con las funciones descritas para linfocitos, en neutrófilos se ha identificado la participación de CD43 durante el reclutamiento y adhesión celular (Velázquez *et al.*, 2016), la polarización celular mediante la formación de urópodos (Johnson *et al.*, 1999; Seveau *et al.*, 1997) y durante la migración inducida por galectina-1 (Auvynet *et al.*, 2013).

Además, en neutrófilos se ha reportado que CD43 es un receptor de la hemaglutinina del virus de la influenza A (VIA), inclusive proponiendo que esta interacción pudiera inactivar a los neutrófilos durante la infección por VIA (Hartshorn *et al.*, 1995). Algo similar, ha sido reportado durante la interacción de la mucinasa de *E. coli* con el neutrófilo, ya que la mucinasa puede cortar la región extracelular de CD43 alterando la adhesión, retención y activación de los neutrófilos de pez cebra en los sitios de infección (Szabady *et al.*, 2009). Otro reporte de procesamiento de CD43 en neutrófilos es el que resulta de la exposición de neutrófilos humanos a estímulos (como fMLP, Zymosan, PMA o TNF- α) que inducen un corte del dominio extracelular de la molécula de aproximadamente el 70%, mediante dos posibles cortes proteolíticos por parte de la elastasa. El primer corte proteolítico es cercano a la región N-terminal de la proteína y el segundo corte es cercano a la membrana plasmática (Remold-O'Donnell & Parent, 1995). Estos cortes liberan el dominio extracelular de CD43 hacia el medio extracelular y el plasma en un fragmento conocido como Galgp. Aunque no se tiene evidencia directa, se piensa que la Galgp, una galactoglicoproteína muy abundante en el suero humano de individuos sanos (Schmid *et al.*, 1992) proviene justamente de neutrófilos, ya que son los leucocitos más abundantes de la sangre. La función de Galgp aún es desconocida, y tampoco se sabe cuál es el disparador de este proceso en salud, ni como varía la concentración de Galgp en enfermedad.

Aunque se desconoce, el procesamiento de CD43 parece estar asociado a un incremento de la capacidad del estallido respiratorio, así como a favorecer la adhesión y la migración hacia los tejidos (Campanero *et al.*, 1991; Remold-O'Donnell & Parent, 1995). Se ha reportado que en neutrófilos de humano, la unión de seroalbúmina humana al dominio extracelular de CD43, previene la proteólisis por la elastasa de neutrófilo, evitando que se lleven a cabo los eventos mencionados anteriormente y por lo tanto modulando la actividad del neutrófilo (Nathan *et al.*, 1993; Rieu *et al.*, 1992).

3) Antecedentes

Si bien la mayoría de los trabajos relacionados con CD43 se han enfocado y estudiado ampliamente en linfocitos, la participación de CD43 en otros leucocitos, en particular los neutrófilos han sido poco explorada. Como se mencionó en la sección anterior, nuestro grupo (Auvynet *et al.*, 2013) demostró que la galectina-1, uno de los ligandos descritos para CD43 (Baum *et al.*, 1995), tiene un efecto quimiotáctico sobre los neutrófilos humanos, promoviendo su migración a favor de un gradiente de concentración de la galectina-1. Además, en una serie de experimentos piloto en un modelo murino de psoriasis inducido por Imiquimod en el que los queratinocitos, los linfocitos T y los neutrófilos participan de manera importante en el establecimiento de las lesiones en la piel, se encontró que los ratones CD43 KO, en comparación con los ratones CD43 WT, presentan lesiones más severas en la piel, además de un incremento de leucocitos en sangre periférica, resaltando la proporción de neutrófilos (Ivan Carranza, Tesis de Maestría, resultados no publicados).

Considerando que los neutrófilos constituyen la primera línea de defensa en contra de infecciones causadas por hongos y bacterias además de ser importantes mediadores de la inflamación aguda e inflamación crónica como ocurre en el caso de las enfermedades autoinmunes. En este trabajo pretende se estudiar los mecanismos efectores de neutrófilos en ratones deficientes de CD43 con la finalidad de conocer cómo esta molécula afecta a la fisiología del neutrófilo.

II Hipótesis

La deficiencia de CD43 alterará los mecanismos efectores de los neutrófilos, tales como el estallido respiratorio y la capacidad de formación de NETs, de forma sexo-específica.

Objetivo general

Determinar el papel de CD43 en la inducción de estallido respiratorio y formación de NETs en función del sexo.

Objetivos particulares

1. Estandarizar un método de purificación de neutrófilos para realizar los experimentos considerados.
2. Comparar la producción de ROS de los neutrófilos de ratones WT y CD43 KO, machos y hembras.
3. Determinar la formación de NETs de los neutrófilos de ratones WT y CD43 KO, machos y hembras.
4. Evaluar la proporción y maduración de las subpoblaciones de neutrófilos en médula ósea de ratones WT y CD43 KO, machos y hembras.

III Materiales y métodos

Las especificaciones referentes a los reactivos y materiales utilizados en este trabajo se encuentran en el apéndice I.

1) Animales

Se utilizaron ratones adultos macho y hembra de la cepa C57BL/6 WT y CD43 KO de 16 a 24 semanas de edad. Los animales fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales estuvieron bajo ciclos de luz/obscuridad de 12/12 horas, en un rack ventilado con un suministro de agua y comida *ad libitum*. Todos los procedimientos realizados fueron llevados a cabo respetando los lineamientos del uso de animales del Comité de Bioética del Instituto de Biotecnología. Todos los animales fueron fenotipificados mediante citometría de flujo empleando un anticuerpo anti-CD43.

2) Obtención de neutrófilos a partir de sangre periférica y médula ósea

Con la finalidad de purificar neutrófilos de sangre y médula ósea de ratón, se emplearon diferentes métodos de purificación para cada reservorio de neutrófilos. Dichos métodos se describen a continuación:

2.1 Purificación de neutrófilos de sangre periférica por gradiente de densidad

2.1.1 Método Dextran-Histopaque

Se obtuvo la sangre periférica de cinco ratones mediante punción cardíaca con una aguja 21 x G en una jeringa de 10 mL que contenía 10 UI/mL de heparina sódica. La sangre (~7 mL) fue combinada en un tubo cónico de 15 mL con 2 mL de dextran 500 al 6 % en PBS. El tubo fue invertido 3 veces y se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente, durante este tiempo el dextran 500 favoreció la sedimentación de los eritrocitos de manera que se formaron dos fases, una fase rica en eritrocitos y otra fase rica en plasma y leucocitos. Esta última se colocó en una proporción 1:1, sobre 5 mL de Histopaque (densidad de 1.077 g/mL) en un tubo cónico de 15 mL, y el tubo se centrifugó durante 30 minutos a 500 x g (sin freno). Se desechó el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en 100 µL de Red Blood Cell Lysing Buffer Hybri-Max durante 1 minuto, transcurrido ese tiempo se agregó 10 mL de PBS frío, y se centrifugó de nuevo el tubo a 430 x g durante 7 minutos. De nuevo se

desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 mL de PBS frío (Boyum, 1968). Se contó el número de células, se determinó la viabilidad celular con azul tripano y se verificó la pureza mediante citometría de flujo (BD FACs Canto II), evaluando el porcentaje células positivas a los anticuerpos anti-Ly6G⁺ y CD11b⁺.

2.1.2 Polymorphprep

En un tubo cónico de 15 mL, la sangre obtenida de cuantos ratones se depositó inmediatamente en una proporción 1:1, sobre 5 mL de Polymorphprep (densidad de 1.113 g/mL). Enseguida se centrifugó el tubo a 500 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente (sin freno). Posteriormente, se recuperó la segunda interfase formada entre el Polymorphprep y la sangre, y se colocó en un tubo cónico de 15 mL, y se agregó 5 mL de PBS frío para finalmente centrifugar el tubo a 430 x g durante 7 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se desechó el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en 100 µL de Red Blood Cell Lysing Buffer Hibri-Max durante 1 minuto, y posteriormente se llevó el volumen a 5 mL con PBS frío. De nuevo se centrifugó el tubo a 430 x g durante 7 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se desechó el sobrenadante y se agregó 1 mL de PBS frío al botón celular (Ferrante & Thong, 1980). Se contó el número de células, se determinó la viabilidad celular, y se verificó la pureza mediante citometría de flujo.

2.2 Purificación de neutrófilos de médula ósea por gradiente de densidad

El procedimiento se describe para dos fémures y dos tibias de cada ratón. Todos los huesos fueron desinfectados con etanol al 70%, y lavados con RPMI 1640 suplementado solamente con penicilina/estreptomicina/glutamina (PSG).

Se cortó la epífisis de cada extremo de los huesos, cada par de huesos fue colocado dentro de tubos cónicos estériles de 0.6 mL perforados en el fondo, y sobrepuestos sobre tubos cónicos estériles de 1.5 mL que contenían 400 µL de PBS estéril. Inmediatamente, los tubos se centrifugaron en una microcentrífuga a 2 500 x g velocidad durante 1 minuto. Posteriormente, en condiciones estériles los huesos y el sobrenadante se desecharon, y el botón celular se resuspendió con 500 µL de Red Blood Cell Lysing Buffer Hibri-Max durante 1 minuto, y se transfirió a un tubo cónico de 15 mL, en donde se llevó el volumen a 5 mL con RPMI 1640 frío. Se centrifugó el tubo a 430 x g durante 7 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se desechó el sobrenadante, y el botón celular fue resuspendido en 3 mL de PBS frío. En un tubo cónico de 15 mL se colocaron 3 mL de Histopaque (densidad de 1.119 g/mL), seguido de 3 mL de Histopaque (densidad 1.077 g/mL), y por último se colocaron los 3 mL de la suspensión celular de médula ósea, formando 3 fases sin mezclar, quedando la proporción entre las diferentes fases 1:1:1. Inmediatamente se centrifugó el tubo a 870 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente (sin freno). Posteriormente, se recuperó la interfase formada entre el Histopaque de 1.077 g/mL y el de 1.119 g/mL.

Esta interfase fue colocada en un tubo cónico de 15 mL y fue resuspendida en 10 mL de RPMI 1640 frío, enseguida se centrifugó el tubo a 430 x g durante 7 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 2 mL de PBS frío. Se contó el número de células y se evaluó la viabilidad celular con azul tripano. Por último, se verificó la pureza mediante citometría de flujo.

3) Selección negativa de neutrófilos a partir de médula ósea

Una vez definido que el reservorio sería la médula ósea a partir del cual se obtendrían los neutrófilos, las células purificadas del gradiente de densidad fueron enriquecidas mediante selección negativa de un kit de aislamiento de neutrófilos, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Finalmente, se evaluó la pureza mediante citometría de flujo de acuerdo con el procedimiento anteriormente descrito.

4) Análisis de pureza, subpoblaciones de neutrófilos Ly6G^{Lo}/Ly6G^{Hi}, y de los receptores de quimiocinas CXCR2 y CXCR4 mediante citometría de flujo

Una vez obtenidas las fracciones correspondientes a neutrófilos, se procedió a evaluar la pureza de neutrófilos y la cantidad de CD43. Se colocaron 5×10^5 células por tubo de citometría de flujo. A cada tubo se le agregó 3 mL de solución de FACS (Apéndice I), los tubos fueron centrifugados a 430 x g durante 7 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en 50 μ L de solución de bloqueo (0.5 μ g del anticuerpo anti CD16/32 con suero de caballo al 20% en solución de FACS). Se incubaron las muestras durante 20 minutos a 4°C, transcurrido ese tiempo a cada tubo se le agregó 50 μ L de la solución de FACS o 50 μ L de la mezcla de los anticuerpos anti-CD43 acoplado a APC o -Ly6G acoplado a AF488, -CD11b acoplado a APC, -CXCR2 acoplado a PE y -CXCR4 acoplado a BV421. De nuevo se incubaron los tubos durante 30 minutos a 4°C. Una vez completado el tiempo de incubación, se agregaron 3 mL de solución de FACS y los tubos se centrifugaron a 430 x g durante 7 minutos a temperatura ambiente. Se desecho el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en 200 μ L de paraformaldehído (PFA) al 1 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo BD FACSCanto II (BD Biosciences). Se capturaron 10 000 eventos por muestra.

El análisis completo se realizó en el software FlowJo 10.7.1. La estrategia de análisis para determinar la pureza se muestra en la Figura 3.1. A partir del *dot plot* mostrado en la figura 3.1A, se seleccionó en un *gate* a la región correspondiente a células mononucleares y granulocitos, posteriormente se seleccionaron *single cells* para eliminar agregados de células y falsos positivos (Figura 3.1B). Posteriormente, la pureza se obtuvo del porcentaje de los eventos positivos a Ly6G⁺ y CD11b⁺ considerados como neutrófilos (Figura 3.1C). Finalmente, las subpoblaciones de neutrófilos Ly6G^{Lo} y/o Ly6G^{Hi} fueron analizadas a partir del *gate* de neutrófilos comparando el marcador Ly6G contra la complejidad de las células (SSC-A) delimitando a dos poblaciones Ly6G^{Lo} y Ly6G^{Hi} (Figura 3.1D). A partir de ambas subpoblaciones se evaluó el porcentaje de los neutrófilos Ly6G^{Lo} y/o Ly6G^{Hi} positivos a los receptores de quimiocinas CXCR2 y CXCR4 (Apéndice II-5). Las subpoblaciones de neutrófilos fueron analizadas a partir de neutrófilos purificados o muestras de médula ósea. La cantidad de CD43 fue representada como la intensidad media de fluorescencia (IMF) de APC a partir de las *single cells* (Figura 3.1B).

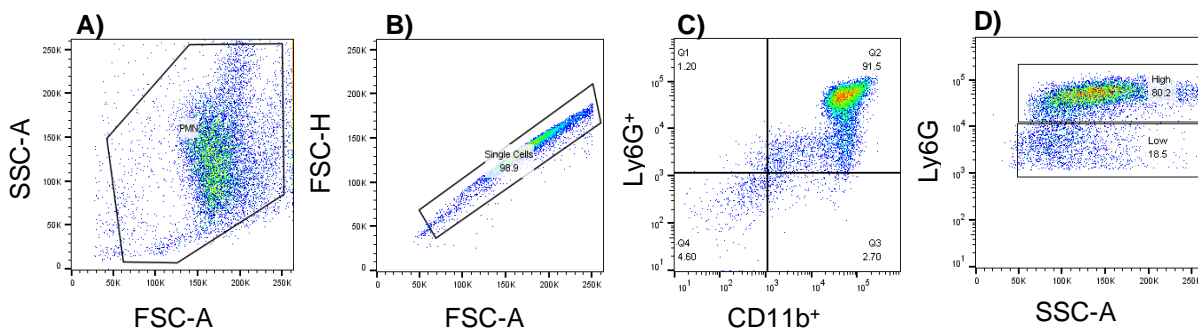


Figura 3.1. Estrategia análisis para la pureza de neutrófilos y subpoblaciones de neutrófilos. A) Se muestra el *dot plot* de las células obtenidas a partir de cada método de purificación, en dicho *dot plot* de acuerdo con el SSC vs FSC se seleccionaron las células correspondientes a células mononucleares y granulocitos. B) Selección de *single cells*. C) Pureza de neutrófilos a partir de la muestra considerando solo a células positivas a Ly6G⁺ y CD11b⁺ D) Subpoblaciones de neutrófilos delimitados por el marcador Ly6G vs la complejidad celular SSC-A.

5) Producción de ROS

Para estudiar la producción de ROS se empleó el método propuesto por Walrand *et al.* (2003), empleando el colorante dihidroetidio (DHE), un compuesto no fluorescente que puede difundir en la membrana plasmática de células vivas. Una vez en el citoplasma de la célula, puede ser oxidado por el anión superóxido (O₂⁻) o el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), generándose un cambio en su estructura química, y

transformándose a 2-hidroxietidio (HE), un compuesto con la capacidad de emitir fluorescencia (ex/em 488/606 nm).

Los neutrófilos de médula ósea purificados (5×10^6 /tubo), fueron resuspendidos en 100 μ L de PBS o en 100 μ L de DHE (5 μ M en PBS). Los tubos con los neutrófilos fueron incubados durante 30 minutos a 37°C en completa oscuridad. Trascurrido el tiempo de incubación, se agregaron 2 mL de PBS y los tubos se centrifugaron a 430 x g durante 7 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y se agregó PMA (120 nM en 200 μ L de PBS) o 200 μ L de PBS, y los tubos fueron incubados durante 40 minutos a 37°C en completa oscuridad. Después, a cada tubo se le agregó 3 mL de PBS y los tubos se centrifugaron a 430 x g durante 7 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se desechó el sobrenadante, y el botón celular fue resuspendido en 200 μ L de PFA al 1% durante 30 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual el PFA fue remplazado por PBS. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo BD FACSCanto II. El análisis completo se realizó en el software FlowJo 10.7.1. La estrategia de análisis para estos ensayos se muestra en la Figura 3.2. A partir del *dot plot* mostrado en la figura 3.2 A, se seleccionó a la región correspondiente a neutrófilos sin tratamiento y tratados con PMA; se seleccionaron *single cells* para eliminar agregados de células (Figura 3.2 B) y se evaluó la fluorescencia de HE en cada uno de los tubos. Los resultados se muestran como la intensidad media de fluorescencia integrada (il.M.F ROS), obtenido de la siguiente fórmula [(frecuencia de células HE⁺) (IMF HE)] (Figura 3.2 C).

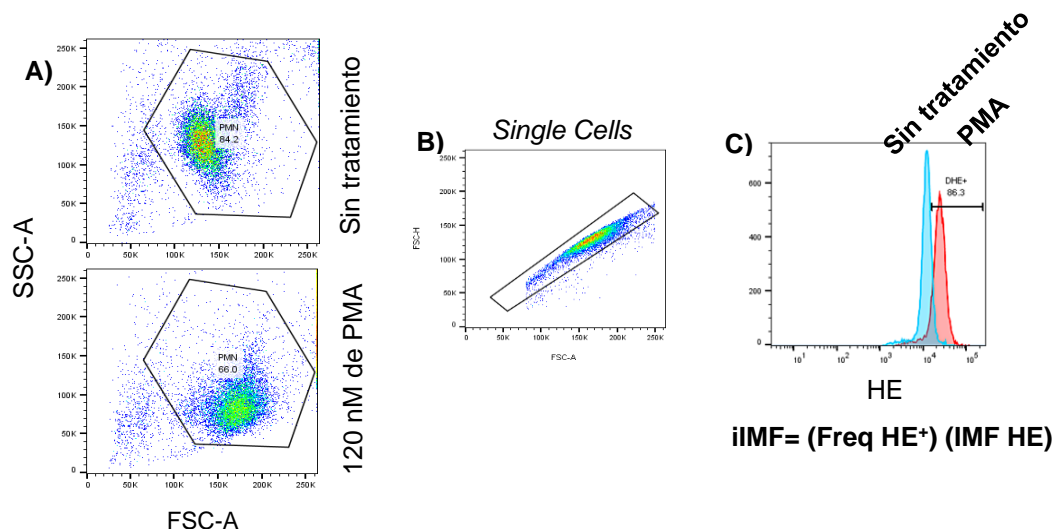


Figura 3.2. Estrategia análisis para la producción de ROS. A) Se muestra el *dot plot* a partir del cual se hizo el *gate* de células teñidas con DHE sin tratamiento (arriba) y con 120 nM de PMA (abajo). B) Selección de *single cells*. C) producción de ROS en neutrófilos sin tratamiento respecto a neutrófilos tratados con 120 nM de PMA, a partir de ambos histogramas se graficó la il.M.F.

7) Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como promedio \pm desviación estándar. La comparación entre múltiples grupos fue realizada mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Tukey. Fue considerado estadísticamente significativo un valor de $P < 0.05$. Todos los datos fueron analizados en el programa Prisma Graph 6.

IV Resultados

1) Selección del método de purificación de neutrófilos

Se evaluaron tres métodos con la finalidad de seleccionar el mejor método para aislar suficientes neutrófilos en términos de cantidad de células y pureza de la población deseada, así como para definir el compartimento (sangre o médula ósea) a partir del cual se purificarían para abordar los objetivos planteados.

En el caso de sangre periférica se compararon los métodos de Dextran-Histopaque de 1.077 g/mL y Polymorphprep de 1.113 g/mL, siendo ambos métodos los más utilizados para aislar neutrófilos humanos a partir de sangre periférica (Boyum, 1968; Ferrante & Thong, 1980). Para aislar neutrófilos de la médula ósea, se empleó el método de separación con Histopaque de dos densidades (1.077 y 1.119 g/mL) uno de los métodos empleados para aislar neutrófilos de ratón (Swamydas *et al.*, 2015), seguido o no de un paso de purificación por selección negativa. Los resultados obtenidos se resumen en la figura 4.1.

I)

Método	Reservorio	Células obtenidas	Viabilidad	Pureza
Histopaque 1.077	Sangre	~ 1x10 ⁶	~ 70 %	16.4 %
Polymorphprep 1.113	Sangre	~ 1x10 ⁶	~ 90 %	67.4 %
Histopaque 1.077 /1.119 (Enriquecimiento)	Médula ósea	~3.5 x10 ⁶	> 95 %	76.6 ± 0.1 %
Enriqueciendo + Selección negativa	Médula ósea	~2.8 x10 ⁶	~ 95 %	95.9 ± 2 %

II)

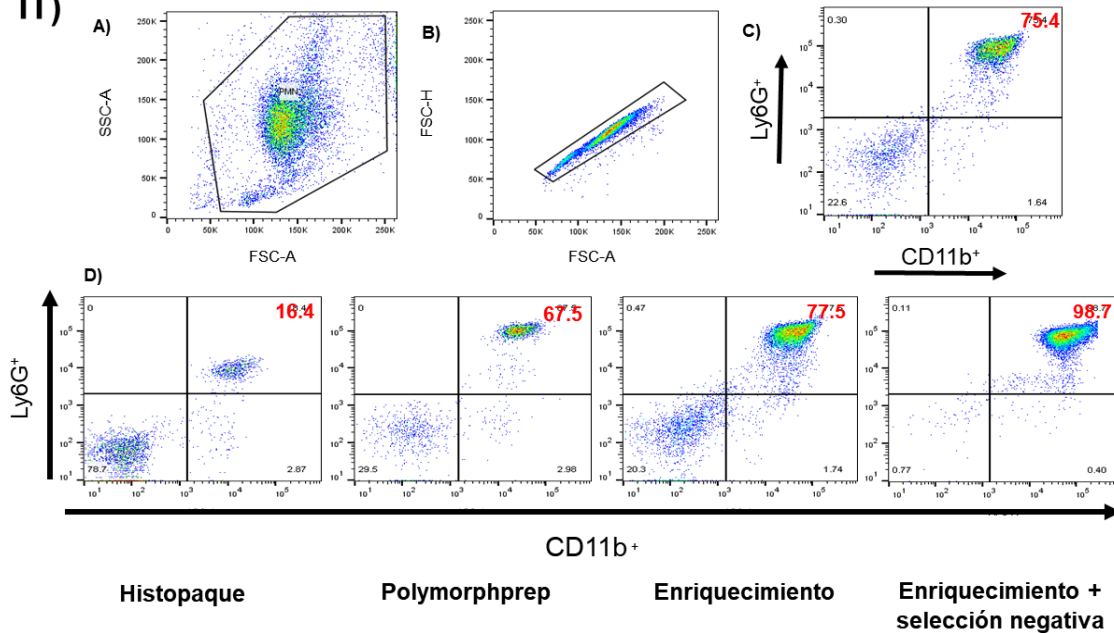


Figura 4.1. El método de enriquecimiento seguido de la selección negativa de neutrófilos es el método más eficiente para purificación de neutrófilos. I) Comparación entre métodos de purificación de neutrófilos de sangre periférica y médula ósea de ratones macho y hembras C57BL/6, WT y CD43KO (16-24 semanas de edad). Para obtener neutrófilos de sangre periférica se empleó un gradiente de densidad (Histopaque 1.077 o Polymorphprep 1.113) a partir de un pool de 5 mL de sangre de cinco ratones. Para aislar neutrófilos de médula ósea se empleó un ratón por experimento, y se realizó un paso de enriquecimiento con un doble gradiente de densidad (Histopaque 1.077/1.119) o alternativamente, se combinó el paso de enriquecimiento seguido de un paso de selección negativa de neutrófilos. El número de células y el porcentaje de viabilidad evaluaron con azul de tripano; la pureza se evaluó por citometría de flujo, considerando a las células Ly6G⁺ y CD11b⁺ como neutrófilos.

Los resultados señalan que los dos métodos empleados para obtener neutrófilos a partir de sangre periférica son poco efectivos, debido a que se obtuvo una menor pureza y un menor rendimiento de células comparado con el método utilizado para obtener neutrófilos de médula ósea. Además, la obtención de neutrófilos de sangre requiere un mayor número de ratones en comparación con el método de médula ósea. Por esta razón, se optó por enriquecer la población de neutrófilos a partir de las células de médula ósea de ratón mediante el método de Histopaque de dos densidades seguido de un paso de selección negativa (Swamydas *et al.*, 2015), alcanzando una pureza > 95%, con un rendimiento y la pureza semejantes entre fenotipos, y entre sexos (Apéndice II-1). Además, la cantidad de CD43 fue semejante entre sexos al emplear este método de purificación (Apéndice II-2).

2) Existe un dimorfismo sexual en la producción de ROS de neutrófilos de machos y hembras, y la ausencia de CD43 afecta la generación de ROS de manera sexo-dependiente

Las ROS son una herramienta con la que los neutrófilos eliminan a los microorganismos que ingieren por fagocitosis. Se evaluó la producción de ROS en neutrófilos de ratones C57BL/6 WT y CD43 KO, machos y hembras, en respuesta a un estímulo de un activador de la NADPH oxidasa, PMA (120nM), por 40 minutos a 37° C y se midió la fluorescencia de DHE por citometría de flujo.

Los resultados obtenidos muestran que, en condiciones basales, la producción de ROS de los neutrófilos de ratón WT y CD43 KO de ambos sexos es muy baja y es similar. En cambio, en respuesta al estímulo con PMA, los neutrófilos tienen una producción de ROS en función del sexo del ratón, evidenciando el dimorfismo sexual que se ha reportado entre los neutrófilos de machos y hembras del mismo fenotipo, y entre ratones WT y CD43 KO del mismo sexo. Por otra parte, la ausencia de CD43 repercute en generación de ROS de los neutrófilos de manera sexo-dependiente, haciendo que los neutrófilos de macho KO produzcan significativamente menos ROS que los de ratones macho WT, mientras que los neutrófilos de hembras CD43 KO generan más ROS que los de hembras WT (Figura 4.2).

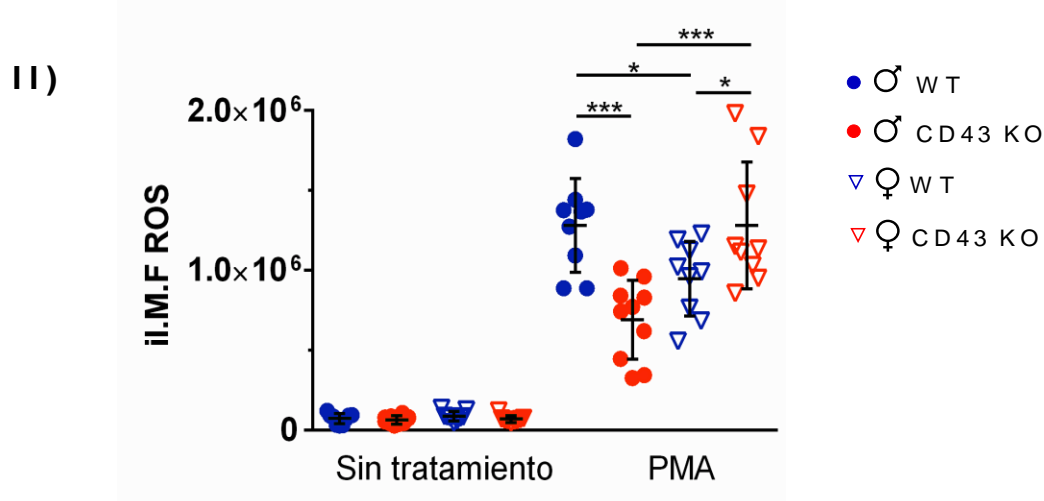
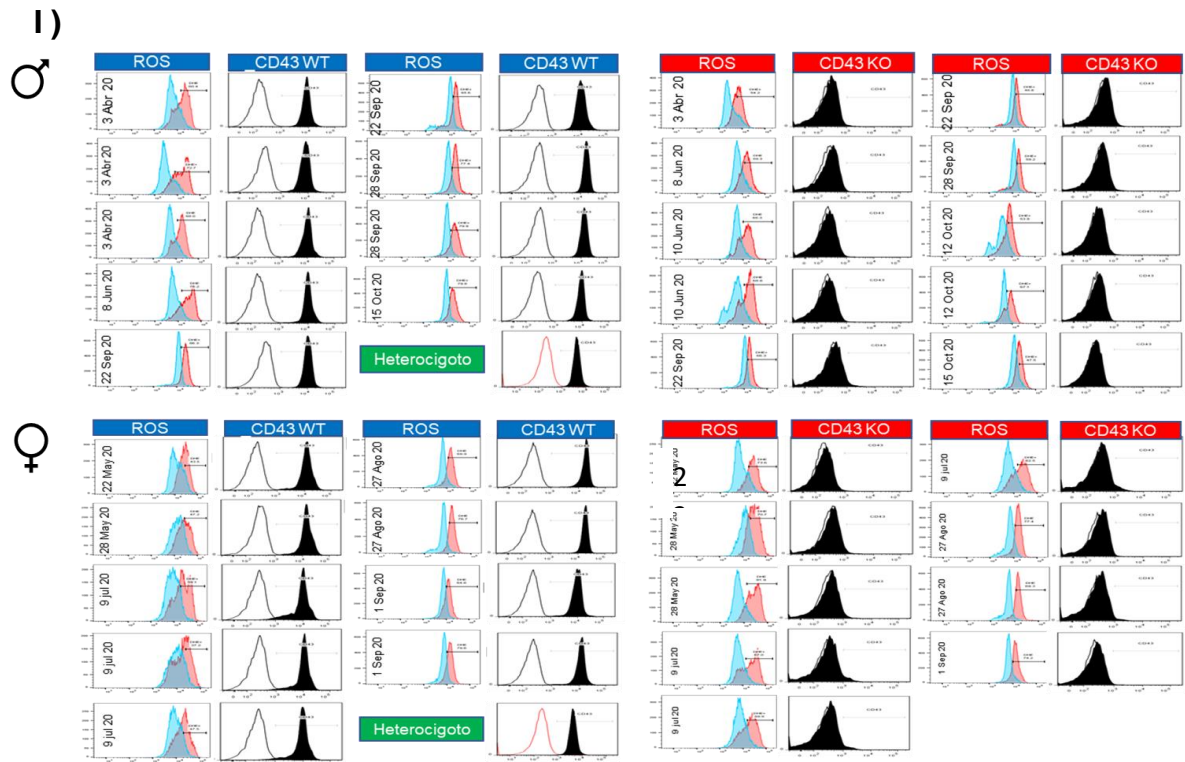


Figura 4.2. La ausencia de CD43 modifica la producción de ROS en neutrófilos de médula ósea con un efecto ligado al dimorfismo sexual. Los neutrófilos purificados de médula ósea de ratones C57BL/6 machos y hembras, WT y CD43 KO marcados con dihidroetidio (DHE, 5 μ M), y fueron estimulados o no con 120 nM de PMA durante 40 minutos a 37°C y 5 % CO₂. La producción de ROS fue evaluada con un citómetro FACsCanto II (ex/em 488/606 nm), el análisis se realizó con el software FlowJo. I) Se muestran los histogramas de la producción de ROS de los neutrófilos tratados con PMA (rojo) o sin tratar (azul), también se observa el fenotipo de cada ratón (histograma sin rellenar: células sin teñir; histograma sólido: tinción para CD43); se incluye un heterocigoto como referencia. II) La producción de ROS se presenta como la il.M.F ROS [(% de células DHE⁺) (IMF DHE⁺)]. Cada punto representa un ratón (n= 9 machos y n= 10 hembras). Se indica promedio \pm desviación estándar. ***p<0.0002, *p<0.05 ANOVA prueba post hoc Tukey.

3) La formación de NETs es distinta en neutrófilos de ratón CD43 KO respecto a los neutrófilos de ratón WT de manera dependiente del sexo

Cuando los neutrófilos son reclutados al sitio de infección, pueden fagocitar a los microorganismos y matarlos intracelularmente, produciendo ROS. Alternativamente, tienen la capacidad de contener a los microorganismos en el espacio extracelular, produciendo las llamadas trampas extracelulares de neutrófilos o NETs, las cuales consisten en cromatina decorada de péptidos antimicrobianos y proteasas. Como en el caso de las ROS, se evaluó la capacidad de formación de NETs en neutrófilos de ratones C57BL/6 WT y CD43 KO, machos y hembras, en respuesta a un estímulo de PMA (120nM) por 4 horas a 37° C, evaluando el área ocupada por la cromatina.

La incubación de los neutrófilos de machos o hembras WT o CD43 KO en medio de cultivo, en ausencia de estímulo, no provoca la formación de NETs, observando que las células están íntegras (Apéndice II-3) y sus núcleos conservan la cromatina altamente condensada y una forma anillada con segmentos característica de neutrófilos de ratón (Figura 4.3, sección I A-D). En cambio, en presencia de PMA, al cabo de 4 horas se observa que las células perdieron la integridad de su membrana (Apéndice II-3), además el núcleo de las células perdió la forma anillada del núcleo, acompañado de una descondensación de la cromatina y material genético se encuentra disperso formando una especie de “nube” (Figura 4.3, sección II E-H), dos eventos característicos de la formación de NETs (Brinkmann *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2007).

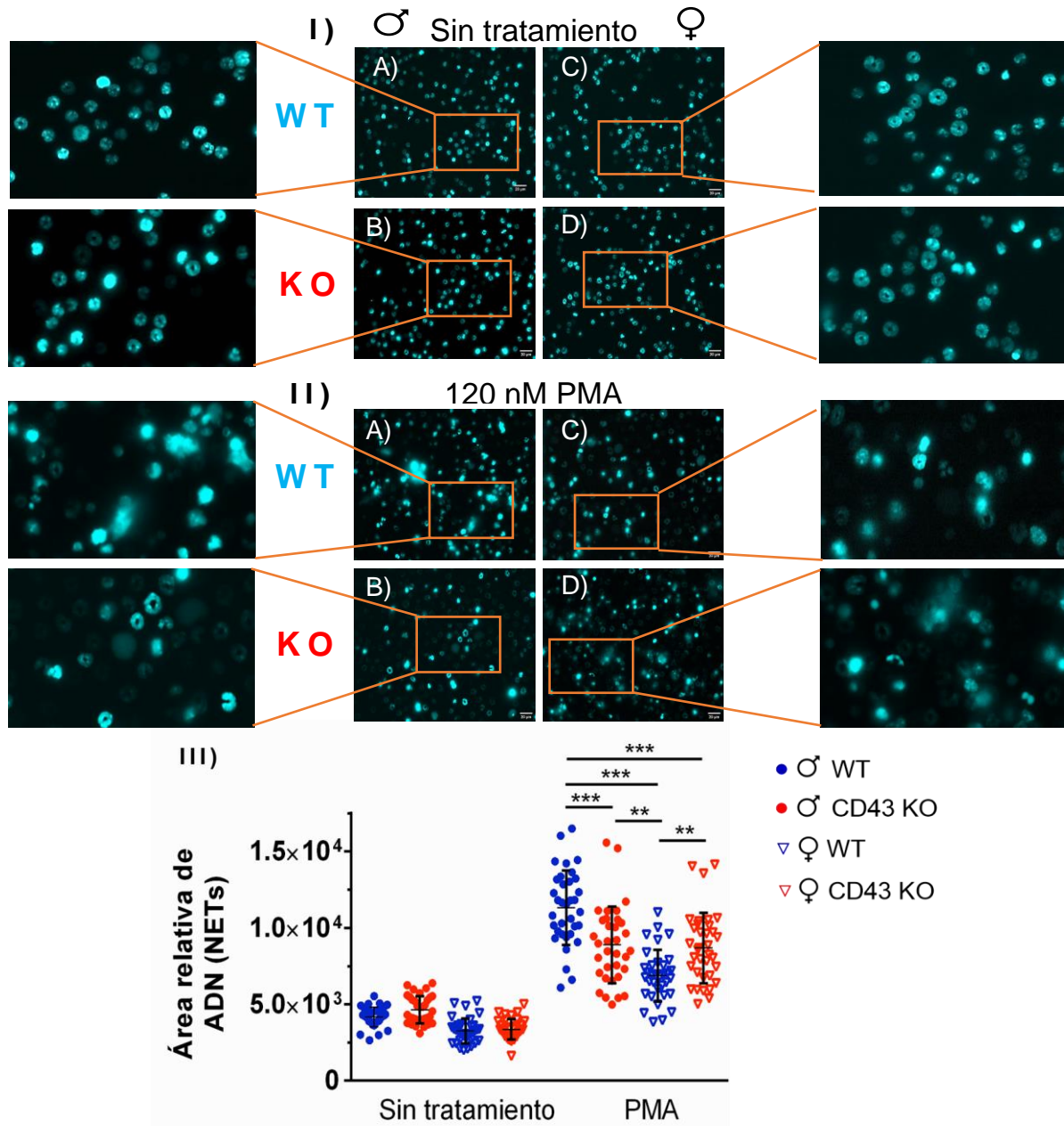


Figura 4.3. La ausencia de CD43 afecta a la formación de NETs de neutrófilos, con un efecto asociado al sexo. Los neutrófilos de médula ósea de ratones C57BL/6 machos y hembras, WT y CD43 KO se estimularon o no con 120 nM de PMA durante 4 horas a 37°C y 5 % CO₂, después de lo cual las células se tiñeron con DAPI (1 nM). La formación de NETs se observó con un microscopio invertido de fluorescencia (Olympus IX81, iluminación CoolLED pE-2, cámara Photometrics Roper CoolSnap Monochromatic, aumento 600X). **I)** Los neutrófilos sin tratamiento de (A) macho WT, (B) macho CD43 KO, (C) hembra WT y, (D) hembra CD43 KO, no forman NETs. **II)** (A) neutrófilos de macho WT; (B) neutrófilos de macho CD43 KO; (C) neutrófilos de hembra WT; (D) neutrófilos de hembra CD43 KO, tratados con 120 nM de PMA. La barra representa 20 μ M. **III)** Área ocupada por la cromatina extracelular de los neutrófilos tratados o no con 120 nM de PMA. El análisis de las imágenes se realizó con el software ImageJ. Cada punto representa una microfotografía (n=35 imágenes obtenidas a partir de 7 ratones). Se indica promedio \pm desviación estándar. ****p<0.0001, **p<0.05 ANOVA prueba post hoc Tukey.

El área ocupada por la cromatina extracelular de los neutrófilos de ratones macho o hembras, WT o CD43 KO sin tratamiento es muy similar (Figura 4.3. sección III), observándose muy poca cromatina extracelular. La adición de PMA detonó la formación de NETs en los neutrófilos. La comparación entre sexos mostró que los machos silvestres producen mas NETs que las hembras sivistres, no asi entre macho y hembras CD43KO. La comparación entre fenotipos muestra que los neutrófilos de ratones machos CD43 KO liberaron menos cromatina que los de ratones WT, mientras que los neutrófilos de hembras CD43 KO liberan mas cromatina que los neutrófilos de hembras WT (Figura 4.3, sección III), en consistencia con lo observado en la capacidad de produccion de ROS En conjunto, estos resultados apoyan un dimorfismo sexual en la producción de NETs y son consistentes con lo observado en la producción de ROS y con las diferencias funcionales entre neutrófilos de WT y CD43 KO de manera sexo-dependiente.

4) Independientemente del fenotipo las hembras tienen una mayor proporción de neutrófilos inmaduros y estos tienen un mayor diámetro que los neutrófilos de machos

Al observar las imágenes de los neutrófilos incubados solo con medio de cultivo (en ausencia de PMA), de los experimentos descritos en la sección anterior (Figura 4.3, sección I), se detectaron células con núcleos pequeños, segmentados y condensados, y células con núcleos grandes, poco segmentados y menos condensados (Figura 4.4, sección I). Acorde a la literatura, las células con núcleos pequeños corresponden a células maduras, mientras que las células con núcleos grandes corresponden a células inmaduras (Biermann *et al.*, 1999; Evrard *et al.*, 2018). Asimismo, se encontró que el diámetro de las células de aspecto inmaduro de hembras fue mayor que el de las células de aspecto inmaduro de machos (Figura 4.4, sección II), y no se encontraron diferencias en el diámetro de las células al comparar entre fenotipos.

Además de encontrar que las células de aspecto inmaduro tienen un mayor diámetro en hembras que en machos, también se observaron diferencias en las proporciones de estas subpoblaciones, encontrando más neutrófilos inmaduros (Ly6G^{Lo}) y menos neutrófilos maduros (Ly6G^{Hi}) en hembras que en machos (Figura 4.4, sección III). Aunado a lo anterior, las hembras CD43 KO tienen un mayor porcentaje de neutrófilos maduros y menos neutrófilos inmaduros que las hembras WT, mientras que en los machos WT y CD43 KO, los porcentajes de ambas subpoblaciones son semejante (Figura 4.4, sección III).

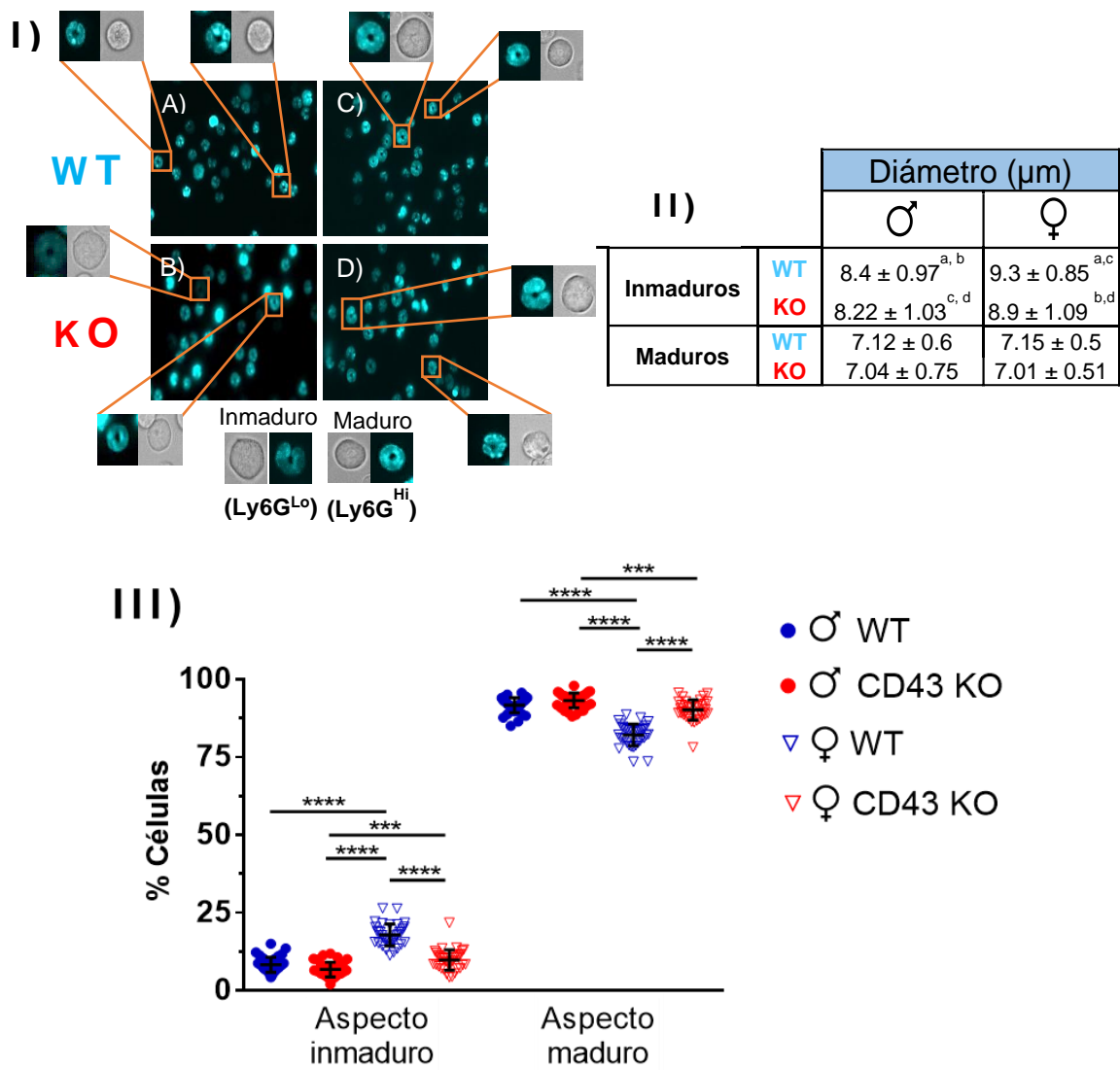


Figura 4.4. La ausencia de CD43 afecta la proporción de neutrófilos inmaduros y maduros en hembras, y las células inmaduras tienen mayor diámetro. Los neutrófilos de médula ósea de ratones macho y hembras, WT y CD43 KO se tiñeron con DAPI (1 nM) y se tomaron microfotografías en contraste diferencial interferencial (DIC), y fluorescencia con un microscopio invertido de fluorescencia (Olympus IX81, iluminación CoolLED pE-2, cámara Photometrics Roper CoolSnap Monochromatic, aumento 600x). A partir de las microfotografías de DIC se midió el diámetro de las células con el software ImageJ. Con base en la segmentación y condensación del núcleo, los neutrófilos se clasificaron en inmaduros o maduros (n=82 células). I) Neutrófilos de ratón macho WT (A) o CD43 KO (B), y muestran de ratón hembra WT (C) o CD43 KO (D). La barra representa 20 μm. II) Diámetro de neutrófilos de aspecto inmaduro y maduro de machos y hembras WT y CD43 KO. Se indica promedio ± desviación estándar. a=****p<0.0001, b=*p<0.01, c=****p<0.0001, d=*p<0.02 ANOVA prueba post hoc Tukey. III) Se muestra el porcentaje de neutrófilos de aspecto inmaduro (Ly6G^{Lo}) y maduro (Ly6G^{Hi}) obtenido a partir de las microfotografías. Cada punto representa una microfotografía (n=82 machos y n=82 hembras). Se indica promedio ± desviación estándar. ****p<0.0001, **p<0.005, *p< 0.05 ANOVA prueba post hoc Tukey.

5) La purificación de neutrófilos enriquece la subpoblación de neutrófilos maduros

Además de los cambios morfológicos del núcleo, durante la maduración de los neutrófilos hay cambios en la expresión o nivel de expresión de proteínas de la membrana celular, como ocurre con el marcador Ly6G, una proteína exclusiva de neutrófilos de ratón que participa en adhesión celular, y cuyos niveles de expresión se incrementan conforme maduran los neutrófilos en la médula ósea (Hickey, 2012; Lee *et al.*, 2013). Por lo anterior, se ha propuesto que esta molécula puede ser un indicador de la maduración de los neutrófilos en médula ósea, en donde se identifican dos subpoblaciones: neutrófilos inmaduros Ly6G^{Lo} y neutrófilos maduros Ly6G^{Hi} (Kim *et al.*, 2017; Lagasse & Weissman, 1996).

El análisis de Ly6G^{Lo} y/o Ly6G^{Hi} de neutrófilos purificados de médula ósea por citometría de flujo (Figura 4.5, sección I) permitió complementar y corroborar la evidencia observada por microscopía. Los resultados con neutrófilos purificados y a partir de médula ósea total mostraron que en hembras WT hay más neutrófilos Ly6G^{Lo} y menos Ly6G^{Hi} que en hembras KO mientras que en machos, la proporción de neutrófilos Ly6G^{Lo} y Ly6G^{Hi} es semejante entre ratones WT y CD43 KO. Por otro lado, también se encontraron diferencias entre sexos de las subpoblaciones relacionadas a Ly6G, mostrando una proporción mayor de neutrófilos Ly6G^{Hi} en ratones macho en comparación a la proporción encontrada en hembras (Figura 4.5, sección I).

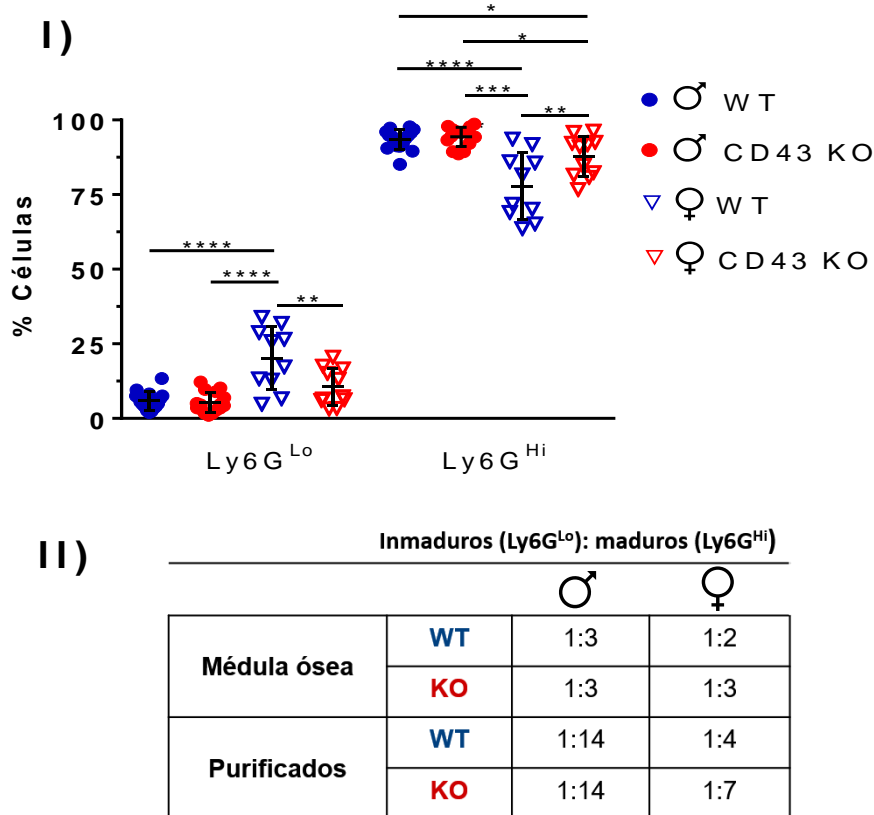


Figura 4.5. La purificación de neutrófilos enriquece la proporción de neutrófilos maduros (Ly6G^{Hi}). La abundancia relativa de las subpoblaciones Ly6G^{Lo} y Ly6G^{Hi} en los neutrófilos purificados de médula ósea de ratones C57BL/6 machos y hembras, WT y CD43 KO se evaluó por citometría de flujo. Se seleccionaron los eventos positivos a Ly6G⁺ CD11b⁺ (considerados como neutrófilos), y se analizó su dispersión de acuerdo con la expresión del marcador Ly6G vs SSC para delimitar las subpoblaciones Ly6G^{Lo} o Ly6G^{Hi} (Ver Apéndice II-4). **I)** Porcentaje de células Ly6G^{Lo} o Ly6G^{Hi} en machos y hembras, WT y CD43 KO. Cada punto representa un ratón (n=10 machos y n=11 hembras). Se indica promedio ± desviación estándar. ****p<0.0001, ***p<0.0002, **p<0.005, *p<0.05 ANOVA prueba post hoc Tukey. **II)** Proporción de neutrófilos Ly6G^{Lo}: Ly6G^{Hi}, antes y después de ser purificados (n=10 machos y n=11 hembras).

Al comparar los porcentajes de neutrófilos Ly6G^{Lo} y Ly6G^{Hi} en médula ósea sin purificar (Apéndice II-4) con los de células purificadas, se encontró que el proceso de purificación resulta en un enriquecimiento de neutrófilos maduros (Figura 4.5, sección II). Aunque, la diferencia entre las subpoblaciones de hembras y entre sexos observada en neutrófilos purificados presenta un patrón semejante al observado en médula ósea, el proceso de purificación hace más evidentes dichas diferencias y, en consecuencia, la proporción de subpoblaciones Ly6G^{Hi} se ve enriquecida.

6) Las proporciones de neutrófilos Ly6G^{Lo} y Ly6G^{Hi} positivas a CXCR2 y CXCR4 no es el responsable de las diferencias funcionales observadas en los neutrófilos ratones WT y CD43 KO

Los neutrófilos inmaduros se consideran funcionalmente menos eficientes que los maduros (Evrard *et al.*, 2018; Hidalgo *et al.*, 2019). Considerando que nuestros resultados mostraban una mayor proporción de células inmaduras con mayor tamaño en hembras, nos preguntamos si las diferencias funcionales observadas se debían a diferentes estadios de maduración de los neutrófilos y si existía una diferencia entre sexos y fenotipos. Para esto, se procedió a hacer un análisis de maduración ahora evaluando la presencia y porcentaje de células con los receptores de quimiocinas, CXCR2 y CXCR4. Los neutrófilos inmaduros tienen una baja expresión de la molécula Ly6G (Ly6G^{Lo}), y expresan el receptor de quimiocinas CXCR4. Una vez que los neutrófilos alcanzan un estadio maduro, su fenotipo cambia, aumentando la expresión de Ly6G (Ly6G^{Hi}), disminuyendo la expresión de CXCR4 y aumentando la de CXCR2 (Peng *et al.*, 2021).

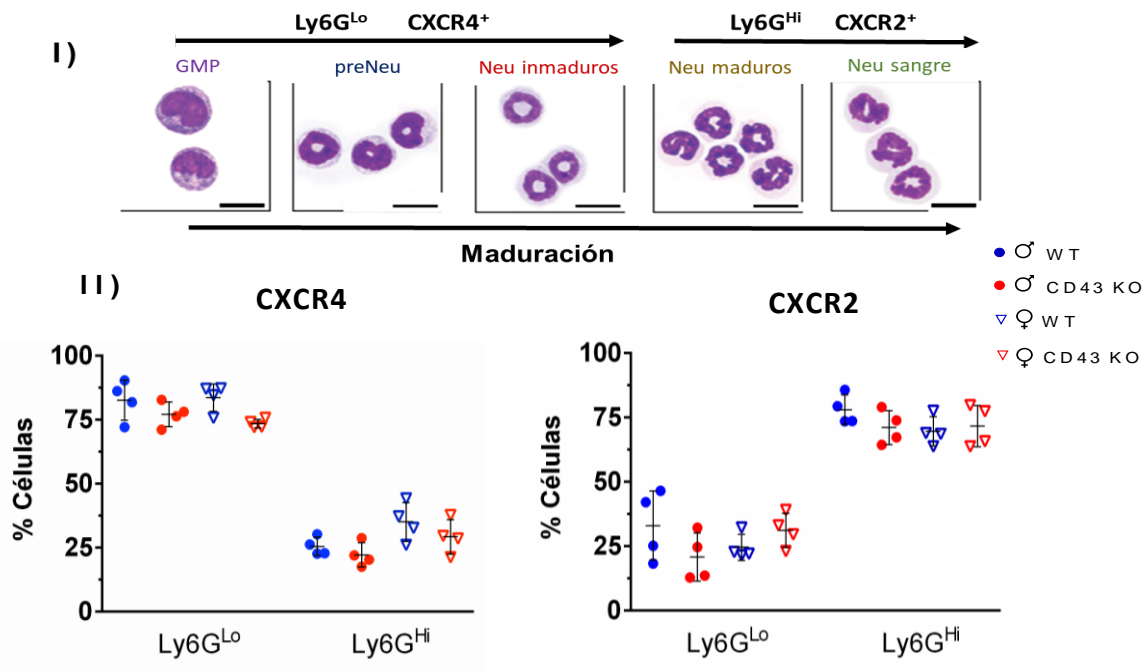


Figura 4.6. Los ratones WT y CD43 KO tienen proporciones semejantes de neutrófilos Ly6G^{Lo} y/o Ly6G^{Hi} positivas a los receptores de quimiocinas CXCR2 y CXCR4. I) Esquema mostrando los cambios morfológicos y fenotípicos a lo largo de la maduración de los neutrófilos en médula ósea II) Con los neutrófilos purificados de médula ósea, a partir de los eventos Ly6G⁺ CD11b⁺ (considerados como neutrófilos) se delimitaron las subpoblaciones Ly6G^{Lo} o Ly6G^{Hi} de acuerdo a la expresión del marcador Ly6G vs SSC, y en cada subpoblación se evaluó el porcentaje de células positivas a los receptores de quimiocinas CXCR2 y CXCR4 (Ver estrategia de análisis en Apéndice II-5). Se muestra el porcentaje de neutrófilos Ly6G^{Lo} y Ly6G^{Hi} que expresan los receptores CXCR2 y CXCR4. Cada punto representa un ratón (n=4 machos y n=4 hembras). Se indica promedio ± desviación estándar.

Los resultados que obtuvimos (Figura 4.6, sección II) indican que las proporciones de células CXCR4⁺ y CXCR2⁺ son semejantes en ratones WT y CD43 KO y que expresan niveles semejantes de CXCR2 y CXCR4 (Apéndice II-5), independientemente del sexo, y sugiriendo que la ausencia de CD43 no afecta las proporciones de células CXCR4⁺ y CXCR2⁺. Tampoco se encontraron diferencias entre sexos, indicando que no hay un dimorfismo sexual a nivel del porcentaje de células que expresan CXCR4 y CXCR2. Así mismo, esto sugiere que las diferencias funcionales entre sexos no están relacionadas a estos dos receptores de quimiocinas, a diferencia de lo que ocurre con el marcador Ly6G. Es posible que los niveles de expresión de otros marcadores de maduración como c-KIT, CD62L, CD34, CD117, etc. (Kim et al., 2017; Peng et al., 2021) y que contribuyen a la caracterización de la etapa de maduración de neutrófilos en médula ósea (pero que no fueron contemplados en el presente trabajo) reflejen el dimorfismo sexual que identificamos.

V Discusión

Los neutrófilos son células de la respuesta inmune que fagocitan y matan microorganismos de manera muy eficiente. Además, pueden liberar su ADN y el contenido de los diversos gránulos hacia el espacio extracelular, formando redes de ADN (NETs), lo que extiende su capacidad microbicida al medio extracelular. Entre las armas de las que disponen los neutrófilos destacan las ROS y las NETS. Además de combatir las infecciones, el arsenal bio-tóxico de los neutrófilos puede provocar daño en contextos, como el cáncer. La activación inadecuada o desregulada de los neutrófilos puede contribuir a la inflamación y la autoinmunidad.

La obtención de neutrófilos de ratones es más laboriosa que la de humanos, debido al pequeño volumen de sangre obtenida de los ratones y la pequeña proporción de neutrófilos en sangre periférica (15 %) (O'Connell *et al.*, 2015). En una primera etapa comparáramos el rendimiento y pureza los neutrófilos aislados de sangre periférica o de médula ósea, resultando menos beneficioso y más costoso obtener los neutrófilos de sangre periférica debido al número de ratones necesarios, además de obtener una cantidad, pureza y viabilidad menores en comparación a las células obtenidas de médula ósea. Estos resultados son consistentes con publicaciones en las que se reporta que debido al pequeño volumen de sangre de los ratones y a que en esta especie, los neutrófilos no son tan abundantes en la sangre como en humanos (15-30% contra 70% o más, respectivamente) (O'Connell *et al.*, 2015). Considerando esta información, se optó por purificar los neutrófilos de la médula ósea (Swamydas *et al.*, 2015), por lo que los experimentos encaminados a evaluar la función de los neutrófilos en ratones silvestres y ratones CD43 KO (machos y hembras), se realizaron a partir de neutrófilos purificados de médula ósea.

Los machos y las hembras difieren en sus respuestas a antígenos extraños y propios, y muestran diferencias tanto en la respuesta inmune innata como la adaptativa. Ciertas diferencias sexuales inmunológicas se presentan a lo largo de la vida, mientras que otras solo son aparentes después de la pubertad y antes de la senescencia reproductiva, lo que sugiere que genes y hormonas participan en el dimorfismo de la respuesta inmunológica (Ngo *et al.*, 2014). Particularmente en neutrófilos, se ha estudiado el papel de las hormonas femeninas como el estrógeno, el cual es un importante inmunomodulador en la quimiotaxis y la fagocitosis de los neutrófilos (Spitzer & Zhang, 1996). Y también se ha estudiado la progesterona como una molécula que incrementa el tiempo de vida media de los neutrófilos durante el ciclo menstrual (Molloy *et al.*, 2003; Ngo *et al.*, 2014). En el presente nos enfocamos a valorar la participación de CD43 en los mecanismos efectores de los neutrófilos, en particular el estallido respiratorio y la formación de NETS y evaluar si existe una diferencia entre sexos.

Se encontraron diferencias funcionales entre los neutrófilos de machos y hembras de ambos fenotipos, apoyando el efecto del dimorfismo sexual en la respuesta inmunológica y particularmente en la fisiología de los neutrófilos (Giefing-Kröll *et al.*, 2015). Los neutrófilos de machos WT generan más ROS y NETs que los neutrófilos de las hembras WT mientras que los neutrófilos de las hembras CD43 KO son más eficientes en la producción de ROS que los machos CD43 KO, indicando que, a pesar de la ausencia de CD43, sigue existiendo un dimorfismo sexual, aunque con un comportamiento biológico completamente inverso al del fenotipo WT, considerando que los ratones silvestres de ambos sexos contienen niveles semejantes de CD43 después de la purificación de los neutrófilos. Lo anterior sugiere un posible efecto de las hormonas sexuales en la actividad microbicida de los neutrófilos, acorde a lo observado en neutrófilos de rata (Krynytska *et al.*, 2019), pero opuesto a lo observado en humanos, donde los neutrófilos de sangre periférica de mujeres son más eficientes que los de hombres en respuesta al PMA o estímulos proinflamatorios (Blazkova *et al.*, 2017; Crockett *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2020). Estas discrepancias podrían explicarse por el hecho que los neutrófilos de nuestro experimento y las publicaciones referidas provienen de reservorios diferentes: médula ósea (nuestros datos y Krynytska *et al.*, 2019), sangre periférica (Blazkova *et al.*, 2017, Crockett *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2020), siendo que los neutrófilos de médula ósea incluyen neutrófilos en proceso de maduración, a diferencia los de sangre periférica que completaron su proceso de maduración (Evrard *et al.*, 2018). Lo anterior, llevaría a preguntarse si estos mismos eventos se observan en ratones bajo un contexto más fisiológico como es el caso de una infección por virus o bacterias, en donde se evaluaría si se reproducen los mismos resultados obtenidos con la adición del PMA, y si se conservan las diferencias entre fenotipos, sexo y especies.

El dimorfismo sexual también se manifiesta durante la maduración de los neutrófilos. Blazkova *et al.*, (2017) ha reportado evidencia sobre esta diferencia sexual y su relación en el estadio de maduración de neutrófilos en circulación sanguínea de humanos. En consistencia con este estudio en el que se encontró que los hombres tienen una mayor proporción de neutrófilos con fenotipo inmaduro respecto a las mujeres, el análisis de las subpoblaciones de neutrófilos inmaduros (Ly6G^{Lo}) y maduros (Ly6G^{Hi}) de médula ósea realizado en el presente trabajo mostró un posible dimorfismo sexual en el marcador Ly6G, debido a que las hembras presentan una marcada tendencia a tener una mayor proporción de neutrófilos Ly6G^{Lo} y menor cantidad de neutrófilos Ly6G^{Hi}, a la inversa de lo ocurre en los machos. Esta tendencia se volvió más evidente tras la purificación de los neutrófilos, probablemente debido a diferencias en la densidad celular de los neutrófilos maduros e inmaduros. Este fenómeno de dimorfismo sexual en la cantidad de células maduras e inmaduras sugiere una posible contribución a las diferencias funcionales observadas entre sexos,

debido a que se ha reportado que los neutrófilos maduros son más eficientes que los inmaduros (Kim et al., 2017).

Durante la generación y maduración de neutrófilos en médula ósea, hay división celular y generación de precursores de neutrófilos (*Pre-Neu*), cuya maduración a *Neu-maduros* es regulada por el GM-CSF. El GM-CSF desempeña un papel crucial en la regulación de la respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos. Además de promover la proliferación y desarrollo de progenitores de neutrófilos en la médula ósea, este factor tiene una actividad sinérgica con otros factores de crecimiento hematopoyéticos; y estimula la actividad funcional de neutrófilos maduros (Fossati et al., 1998). Aunque no hay reportes que explícitamente indiquen que hay un dimorfismo sexual a nivel de la expresión del gen de GM-CSF, hay reportes que indican que puede ser producido por el epitelio del útero y linfocitos CD4 T_{H17}, lo cual podría contribuir a una mayor producción de GM-CSF en hembras, lo que se ha relacionado a problemas durante la implantación del blastocisto en el embarazo y a una mayor incidencia de enfermedades autoinmunes en mujeres (Al-Mossawi et al., 2017; Robertson & Seemark, 1992). Esto podría sustentar nuestros resultados que indican que en médula ósea las hembras tienden a tener un mayor porcentaje de células inmaduras (Ly6G^{Lo}), posiblemente debido a que el GM-CSF promueve la proliferación y una rápida maduración y liberación de neutrófilos a sangre periférica, dejando solo células en proceso de maduración, las cuales incluyen células *Pre-Neu*, las cuales conservan características morfológicas como un mayor diámetro, y cromatina parcialmente condensada debido a que conservan su capacidad mitótica para generar más neutrófilos (Evrard et al., 2018; Hidalgo et al., 2019). Esto mismo podría explicar porque las células inmaduras de hembras tienen mayor diámetro que las de machos machos, aunque faltarían datos experimentales sobre las proporciones de células Ly6G^{Lo} y Ly6G^{Hi} en sangre periférica de ambos sexos para corroborar el dimorfismo sexual y lo observado por Blazkova et al., (2017) así como los niveles serológicos GM-CSF para apoyar dicha hipótesis.

En el presente trabajo, independientemente de la presencia de CD43 y del sexo de los ratones, se encontró una correlación positiva entre la producción de ROS y la de NETs, acorde a lo reportado cuando se utiliza al PMA como estímulo (Bianchi et al., 2009; Hakkim et al., 2011b). En respuesta al PMA, se activan las PKCs, que a su vez activan a ERK. Una vez fosforilada y activada, ERK fosforila a la subunidad p47^{phox}, desencadenando la activación y ensamblaje del resto de subunidades de la NADPH oxidasa (p67^{phox}, p40^{phox}, p22^{phox} y gp1^{phox}), lo que lleva a la producción de ROS aproximadamente a los 40 minutos después del estímulo. Si el estímulo persiste durante más tiempo, las ROS tienen la capacidad de dañar las membranas de los gránulos azurófilos que contienen proteínas microbicidas como la NE o MPO. Una vez liberadas, ambas proteínas pueden migrar al núcleo y contribuir a la descondensación

de la cromatina, lo que finalmente se lleva a la formación de NETs, aproximadamente a las cuatro horas después del estímulo (Hakkim *et al.*, 2011). Lo anterior resalta la importancia de la NADPH oxidasa como un punto de convergencia entre la producción de ROS y la consecuente formación de NETs, (Papayannopoulos *et al.*, 2010). En línea con lo anterior, los ratones deficientes de la NADPH oxidasa, presentan alteraciones en ambos mecanismos, haciendo que sean más susceptibles a infecciones causadas por hongos y bacterias (Röhm *et al.*, 2014). Asimismo, las mutaciones que alteran la función de este complejo enzimático repercuten negativamente en la producción de ROS y NETs de los neutrófilos, como ocurre en los pacientes con la enfermedad granulomatosa crónica (CGP), una inmunodeficiencia primaria resultante de una mutación en la subunidad p47^{phox} que impide el ensamblaje y activación de la NADPH oxidasa (Bianchi *et al.*, 2009).

Los ensayos de producción de ROS y NETs mostraron que además de existir un dimorfismo sexual entre neutrófilos de machos y hembras, la ausencia de CD43 afecta la producción de ROS y NETs de los neutrófilos de una manera dependiente del sexo. Los neutrófilos de los ratones CD43 KO macho producen significativamente menos ROS y NETs que los de machos WT. En cambio, en hembras ocurre lo contrario, es decir que los neutrófilos de las hembras CD43 KO producen significativamente más ROS y más NETs que los de hembras WT., CD43 tendría entonces un papel dual dependiendo del sexo del ratón: un papel efector en los machos, en los que la ausencia de CD43 se traduce por una baja en la producción de ROS y NETs, mientras que en hembras tendría un papel de regulador negativo, ya que, el no estar presente CD43, la producción de ROS y de NETs aumenta. Lo anterior, indicaría que CD43 se asocia de alguna manera con el dimorfismo sexual lo que explicaría porque su ausencia modifica el comportamiento de los neutrófilos según el sexo. De acuerdo con lo anterior, Mucci *et al.* (2005) propuso una relación entre dimorfismo sexual y CD43, siendo que la trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi* modifica la glicosilación de timocitos, posiblemente en CD43, lo que genera una mayor apoptosis en células de machos debido a la presencia de andrógenos. En conjunto, ambos resultados apoyan una interacción entre CD43 y el dimorfismo sexual.

Es posible pensar en varios escenarios mediante los cuales CD43 puede participar en la generación de ROS y de NETs. Una posibilidad es que, CD43 podría funcionar como un intermediario entre las hormonas sexuales y la maquinaria bioquímica del neutrófilo, teniendo un efecto directo sobre CD43, ya sea a través de la modificación de las señales río abajo de CD43 encargadas en la activación y ensamblaje de la NADPH oxidasa, un punto convergente entre las ROS y NETs. Entre las moléculas que podrían estar participando positivamente en la activación de la NADPH oxidasa están Rac 2, ERK1/2, p38 MAPK que han sido identificadas como moléculas que participan en la fosforilación y activación de p47^{phox} y p67^{phox}, y que

participan también en la vía de señalización de CD43 (Torres-Huerta *et al.*, 2017). Alternativamente, es posible que algún otro intermediario de la vía activación de NADPH oxidasa o este mismo complejo este regulado directamente por las hormonas sexuales y así estar contribuyendo a las diferencias funcionales observadas entre sexos y fenotipos.

Como se mencionó anteriormente, al inducir el ensamblaje y activación de la NADPH oxidasa que preceden a la producción de ROS, el PMA promueve la liberación de la MPO, elastasa y catepsina G de los gránulos azurófilos, las cuales pueden ser liberadas al espacio extracelular. La MPO y la elastasa también pueden ser transportadas al núcleo, en donde contribuyen a la descondensación de la cromatina, y la formación de NETs. Se ha reportado que la elastasa de neutrófilos y la catepsina G secretadas se unen a la membrana de los neutrófilos, cortando a CD43 en sitios distintos del dominio extracelular (Mambole *et al.*, 2008; Remold-O'Donnell & Parent, 1994) Aunque no está totalmente claro en qué circunstancias se da uno u otro corte o si son excluyentes, ambos parecen dar lugar a una siguiente etapa del procesamiento del fragmento remanente de CD43 por presenilina- γ -secretasa, permitiendo que el dominio intracelular de CD43 señalice en el citoplasma o migre al núcleo, en donde parece participar también en varias vías de señalización que favorecen la activación de los neutrófilos (Amano *et al.*, 2001; Seo & Ziltener, 2009). Los resultados del presente proyecto apoyan que la modificación o ausencia de CD43 repercute en la actividad de los neutrófilos, y que, a su vez, esta molécula tiene una actividad moduladora importante para determinar un papel efector o regulador que pareciera responder a efectos del dimorfismo sexual.

CD43 es una molécula que se expresa desde muy temprano durante la hematopoyesis. En humanos, CD43 está presente en las HSCs, las cuales tienen la capacidad de repoblar nichos y el potencial de diferenciarse a múltiples linajes hematopoyéticos (Kessel *et al.*, 2017). No obstante, se desconoce si CD43 participa en el proceso de maduración de neutrófilos o en la generación de otros linajes celulares, y si esto ocurre bajo la influencia de las hormonas sexuales. En los resultados del presente trabajo, no se encontró diferencia en las proporciones de células Ly6G^{Hi} y Ly6G^{Lo} de machos WT y CD43 KO, pero interesantemente las hembras CD43 KO tienen una mayor proporción de células Ly6G^{Hi} y una menor de Ly6G^{Lo} que las hembras WT. Indagando más en otros marcadores de maduración como los receptores de quimiocinas CXCR2 y CXCR4, no encontramos diferencias en la proporción de células positivas a estos receptores entre fenotipos, ni tampoco entre sexos, lo que indica que el dimorfismo sexual observado en los neutrófilos maduros e inmaduros entre machos y hembras no está relacionado con la expresión de estos marcadores, a diferencia de lo que ocurre a través de Ly6G. Es probable entonces que las diferencias entre las proporciones de poblaciones Ly6G^{Lo} y/o Ly6G^{Hi}

observadas en hembras se deba a algun otro o a varios intermediarios, como reportados en trabajos recientes, en los que el estudio del dimorfismo sexual a nivel de las funciones de los neutrófilos se han abordado con un enfoque de ciencias “ómicas”, identificando diferencias multiómicas (Blazkova *et al.*, 2017; Gupta *et al.*, 2020).

El presente trabajo permitió ampliar el panorama de CD43 en la fisiología de los neutrófilos. Los resultados obtenidos sugieren que CD43 ejerce funciones moduladoras debido a que su ausencia altera la producción de ROS y NETs de manera sexo-dependiente. Además, existe un dimorfismo sexual que se ve reflejado en la funcionalidad de los neutrófilos de ambos sexos, posiblemente en consecuencia a las proporciones de células maduras e inmaduras acompañado de un posible efecto de las hormonas sexuales en la vía de activación de la NADPH oxidasa, y su interacción con CD43 para contribuir a la activación de dicha vía, explicando así las diferencias funcionales entre sexos y entre fenotipos. Si bien CXCR2⁺ y CXCR4⁺ no parecen estar contribuyendo a las diferencias funcionales entre neutrófilos maduros e inmaduros como es el caso de Ly6G, es probable que se identifiquen otros marcadores de maduración que permitirían realizar un análisis más exhaustivo del dimorfismo sexual de los neutrófilos, y del papel de CD43 en las funciones efectoras de los neutrófilos, dependiendo del sexo. (Figura 5.1). Por otro lado, nuestros experimentos fueron realizados estimulando e aislando y estimulando células con PMA, y es necesario explorar con otros tipos de estímulos como es el caso de algún agente patógeno. Finalmente, resultaría interesante evaluar si en el dimorfismo sexual está involucrado en otros mecanismos efectores como la fagocitosis, la degranulación e inclusive si altera la migración de estas células y si la ausencia de CD43 también modifica dichas funciones.

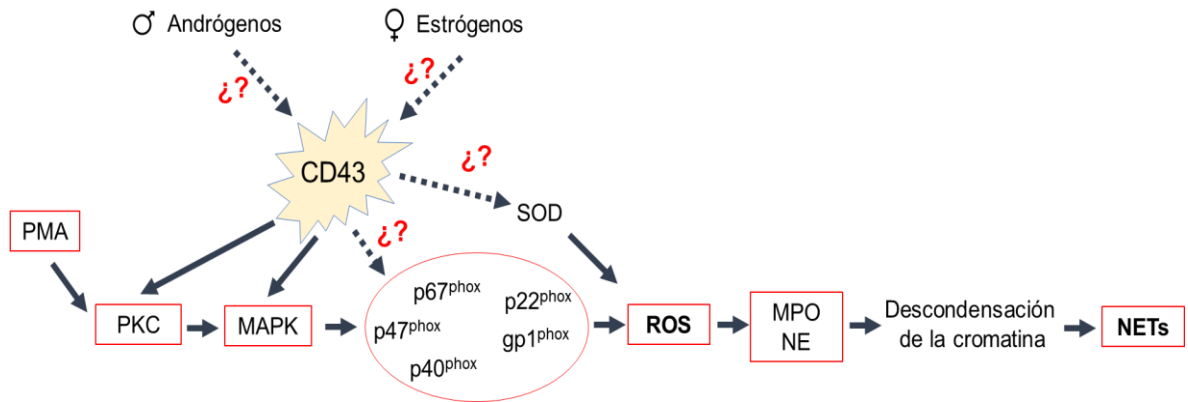


Figura 5.1. Posible participación de CD43 en la formación de ROS y NETs en neutrófilos de ratón bajo efecto del dimorfismo sexual. Con base en las vías de señalización intracelular que han sido identificadas a partir de CD43 y en los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo, se propone este esquema como un posible modelo para seguir abordando el estudio de la participación del dimorfismo sexual y CD43 en la formación de ROS y de NETs. Se desconoce si la interacción de las hormonas sexuales tenga un efecto directo sobre CD43 o a través de intermediarios. Asimismo, se tiene poca información acerca de cómo la señalización de CD43 podría contribuir río abajo a la activación de las PKC, MAPK o la activación del complejo enzimático de la NADPH oxidasa, contribuyendo a las diferencias funcionales observadas entre sexos y entre los ratones WT y CD43 KO. Tampoco se descarta la posible interacción entre CD43 y el complejo de la superóxido dismutasa (SOD), produciendo una posible reducción en la producción de ROS y en consecuencia la formación de NETs.

VI Conclusiones

El método de purificación de neutrófilos a partir de médula ósea tiene mayor rendimiento y pureza que los métodos de purificación a partir de sangre periférica.

Existe un claro dimorfismo sexual a nivel de las funciones efectoras (producción de ROS y NETs) entre los neutrófilos de machos y hembras de ratones WT y CD43 KO.

La ausencia de CD43 afecta a las funciones efectoras (producción de ROS y NETs) de los neutrófilos de manera sexo-específica, posiblemente a un efecto del dimorfismo sexual de manera directa o indirecta sobre la molécula y sus funciones.

También existe un dimorfismo sexual en la maduración de los neutrófilos de médula ósea (a través del marcador Ly6G) provocando que las hembras tengan un mayor porcentaje de neutrófilos inmaduros (Ly6G^{L^o}) y de mayor diámetro en comparación con los machos.

CD43 no está implicada en la generación y/o maduración de los neutrófilos en la médula ósea de machos, pero se sugiere lo contrario en las hembras.

Los receptores CXCR2 y CXCR4 son semejantes entre ratones macho y hembra, y entre WT y CD43 KO, señalando que no contribuyen a las diferencias funcionales entre sexos y entre fenotipos.

VII Perspectivas

- Evaluar los mecanismos efectoras de neutrófilos (ROS y NETs) con otro estímulo diferente al PMA para descartar que los eventos observados sean exclusivos de dicho estímulo.
- Evaluar la degranulación y fagocitosis de los neutrófilos de machos y hembras, WT y CD43 KO.
- Intentar dilucidar a través de la bioquímica de los neutrófilos de machos y hembras, WT y CD 43 KO para explicar la diferencia funcional entre sexos y fenotipo.
- Estudiar los receptores de hormonas en neutrófilos y como la gonadectomía afecta a los mecanismos efectoras de neutrófilos de ratones WT y CD43 KO.

Referencias

- Abdallah, D. S. A., Lin, C., Ball, C. J., King, M. R., Duhamel, G. E., & Denkers, E. Y. (2012). Toxoplasma gondii triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infection and Immunity*, *80*(2), 768–777. <https://doi.org/10.1128/IAI.05730-11>
- 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>
- Al-Mossawi, M., Chen, L., Fang, H., Ridley, A., Wit, J. De, Yager, N., Hammitzsch, A., Pulyakhina, I., Fairfax, B. P., Simone, D., Yi, Y., Bandyopadhyay, S., Doig, K., Gundle, R., Kendrick, B., Powrie, F., Knight, J. C., & Bowness, P. (2017). Unique transcriptome signatures and GM-CSF expression in lymphocytes from patients with spondyloarthritis. *Nature communications*, *8*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01771-2>
- Alemán, O. R., Mora, N., Cortes-Vieyra, R., Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2016). Differential Use of Human Neutrophil Fc γ Receptors for Inducing Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Journal of Immunology Research*, *2016*, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2016/2908034>
- Aleyd, E., van Hout, M. W. M., Ganzevles, S. H., Hoeben, K. A., Everts, V., Bakema, J. E., & van Egmond, M. (2014). IgA Enhances NETosis and Release of Neutrophil Extracellular Traps by Polymorphonuclear Cells via Fc Receptor I. *The Journal of Immunology*, *192*(5), 2374–2383. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300261>
- Allenspach, E. J., Cullinan, P., Tong, J., Tang, Q., Tesciuba, A. G., Cannon, J. L., Takahashi, S. M., Morgan, R., Burkhardt, J. K., & Sperling, A. I. (2001). ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity*, *15*(5), 739–750. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00224-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00224-2)
- Amano, J., Morimoto, C., & Irimura, T. (2001). Intestinal epithelial cells express and secrete the CD43 glycoform that contains core 2 O-glycans. *Microbes and Infection*, *3*(9), 723–728. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01431-9](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01431-9)
- Auvynet, C., Moreno, S., Melchy, E., Coronado-Martínez, I., Montiel, J. L., Aguilar-Delfin, I., & Rosenstein, Y. (2013). Galectin-1 promotes human neutrophil migration. *Glycobiology*, *23*(1), 32–42. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws128>
- Baum, L. G., Pang, M., Perillo, N. L., Wu, T., Delegeane, A., Uittenbogaart, C. H., Fukuda, M., & Seilhamer, J. J. (1995). Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 20-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *Journal of Experimental Medicine*, *181*(3), 877–887. <https://doi.org/10.1084/jem.181.3.877>
- Behnen, M., Leschczyk, C., Möller, S., Batel, T., Klinger, M., Solbach, W., & Laskay, T. (2014). Immobilized Immune Complexes Induce Neutrophil Extracellular Trap Release by Human Neutrophil Granulocytes via Fc γ RIIIB and Mac-1. *The Journal of Immunology*, *193*(4), 1954–1965. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400478>
- Berger-Achituv, S., Brinkmann, V., Abed, U. A., Kühn, L. I., Ben-Ezra, J., Elhasid, R., & Zychlinsky, A. (2013). A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Frontiers in Immunology*, *4*(48), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00048>
- Bianchi, M., Hakkim, A., Brinkmann, V., Siler, U., Seger, R. A., Zychlinsky, A., &

Reichenbach, J. (2009). Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*, *114*(13), 2619–2622. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-221606>

Biermann, H., Pietz, B., Dreier, R., Schmid, K. W., Sorg, C., & Sunderkötter, C. (1999). Murine leukocytes with ring-shaped nuclei include granulocytes, monocytes, and their precursors. *Journal of Leukocyte Biology*, *65*(2), 217–231. <https://doi.org/10.1002/jlb.65.2.217>

Blazkova, J., Gupta, S., Liu, Y., Gaudilliere, B., Ganio, E. A., Bolen, C. R., Saar-Dover, R., Fragiadakis, G. K., Angst, M. S., Hasni, S., Aghaeepour, N., Stevenson, D., Baldwin, N., Anguiano, E., Chaussabel, D., Altman, M. C., Kaplan, M. J., Davis, M. M., & Furman, D. (2017). Multicenter Systems Analysis of Human Blood Reveals Immature Neutrophils in Males and During Pregnancy. *The Journal of Immunology*, *198*(6), 2479–2488. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601855>

Borregaard, N., Sørensen, O. E., & Theilgaard-Mönch, K. (2007). Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends in Immunology*, *28*(8), 340–345. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.06.002>

Boyum, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum*, *97*, 77–89.

Bravo-Adame, M. E., Vera-Estrella, R., Barkla, B. J., Martínez-Campos, C., Flores-Alcantar, A., Ocelotl-Oviedo, J. P., Pedraza-Alva, G., & Rosenstein, Y. (2016). An alternative mode of CD43 signal transduction activates pro-survival pathways of T lymphocytes. *Immunology*, *150*(1), 87–99. <https://doi.org/10.1111/imm.12670>

Brinkmann, N., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D., Weinrauch, Y., & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, *303*, 1532–1535.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, David, S., Weinrauch, Y., & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, *303*, 1532–1535.

Bruns, S., Kniemeyer, O., Hasenberg, M., Aïmanianda, V., Nietzsche, S., Thywißen, A., Jeron, A., Latgé, J.-P., Brakhage, A. A., & Gunzer, M. (2010). Production of Extracellular Traps against *Aspergillus fumigatus* In Vitro and in Infected Lung Tissue Is Dependent on Invading Neutrophils and Influenced by Hydrophobin RodA. *PLoS Pathogens*, *6*(4), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000873>

Byrd, A. S., O'Brien, X. M., Johnson, C. M., Lavigne, L. M., & Reichner, J. S. (2013). An Extracellular Matrix-Based Mechanism of Rapid Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Candida albicans*. *The Journal of Immunology*, *190*(8), 4136–4148. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202671>

Campanero, M. R., Pulido, R., Alonso, J. L., Pivel, J. P., Pimentel-Muñoz, F. X., Fresno, M., & Sánchez-Madrid, F. (1991). Down-regulation by tumor necrosis factor- α of neutrophil cell surface expression of the sialophorin CD43 and the hyaluronate receptor CD44 through a proteolytic mechanism. *European Journal of Immunology*, *21*(12), 3045–3048. <https://doi.org/10.1002/eji.1830211222>

Capucetti, A., Albano, F., & Bonecchi, R. (2020). Multiple Roles for Chemokines in Neutrophil Biology. *Frontiers in Immunology*, *11*(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01259>

Carlsson, S. R., Sasaki, H., &

- Fukuda, M. (1986). Structural variations of O-linked oligosaccharides present in leukosialin isolated from erythroid, myeloid, and T-lymphoid cell lines. *Journal of Biological Chemistry*, 261(27), 12787–12795.
- Cassatella, M. A., Östberg, N. K., Tamassia, N., & Soehnlein, O. (2019). Biological Roles of Neutrophil-Derived Granule Proteins and Cytokines. *Trends in Immunology*, 40(7), 648–664. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.05.003>
- Cavaillon, J.-M. (2011). The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(3), 413–424. <https://doi.org/10.1189/jlb.0211094>
- Chaplin, D. A. (2010). Overview of the Immune Response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), 1–34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00601-1>
- Crockett, E. T., Spielman, W., Dowlatshahi, S., & He, J. (2006). Sex differences in inflammatory cytokine production in hepatic ischemia-reperfusion. *Journal of Inflammation*, 3(16), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-3-16>
- Cyster, J. G., Shotton, D. M., & Williams, A. F. (1991). The dimensions of the T lymphocyte glycoprotein leukosialin and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation. *The EMBO Journal*, 10(4), 893–902. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb08022.x>
- Cyster, J., Somoza, C., Killeen, N., & Williams, A. F. (1990). Protein sequence and gene structure for mouse leukosialin (CD43), a T lymphocyte mucin without introns in the coding sequence. *European Journal of Immunology*, 20(4), 875–881. <https://doi.org/10.1002/eji.1830200424>
- Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., & Dick, J. E. (2012). Hematopoiesis: A human perspective. *Cell Stem Cell*, 10(2), 120–136. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.006>
- El-Benna, J., Hurtado-Nedelec, M., Marzaioli, V., Marie, J. C., Gougerot-Pocidalò, M. A., & Dang, P. M. C. (2016). Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunological Reviews*, 273(1), 180–193. <https://doi.org/10.1111/imr.12447>
- 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), 364–379. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.02.002>
- Farokhzad, O. C., Teodoridis, J. M., Park, H., Arnaout, M. A., & Shelley, C. S. (2000). CD43 gene expression is mediated by a nuclear factor which binds pyrimidine-rich single-stranded DNA. *Journal of Cellular Biochemistry*, 78(11), 2256–2267.
- Ferrante, A., & Thong, Y. H. (1980). Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the hypaque-ficoll method. *Journal of Immunological Methods*, 36(2), 109–117. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(80\)90036-8](https://doi.org/10.1016/0022-1759(80)90036-8)
- Flannagan, R. S., Jaumouillé, V., & Grinstein, S. (2012). The Cell Biology of Phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7(1), 61–98. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132445>
- Fossati, G., Mazzucchelli, I., Gritti, D., Ricevuti, G., Edwards, S. W., Moulding, D. A., & Rossi, M. L. (1998). In vitro effects of GM-CSF on mature peripheral blood

neutrophils. *International journal of molecular medicine*, 1(6), 943–951. <https://doi.org/10.3892/ijmm.1.6.943>

Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, 176(2), 231–241. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>

Fukuda, M., Carlsson, S. R., Klock, J. C., & Dell, A. (1986). Structures of O-linked oligosaccharides isolated from normal granulocytes, chronic myelogenous leukemia cells, and acute myelogenous leukemia cells. *Journal of Biological Chemistry*, 261(27), 12796–12806.

Fukuda, M. (1991). Leukosialin, a major O-glycan-containing sialoglycoprotein defining leukocyte differentiation and malignancy. *Glycobiology*, 1(4), 347–356. <https://doi.org/10.1093/glycob/1.4.347>

Fukuda, Minoru. (2002). Roles of mucin-type O-glycans in cell adhesion. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1573(3), 394–405. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00409-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00409-9)

Giefing-Kröll, C., Berger, P., Lepperdinger, G., & Grubeck-Loebenstein, B. (2015). How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. *Aging Cell*, 14(3), 309–321. <https://doi.org/10.1111/accel.12326>

Groemping, Y., & Rittinger, K. (2005). Activation and assembly of the NADPH oxidase: A structural perspective. *Biochemical Journal*, 386(3), 401–416. <https://doi.org/10.1042/BJ20041835>

Gupta, S., Nakabo, S., Blanco, L. P., O’Neil, L. J., Wigerblad, G., Goel, R. R., Mistry, P., Jiang, K., Carmona-Rivera, C., Chan, D. W., Wang, X., Pedersen, H. L., Gadkari, M., Howe, K. N., Naz, F.,

Dell’Orso, S., Hasni, S. A., Dempsey, C., Buscetta, A., ... Kaplan, M. J. (2020). Sex differences in neutrophil biology modulate response to type I interferons and immunometabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(28), 16481–16491. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003603117>

Hakim, A., Fuchs, T. A., Martinez, N. E., Hess, S., Prinz, H., Zychlinsky, A., & Waldmann, H. (2011a). Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nature Chemical Biology*, 7(2), 75–77. <https://doi.org/10.1038/nchembio.496>

Hannah, M. F., Bajic, V. B., & Klein, S. L. (2008). Sex differences in the recognition of and innate antiviral responses to Seoul virus in Norway rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(4), 503–516. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.10.005>

Hartshorn, K. L., Liou, L. S., White, M. R., Kazhdan, M. M., Tauber, J. L., & Tauber, A. I. (1995). Neutrophil deactivation by influenza A virus: Role of hemagglutinin binding to specific sialic acid-bearing cellular proteins. *Journal of Immunology*, 154(8), 3952–3960.

Hestdal, K., Ruscetti, F. W., Ihle, J. N., Jacobs, S. E. W., Dubois, C. M., Kopp, W. C., Longo, D. L., & Keller, J. R. (1991). Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *Journal of immunology*, 147, 22–28.

Hickey, M. J. (2012). Has Ly6G finally found a job? *Blood*, 120(7), 1352–1353. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-435164>

Hickey, T. B. M., Ziltener, H. J., Speert, D. P., & Stokes, R. W. (2010). Mycobacterium tuberculosis employs Cpn60.2 as an adhesin that binds CD43 on the macrophage surface. *Cellular Microbiology*, 12(11), 1634–1647.

<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01496.x>

Hidalgo, A., Chilvers, E. R., Summers, C., & Koenderman, L. (2019). The Neutrophil Life Cycle. *Trends in Immunology*, 40(7), 584–597. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.04.013>

Johnson, G. G., Mikulowska, A., Butcher, E. C., McEvoy, L. M., & Michie, S. A. (1999). Anti-CD43 monoclonal antibody L11 blocks migration of T cells to inflamed pancreatic islets and prevents development of diabetes in nonobese diabetic mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(10), 5678–5685. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10553098>

Kadaja-Saarepuu, L., Laos, S., Jääger, K., Viil, J., Balikova, A., Lööke, M., Hansson, G. C., & Maimets, T. (2008). CD43 promotes cell growth and helps to evade FAS-mediated apoptosis in non-hematopoietic cancer cells lacking the tumor suppressors p53 or ARF. *Oncogene*, 27(12), 1705–1715. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210802>

Kadaja, L., Laos, S., & Maimets, T. (2004). Overexpression of leukocyte marker CD43 causes activation of the tumor suppressor proteins p53 and ARF. *Oncogene*, 23(14), 2523–2530. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207359>

Kessel, K. U., Bluemke, A., Schöler, H. R., Zaehres, H., Schlenke, P., & Dorn, I. (2017). Emergence of CD43-Expressing Hematopoietic Progenitors from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 44(3), 143–150. <https://doi.org/10.1159/000477357>

Khan, S., Holding, S., Doré, P. C., & Sewell, W. A. C. (2008). Abnormal O-glycosylation of CD43 may account for some features of Wiskott-Aldrich syndrome. *Medical Hypotheses*, 70(2), 269–272. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.05.04>

Kim, M. H., Yang, D., Kim, M., Kim, S. Y., Kim, D., & Kang, S. J. (2017). A late-lineage murine neutrophil precursor population exhibits dynamic changes during demand-adapted granulopoiesis. *Scientific Reports*, January 6(7), 39804. <https://doi.org/10.1038/srep39804>

Klein, S. L., & Flanagan, K. L. (2016). Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 16(10), 626–638. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>

Krynytska, I., Marushchak, M., & Rutska, A. (2019). Gender-Specific Differences of Oxidative Processes in the Population of Circulating Neutrophils of Rats in a Setting of Prolonged Administration of Monosodium Glutamate. *Romanian Journal of Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases*, 26(2), 119–127. <https://doi.org/10.2478/rjdnmd-2019-0013>

Kuijpers, T. W., Hoogerwerf, M., Kuijpers, K. C., Schwartz, B. R., & Harlan, J. M. (1992). Cross-linking of sialophorin (CD43) induces neutrophil aggregation in a CD18-dependent and a CD18-independent way. This information is current as T W Kuijpers, M Hoogerwerf, K C Kuijpers, B R Schwartz Why The JI? Submit online. • Rapid Reviews! 3. *J Immunol* 1992;, 149, 998–1003.

Kyoizumi, S., Ohara, T., Kusunoki, Y., Hayashi, T., Koyama, K., & Tsuyama, N. (2004). Expression Characteristics and Stimulatory Functions of CD43 in Human CD4 + Memory T Cells: Analysis Using a Monoclonal Antibody to CD43 That Has a Novel Lineage Specificity. *The Journal of Immunology*, 172(12), 7246–7253. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.12.7246>

Lacy, P. (2006). Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 2(3), 98–108. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-2-3-98>

Lagasse, E., & Weissman, I. L.

(1996). Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *Journal of Immunological Methods*, 197(1–2), 139–150. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00138-X](https://doi.org/10.1016/0022-1759(96)00138-X)

Lawrence, S. M., Corriden, R., & Nizet, V. (2018). The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(1), 1–22. <https://doi.org/10.1128/membr.00057-17>

Layseca-Espinosa, E., Pedraza-Alva, G., Montiel, J. L., del Río, R., Fierro, N. A., González-Amaro, R., & Rosenstein, Y. (2003). T cell aggregation induced through CD43: intracellular signals and inhibition by the immunomodulatory drug leflunomide. *Journal of Leukocyte Biology*, 74(6), 1083–1093. <https://doi.org/10.1189/jlb.0303095>

Lee, P. Y., Wang, J.-X., Parisini, E., Dascher, C. C., & Nigrovic, P. A. (2013). Ly6 family proteins in neutrophil biology. *Journal of Leukocyte Biology*, 94(4), 585–594. <https://doi.org/10.1189/jlb.0113014>

Li, R. H. L., & Tablin, F. (2018). A comparative review of neutrophil extracellular traps in sepsis. *Frontiers in Veterinary Science*, 5(NOV), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00291>

Libert, C., Dejager, L., & Pinheiro, I. (2010). The X chromosome in immune functions: When a chromosome makes the difference. *Nature Reviews Immunology*, 10(8), 594–604. <https://doi.org/10.1038/nri2815>

Lord, B. I., Molineux, G., Pojda, Z., Souza, L. M., Mermoud, J. J., & Dexter, T. M. (1991). Myeloid cell kinetics in mice treated with recombinant interleukin-3, granulocyte colony-stimulating factor (CSF), or granulocyte-macrophage CSF in vivo. *Blood*, 77(10), 2154–2159. <https://doi.org/10.1182/blood.v77.10.2154>. <https://doi.org/10.1182/blood.v77.10.2154>. [bloodjournal77102154](https://doi.org/10.1182/blood.v77.10.2154)

Mambole, A., Baruch, D., Nusbaum,

P., Bigot, S., Suzuki, M., Lesavre, P., Fukuda, M., & Halbwachs-Mecarelli, L. (2008). The cleavage of neutrophil leukosialin (CD43) by cathepsin G releases its extracellular domain and triggers its intramembrane proteolysis by presenilin/γ-secretase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(35), 23627–23635. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710286200>

Manjunath, N., Johnson, R. S., Staunton, D. E., Pasqualini, R., & Ardman, B. (1993). Targeted disruption of CD43 gene enhances T lymphocyte adhesion. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 151(3), 1528–1534. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8335945>

Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C., & Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 11, 519–531. <https://doi.org/10.1038/nri3024>

Margraf, A., Ley, K., & Zarbock, A. (2019). Neutrophil Recruitment: From Model Systems to Tissue-Specific Patterns. *Trends in Immunology*, 40(7), 613–634. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.04.010>

Matsumoto, H., Daikoku, T., Wang, H., Sato, E., & Dey, S. K. (2004). Differential Expression of Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) and ERM-Associated Adhesion Molecules in the Blastocyst and Uterus Suggests Their Functions During Implantation1. *Biology of Reproduction*, 70(3), 729–736. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.022764>

Matsumoto, M., Atarashi, K., Umemoto, E., Furukawa, Y., Shigeta, A., Miyasaka, M., & Hirata, T. (2005). CD43 Functions as a Ligand for E-Selectin on Activated T Cells. *The Journal of Immunology*, 175(12), 8042–8050. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.8042>

Matsumoto, M., Shigeta, A.,

- Miyasaka, M., & Hirata, T. (2008). CD43 Plays Both Antiadhesive and Proadhesive Roles in Neutrophil Rolling in a Context-Dependent Manner. *The Journal of Immunology*, 181(5), 3628–3635. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3628>
- 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>
- Molloy, E. J., O'Neill, A. J., Grantham, J. J., Sheridan-Pereira, M., Fitzpatrick, J. M., Webb, D. W., & Watson, R. W. G. (2003). Sex-specific alterations in neutrophil apoptosis: The role of estradiol and progesterone. *Blood*, 102(7), 2653–2659. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-02-0649>
- Montufar-Solis, D., Garza, T., & Klein, J. R. (2005). Selective upregulation of immune regulatory and effector cytokine synthesis by intestinal intraepithelial lymphocytes following CD43 costimulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 338(2), 1158–1163. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Mori, Y., Yamaguchi, M., Terao, Y., Hamada, S., Ooshima, T., & Kawabata, S. (2012). α -enolase of *Streptococcus pneumoniae* induces formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of Biological Chemistry*, 287(13), 10472–10481. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.280321>
- Mucci, J., Mocetti, E., Leguizamón, M. S., & Campetella, O. (2005). A Sexual Dimorphism in Intrathymic Sialylation Survey Is Revealed by the trans -Sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Immunology*, 174(8), 4545–4550. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.8.4545>
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*, 6(3), 173–182. <https://doi.org/10.1038/nri1785>
- Nathan, C., Xie, Q. W., Halbwachs-Mecarelli, L., & Jin, W. W. (1993). Albumin inhibits neutrophil spreading and hydrogen peroxide release by blocking the shedding of CD43 (sialophorin, leukosialin). *Journal of Cell Biology*, 122(1), 243–256. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.1.243>
- Nauseef, W. M., & Borregaard, N. (2014). Neutrophils at work. *Nature Immunology*, 15(7), 602–611. <https://doi.org/10.1038/ni.2921>
- Nel, J. G., Theron, A. J., Pool, R., Durandt, C., Tintinger, G. R., & Anderson, R. (2016). Neutrophil extracellular traps in health and disease. *South African Journal of Science*, 112(1/2), 36–45. <https://doi.org/10.4414/smw.2016.14352>
- Ngo, S. T., Steyn, F. J., & McCombe, P. A. (2014). Gender differences in autoimmune disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(3), 347–369. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.04.004>
- O'Connell, K. E., Mikkola, A. M., Stepanek, A. M., Vernet, A., Hall, C. D., Sun, C. C., Yildirim, E., Staropoli, J. F., Lee, J. T., & Brown, D. E. (2015). Practical murine hematopathology: A comparative review and implications for research. *Comparative Medicine*, 65(2), 96–113.
- Oertelt-Prigione, S. (2012). The influence of sex and gender on the immune response. *Autoimmunity Reviews*, 11(6–7). <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.11.022>
- Onami, T. M., Harrington, L. E., Williams, M. A., Galvan, M., Larsen, C. P., Pearson, T. C., Manjunath, N., Baum, L. G., Pearce, B. D., & Ahmed, R., M. (2002). Dynamic Regulation of T Cell Immunity by CD43. *The Journal of Immunology*, 168, 6022–6031.
- Pallant, A., Eskenazi, A., Mattei, M. G., Fournier, R. E. K., Carlsson, S. R.,

- Fukuda, M., & Frelinger, J. G. (1989). Characterization of cDNAs encoding human leukosialin and localization of the leukosialin gene to chromosome 16. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(4), 1328–1332. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.4.1328>
- Panopoulos, A. D., Zhang, L., Snow, J. W., Jones, D. M., Smith, A. M., El Kasmi, K. C., Liu, F., Goldsmith, M. A., Link, D. C., Murray, P. J., & Watowich, S. S. (2006). STAT3 governs distinct pathways in emergency granulopoiesis and mature neutrophils. *Blood*, 108(12), 3682–3690. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-003012>
- 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>
- Park, H. J., & Choi, J. M. (2017). Sex-specific regulation of immune responses by PPARs. *Experimental and Molecular Medicine*, 49(8). <https://doi.org/10.1038/emm.2017.102>
- Park, J. K., Rosenstein, Y. J., Donnell, E. R., Bierer, B. E., Rosen, F. S., & Burakoff, S. J. (1991). Enhancement of T-cell activation Wiskott-Aldrich syndrome. *Nature*, 350(April), 706–709.
- Pedraza-Alva, G., Mérida, L. B., Burakoff, S. J., & Rosenstein, Y. (1996). CD43-specific activation of T cells induces association of CD43 to Fyn kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(44), 27564–27568. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.44.27564>
- Pedraza-Alva, G., Mérida, L. B., Burakoff, S. J., & Rosenstein, Y. (1998). T cell activation through the CD43 molecule leads to Vav tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(23), 14218–14224. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.23.14218>
- Peng, Z., Liu, C., Victor, A. R., Cao, D. Y., Veiras, L. C., Bernstein, E. A., Khan, Z., Giani, J. F., Cui, X., Bernstein, K. E., & Okwan-Duodu, D. (2021). Tumors exploit CXCR4hiCD62Llo aged neutrophils to facilitate metastatic spread. *Oncotarget*, 10(1). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1870811>
- Piller, F., Piller, V., Fox, R. I., & Fukuda, M. (1988). Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 263(29), 15146–15150.
- Price, T. H., Chatta, G. S., & Dale, D. C. (1996). Effect of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil kinetics in normal young and elderly humans. *Blood*, 88(1), 335–340. <https://doi.org/10.1182/blood.v88.1.335.bloodjournal881335>
- Remold-O'Donnell, E., Kenney, D., & Rosen, F. S. (1987). Biosynthesis of human sialophorins and analysis of the polypeptide core. *Biochemistry*, 26(13), 3908–3913. <https://doi.org/10.1021/bi00387a025>
- Remold-O'Donnell, E., & Parent, D. (1994). Two proteolytic pathways for down-regulation of the barrier molecule CD43 of human neutrophils. *Journal of Immunology*, 152(7), 3595–3605. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7511653>
- Remold-O'Donnell, E., & Parent, D. (1995). Specific sensitivity of CD43 to neutrophil elastase. *Blood*, 86(6), 2395–2402. <https://doi.org/10.1182/blood.V86.6.2395.bloodjournal8662395>
- Remold-O'Donnell, E., Zimmerman, C., Kenney, D., & Rosen, F. S. (1987). Expression on blood cells of sialophorin, the surface glycoprotein that is defective in

Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*, 70(1), 104–109.

Rieu, P., Porteu, F., Bessou, G., Lesavre, P., & Halbwachs-Mecarelli, L. (1992). Human neutrophils release their major membrane sialoprotein, leukosialin (CD43), during cell activation. *European Journal of Immunology*, 22(11), 3021–3026. <https://doi.org/10.1002/eji.1830221138>

Robertson, S. A., & Seamark, R. F. (1992). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (Gm-csf): One of a family of epithelial cell-derived cytokines in the preimplantation uterus. *Reproduction, Fertility and Development*, 4(4), 435–448. <https://doi.org/10.1071/RD9920435>

Röhm, M., Grimm, M. J., D'Auria, A. C., Almyroudis, N. G., Segal, B. H., & Urban, C. F. (2014). NADPH oxidase promotes neutrophil extracellular trap formation in pulmonary aspergillosis. *Infection and Immunity*, 82(5), 1766–1777. <https://doi.org/10.1128/IAI.00096-14>

Rosales, C. (2018). Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Frontiers in Physiology*, 9(FEB), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00113>

Rosales, C., Demaurex, N., Lowell, C. A., & Uribe-Querol, E. (2016). Neutrophils: Their Role in Innate and Adaptive Immunity. En *Journal of immunology research* (Vol. 2016, p. 1469780). <https://doi.org/10.1155/2016/1469780>

Rosales, C., & Uribe-Querol, E. (2017). Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed Research International*, 2017, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2017/9042851>

Rosenstein, Y., Park, J. K., Hahn, W. C., Rosent, F. S., Bierer, B. E., & Burakoff, S. J. (1991). binds ICAM-1. 354(November), 233–235.

Santana, M. A., Pedraza-Alva, G.,

Olivares-Zavaleta, N., Madrid-Marina, V., Horejsi, V., Burakoff, S. J., & Rosenstein, Y. (2000). CD43-mediated signals induce DNA binding activity of AP-1, NF-AT and NFκB transcription factors in human T lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31460–31468. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005231200>

Schmid, K., Hediger, M. A., Brossmer, R., Collins, J. H., Haupt, H., Marti, T., Offner, G. D., Schaller, J., Takagaki, K., Walsh, M. T., Schwick, H. G., Rosen, F. S., & Remold-O'Donnell, E. (1992). Amino acid sequence of human plasma galactoglycoprotein: Identity with the extracellular region of CD43 (sialophorin). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(2), 663–667. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.2.663>

Seo, W., & Ziltener, H. J. (2009). CD43 processing and nuclear translocation of CD43 cytoplasmic tail are required for cell homeostasis. *Blood*, 114(17), 3567–3577. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-228791>

Seveau, S., Lopez, S., Lesavre, P., Guichard, J., Cramer, E. M., & Halbwachs-Mecarelli, L. (1997). Leukosialin (CD43, sialophorin) redistribution in uropods of polarized neutrophils is induced by CD43 cross-linking by antibodies, by colchicine or by chemotactic peptides. *Journal of Cell Science*, 110(13), 1465–1475.

Shelley, C. S., Donnell, E. R., Rosen, S., & Whiteheadtt, A. S. (1990). Structure of the human sialophorin (CD43) gene. *The Biochemical Journal*, 270, 569–576.

Sheshachalam, A., Srivastava, N., Mitchell, T., Lacy, P., & Eitzen, G. (2014a). Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. *Frontiers in Immunology*, 5(SEP), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00448>

Sheshachalam, A., Srivastava, N., Mitchell, T., Lacy, P., & Eitzen, G. (2014b).

Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. *Frontiers in Immunology*, 5(SEP), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00448>

Sperling, A. I., Green, J. M., Mosley, R. L., Smith, P. L., DiPaolo, R. J., Klein, J. R., & Bluestone, Jeffrey A. and Thompson, C. B. T. (1995). CD43 Is a Murine T Cell Costimulatory Receptor that Functions Independently of CD28. *J. Exp. Med*, 182, 139–146. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Spitzer, J. A., & Zhang, P. (1996). Gender differences in neutrophil function and cytokine-induced neutrophil chemoattractant generation in endotoxic rats. *Inflammation*, 20(5), 485–498. <https://doi.org/10.1007/BF01487041>

Steinberg, B. E., & Grinstein, S. (2007). Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, 2007(379), 1–5. <https://doi.org/10.1126/stke.3792007pe11>

Stöckl, J., Majdic, O., Kohl, P., Pickl, W. F., Menzel, J. E., & Knapp, W. (1996). Leukosialin (CD43)-major histocompatibility class I molecule interactions involved in spontaneous T cell conjugate formation. *Journal of Experimental Medicine*, 184(5), 1769–1779. <https://doi.org/10.1084/jem.184.5.1769>

Straub, R. H. (2007). The complex role of estrogens in inflammation. *Endocrine Reviews*, 28(5), 521–574. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0001>

Swamydas, M., Luo, Y., Dorf, M. E., & Lionakis, M. S. (2015). Isolation of mouse neutrophils. *Current Protocols in Immunology*, 2015(August), 3.20.1–3.20.15. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0320s110>

Szabady, R. L., Lokuta, M. A.,

Walters, K. B., Huttenlocher, A., & Welch, R. A. (2009). Modulation of neutrophil function by a secreted mucinase of *Escherichia coli* O157:H7. *PLoS Pathogens*, 5(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000320>

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>

Thomas, D. C. (2017). The phagocyte respiratory burst: Historical perspectives and recent advances. *Immunology Letters*, 192, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.08.016>

Torres-Huerta, A., Aleman-Navarro, E., Bravo-Adame, M. E., Sandoval-Hernandez, M. A., Migueles-Lozano, O. A., & Rosenstein, Y. (2017). CD43. En S. Choi (Ed.), *Encyclopedia of Signaling Molecules* (pp. 893–905). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4_523

Tuccillo, F. M., De Laurentiis, A., Palmieri, C., Fiume, G., Bonelli, P., Borrelli, A., Tassone, P., Scala, I., Buonaguro, F. M., Quinto, I., & Scala, G. (2014). Aberrant glycosylation as biomarker for cancer: Focus on CD43. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/742831>

Ueda, Y., Kondo, M., & Kelsoe, G. (2005). Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *Journal of Experimental Medicine*, 201(11), 1771–1780. <https://doi.org/10.1084/jem.20041419>

van den Berg, T. K., Nath, D., Ziltener, H. J., Vestweber, D., Fukuda, M., van Die, I., & Crocker, P. R. (2001). Cutting Edge: CD43 Functions as a T Cell Counterreceptor for the Macrophage Adhesion Receptor Sialoadhesin (Siglec-1). *The Journal of Immunology*, 166(6),

3637–3640.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.6.3637>

Vargas-Cortes, M., Axelsson, B., Larsson, Å., Berzins, T., & Perlmann, P. (1988). Enhancement of Human Spontaneous Cell-Mediated Cytotoxicity by a Monoclonal Antibody against the Large Sialoglycoprotein (CD 43) on Peripheral Blood Lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 27(6), 661–671. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1365-3083.1988.tb02399.x>

Veda, P. (2011). Why are neutrophils polymorphonuclear? *European Journal of Inflammation*, 9(2), 85–93.

Vega-Mendoza, D., Cañas-Linares, A., Flores-Alcantar, A., Espinosa-Neira, R., Melchy-Perez, E., Vera-Estrella, R., Auvynet, C., & Rosenstein, Y. (2021). CD43 (sialophorin) is involved in the induction of extracellular matrix remodeling and angiogenesis by lung cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 236(9), 6643–6656. <https://doi.org/10.1002/jcp.30308>

Velázquez, F., Grodecki-Pena, A., Knapp, A., Salvador, A. M., Nevers, T., Croce, K. J., & Alcaide, P. (2016). CD43 Functions as an E-Selectin Ligand for Th17 Cells In Vitro and Is Required for Rolling on the Vascular Endothelium and Th17 Cell Recruitment during Inflammation In Vivo. *The Journal of Immunology*, 196(3), 1305–1316. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501171>

Walrand, S., Valeix, S., Rodriguez, C., Ligot, P., Chassagne, J., & Vasson, M.-P. (2003). Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 331(1–2), 103–110. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(03\)00086-x](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(03)00086-x)

Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli,

L., Han, H., Grigoryev, S. A., Allis, C. D., & Coonrod, S. A. (2009). Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *Journal of Cell Biology*, 184(2), 205–213. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806072>

Warrington, R., Watson, W., Kim, H. L., & Antonetti, F. R. (2011). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 7(S1), 2–8. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-7-S1-S1>

Wikén, M., Björck, P., Axelsson, B., & Perlmann, P. (1988). Induction of CD43 Expression during Activation and Terminal Differentiation of Human B Cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 28(4), 457–464. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1988.tb01476.x>

Yoshimura, A., Asahina, Y., Chang, L. Y., Angata, T., Tanaka, H., Kitajima, K., & Sato, C. (2021). Identification and functional characterization of a Siglec-7 counter-receptor on K562 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100477>

Yvan-Charvet, L., & Ng, L. G. (2019). Granulopoiesis and Neutrophil Homeostasis: A Metabolic, Daily Balancing Act. *Trends in Immunology*, 40(7), 598–612. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.05.004>

Zemelman, B. V., Chu, S. H. W., & Walker, W. A. (1989). Host response to Escherichia coli heat-labile enterotoxin via two microvillus membrane receptors in the rat intestine. *Infection and Immunity*, 57(10), 2947–2952. <https://doi.org/10.1128/iai.57.10.2947-2952.1989>

Zipursky, A., Bow, E., Seshadri, R. S., & Brown, E. . (1976). Leukocyte Density and Volume in Normal Subjects and in Patients With acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*, 48(3), 361–371.

Apéndice I (Reactivos)

Anticuerpos para citometría de flujo

Anticuerpo	Fluorocromo	Número de catalogo Marca	Clona	Concentración final por muestra	µL de Ac por muestra
Ly6G	FITC	108417 Biolegend	RB6-8C5	0.625 µg/mL	0.125 µL
CD11b	APC	101212 Biolegend	M1/70	0.25 µg/mL	0.125 µL
CXCR2	PE	149304 Biolegend	SA044G4	1 µg/mL	0.5 µL
CXCR4	BV421	146511 Biolegend	L276F12	2.5 µg/mL	1.25 µL
CD43	APC	143208 eBioscience	S-11	0.25 µg/mL	0.125 µL
CD16/32	-	14016182 eBioscience	93	0.25 µg/mL	0.125 µL

Reactivo/Material	Número de catálogo y Marca
4, 6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato	D 1306 Molecular Probes
Azul tripano	T 84154 Sigma-Aldrich
Dextran 500	17032001 Pharmacia Fine Chemicals
Dihidroetidio (DHE)	D23107 Thermo Fisher
Forbol Miristato Acetato (PMA)	P 1680 LC Laboratories
Heparina sódica	Inhepar Pisa
Histopaque (densidad 1.119 g/mL)	1119 Sigma-Aldrich
Histopaque/Lymphoprep (densidad 1.077 g/mL)	07811 Axis-Shield PoC AS
L- Glutamina	PCS ATCC Primary Cell Solutions
Neutrophil Isolation Kit, mouse	130 097 658 Miltenyi,
Paraformaldehído	P 6148 Sigma-Aldrich
Penicilina/estreptomicina	15140148 Gibco™
Placa de cultivo Fluorodish	FD 3510 World Precision Instruments
Polymorphprep (densidad 1.113 g/mL)	1114683 Axis-Shield PoC AS

Red Blood Cell Lysing Buffer Hybri-Max	R 7757 Sigma-Aldrich
RPMI 1640	12633020 Gibco
Tubos cónicos 0.6 mL	MCT 060 C Corning-Axygen Quality
Tubos cónicos 1.5 mL	MCT 150 L C Corning-Axygen Quality
Tubos cónicos de 15 mL	430052 Corning
Tubos de citometría de flujo	60818 VWR International

Soluciones

PBS 1x

137 mM NaCl.

2.7 mM KCl.

10 mM Na₂HPO₄.

1.7 mM KH₂PO₄.

Disolver en agua bidestilada, ajustar el pH a 7.6 y filtrar utilizando una membrana de 0.22 µm. Finalmente esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos, almacenar a temperatura ambiente.

Dextran al 6%

PBS 1X estéril.

6% de Dextran 500.

Filtrar utilizando una membrana de 0.22 µm en condiciones estériles y almacenar a 4°C.

Solución de FACs

PBS 1X.

0.02 % azida de sodio.

2% de Suero fetal bovino (descomplementado a baño maría durante 30 minutos a 56°C).

Filtrar utilizando una membrana de 0.22 µm en condiciones estériles y almacenar a 4°C.

Solución de bloqueo

Solución de FACs.

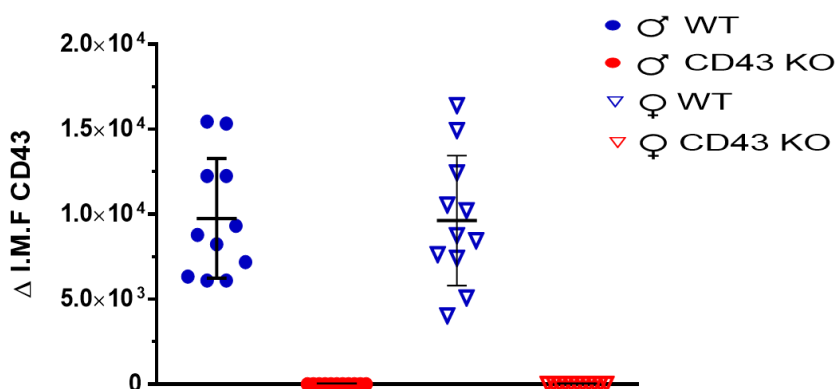
20% de suero humano o caballo.

Anticuerpo anti-CD16/32 a 0.25 µg/mL.

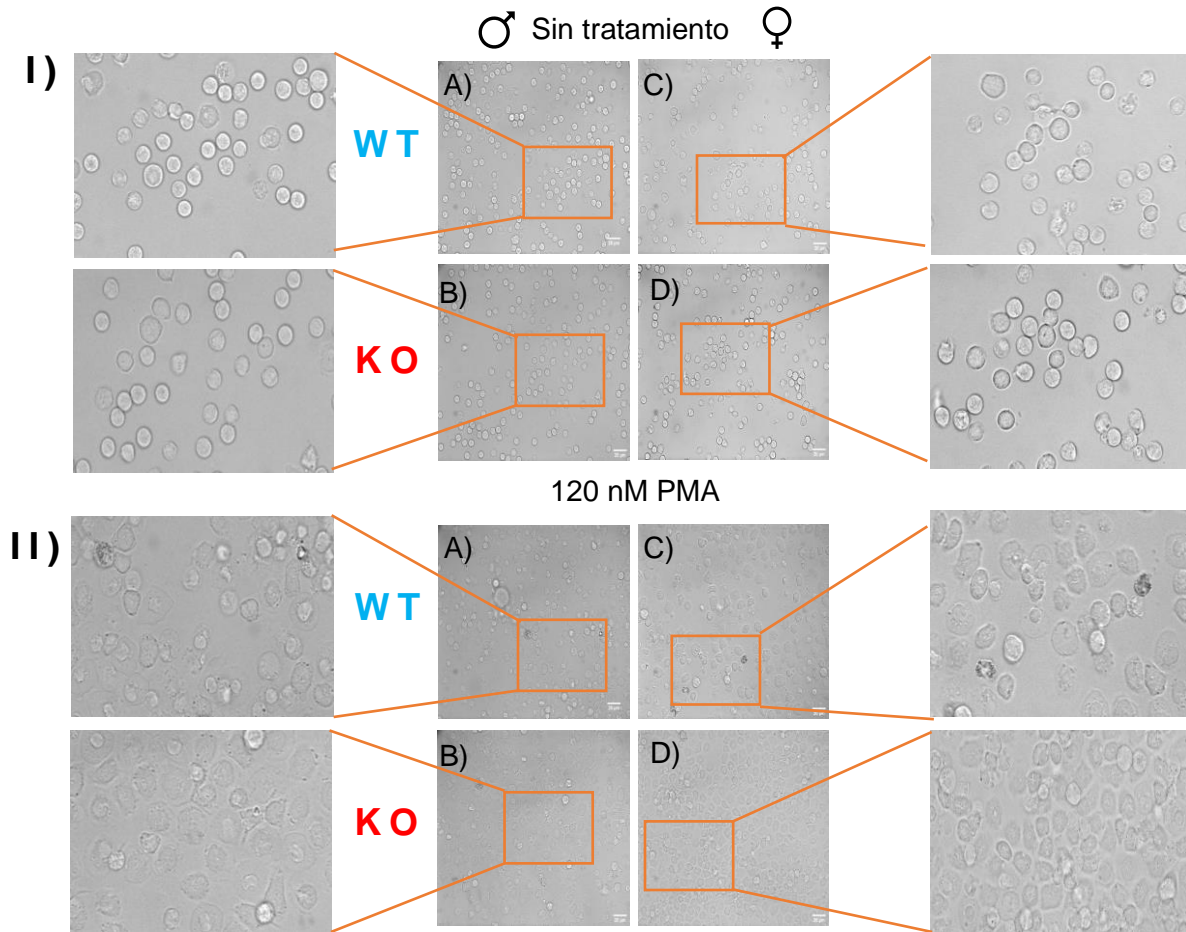
Apéndice II (Resultados)

Método (Enriquecimiento+ selección negativa)	Células iniciales	Rendimiento	Pureza
Machos WT	$\sim 5 \times 10^7$	$\sim 2.59 \times 10^6$	$97.4 \pm 1.2 \%$
Machos CD43 KO	$\sim 5 \times 10^7$	$\sim 2.48 \times 10^6$	$95.4 \pm 1.8 \%$
Hembras WT	$\sim 5 \times 10^7$	$\sim 2.20 \times 10^6$	$95.42 \pm 1.84 \%$
Hembras CD43 KO	$\sim 5 \times 10^7$	$\sim 2.3 \times 10^6$	$95.37 \pm 2.59 \%$

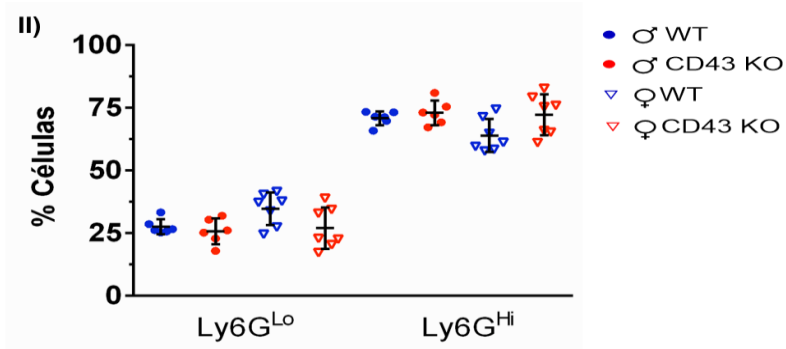
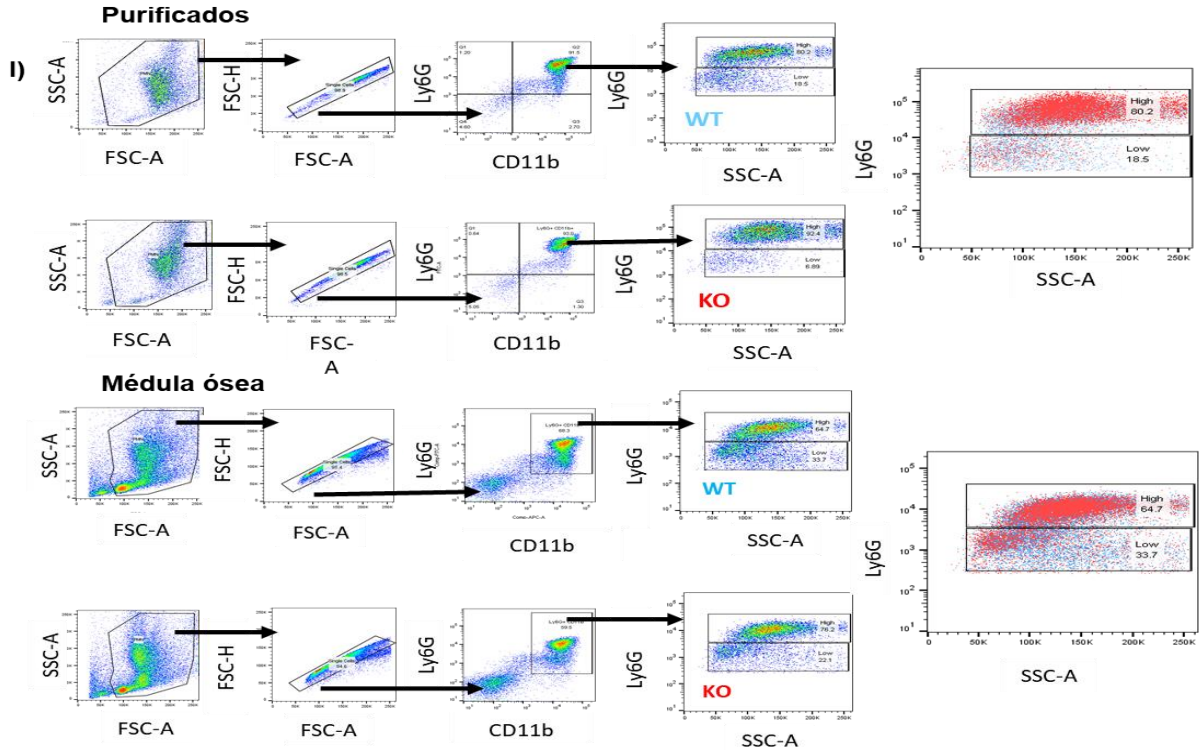
Apéndice II-1. El rendimiento y su pureza es semejante entre ratones WT y CD43 KO, y entre sexos después del proceso de purificación. Las células iniciales fue el número de las células de médula ósea de ratones C57BL/6 machos y hembras, WT y CD43 KO (16-24 semanas de edad) antes de purificarse. El rendimiento corresponde al número de neutrófilos obtenidos posteriormente de purificarse por gradiente de densidad, y selección negativa. Las células CD11b⁺ Ly6G⁺ fueron consideradas como neutrófilos y corresponden a la pureza después del proceso de purificación.



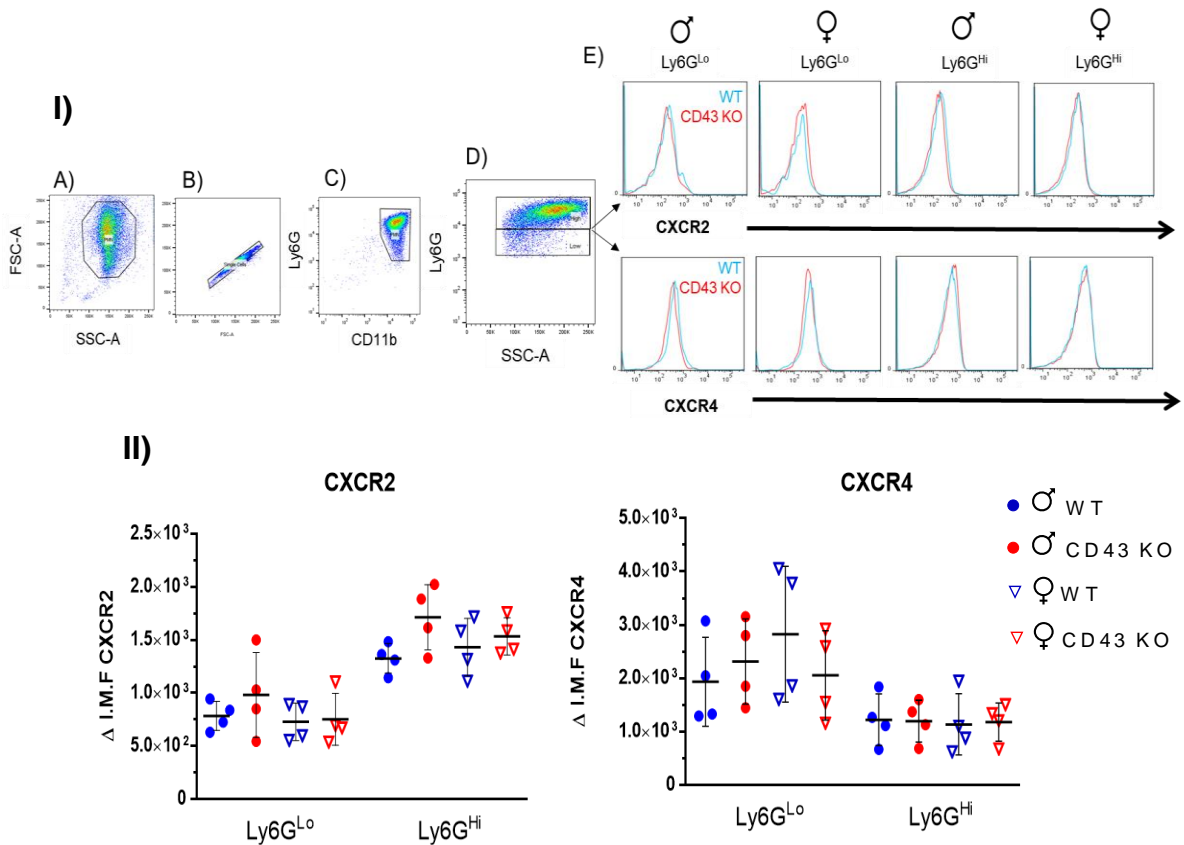
Apéndice II-2. La expresión de CD43 en la superficie de los neutrófilos es semejante entre ratones macho y hembra silvestres, después del proceso de purificación. Las células de médula ósea de ratones C57BL/6 machos y hembras, WT y CD43 KO (16-24 semanas de edad) se purificaron por gradiente de densidad, y selección negativa. Las células fueron teñidas con un anticuerpo anti-CD43 acoplado a APC. La cantidad de CD43 fue evaluada con un citómetro FACsCanto II, el análisis se realizó con el software FlowJo y la cantidad de CD43 se presenta como la intensidad media de fluorescencia (IMF). Cada punto representa un ratón (n= 10 machos y n= 10 hembras). Se indica promedio \pm desviación estándar. Sin diferencias significativas, ANOVA prueba post hoc Tukey.



Apéndice II-3. Figura 4.3. La ausencia de CD43 afecta a la formación de NETs de neutrófilos, con un efecto asociado al sexo. Los neutrófilos de médula ósea de ratones C57BL/6 machos y hembras, WT y CD43 KO se estimularon o no con 120 nM de PMA durante 4 horas a 37°C y 5 % CO₂, después de lo cual las células se observaron y tomaron microfotografías con un microscopio invertido de contraste diferencial interferencial (DIC) (Olympus IX81, iluminación CoolLED pE-2, cámara Photometrics Roper CoolSnap Monochromatic, aumento 600X). **I)** Los neutrófilos sin tratamiento de (A) macho WT, (B) macho CD43 KO, (C) hembra WT y, (D) hembra CD43 KO, conservan su forma uniforme y conservan la integridad de su membrana celular. **II)** (A) neutrófilos de macho WT; (B) neutrófilos de macho CD43 KO; (C) neutrófilos de hembra WT; (D) neutrófilos de hembra CD43 KO, tratados con 120 nM de PMA, las células pierden la integridad de la membrana, las células no son uniformes y se observan restos celulares. La barra representa 20 μ M.



Apéndice II-4. El porcentaje de neutrófilos Ly6G^{Lo} o Ly6G^{Hi} tiende a ser diferente en la médula ósea de ratones hembra, WT y CD43 KO. Las células de médula ósea de ratones C57BL/6 machos y hembras, WT y CD43 KO (16-24 semanas de edad) se purificaron o no por gradiente de densidad, y selección negativa. Las células CD11b⁺ Ly6G⁺ fueron consideradas como neutrófilos. **I)** Estrategia de análisis para la identificación de subpoblaciones de neutrófilos Ly6G^{Lo} o Ly6G^{Hi} en células purificadas o en médula ósea sin purificar. A) A partir del *dot plot* de SSC vs FSC se seleccionaron las células correspondientes a células mononucleares y granulocitos, B) posteriormente se seleccionaron las *single cells*, C) enseguida se seleccionaron los eventos positivos a Ly6G⁺ CD11b⁺ consideradas como neutrófilos, D) a partir de los cuales se delimitaron las subpoblaciones Ly6G^{Lo} o Ly6G^{Hi} de acuerdo a la expresión del marcador Ly6G vs SSC. **II)** Se muestra el porcentaje de neutrófilos Ly6G^{Lo} y Ly6G^{Hi} de médula ósea sin purificar obtenidos del análisis de la sección anterior. Cada punto representa un ratón (n=6 machos y n=7 hembras). Se indica promedio \pm desviación estándar. Sin diferencias significativas, ANOVA prueba post hoc Tukey.



Apéndice II-5. La expresión de CXCR2 y CXCR4 en la superficie de los neutrófilos es semejante en neutrófilos Ly6G^{Lo} o Ly6G^{Hi} de ratones macho y hembra, WT y CD43 KO. I) Estrategia de análisis para la identificación de subpoblaciones de neutrófilos Ly6G^{Lo} o Ly6G^{Hi} que presentan los receptores de quimiocinas CXCR2 (IL-8RB) y CXCR4 (CXCL12). A) A partir del dot plot de SSC vs FSC se seleccionaron las células correspondientes a granulocitos, B) posteriormente se seleccionaron las *single cells*, C) enseguida se seleccionaron los eventos positivos a Ly6G⁺ CD11b⁺ consideradas como neutrófilos, D) a partir de los cuales se delimitaron las subpoblaciones Ly6G^{Lo} o Ly6G^{Hi} de acuerdo a la expresión del marcador Ly6G vs SSC, E) Se muestran los histogramas de CXCR2 y CXCR4 en las fracciones Ly6G^{Lo} o Ly6G^{Hi} de ratones WT y CD43 KO machos y hembras. II) Se muestra la cantidad de CXCR2 y CXCR4 representada como la intensidad media de fluorescencia (IMF). Cada punto representa un ratón (n= 4 machos y n= 4 hembras). Se indica promedio ± desviación estándar. Sin diferencias significativas, ANOVA prueba post hoc Tukey.

