

Tesis Doctoral

Propiedades inmunomodulatorias de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)

Sabbione, Florencia

2016-03-04

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sabbione, Florencia. (2016-03-04). Propiedades inmunomodulatorias de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Sabbione, Florencia. "Propiedades inmunomodulatorias de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-04.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Propiedades inmunomodulatorias de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: **Química Biológica**

Lic. Florencia Sabbione

Directora: Dra. Analía S. Trevani

Consejero de estudios: Dr. Gabriel Rabinovich

Laboratorio de Inmunidad Innata
Instituto de Medicina Experimental (IMEX) - CONICET
Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires

Buenos Aires, marzo de 2016

Propiedades inmunomodulatorias de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)

La injuria pulmonar produce la liberación de ácido úrico que, a concentraciones locales elevadas, precipita formando cristales de urato monosódico (MSU). Estos cristales producen una considerable inflamación asociada a infiltración neutrofílica. Luego de la estimulación con MSU, los neutrófilos liberan trampas extracelulares (NETs), compuestas por cromatina y proteínas granulares, nucleares y citoplasmáticas asociadas. En este trabajo se estudió si las NETs inducidas por MSU (NETs-MSU), poseen propiedades inmunoregulatorias tanto sobre células epiteliales pulmonares como sobre otras células del sistema inmune innato como células dendríticas y macrófagos.

Se observó que las NETs-MSU incrementaron significativamente la secreción de interleuquina (IL) 8 e IL-6 por células epiteliales pulmonares y bronquiales. Estos efectos no fueron reproducidos por sobrenadantes de neutrófilos estimulados con MSU en presencia de inhibidores de la netosis, como un inhibidor de elastasa o el inhibidor de la NADPH oxidasa DPI. Las NETs-MSU no afectaron la viabilidad de las células epiteliales, ni su morfología, como tampoco la integridad de la barrera epitelial formada por células epiteliales polarizadas. La capacidad estimuladora de citoquinas de las NETs no fue afectada por la degradación del ADN con nucleasa micrococcal, ni tampoco por el tratamiento de las mismas con heparina o cuando la actividad de la elastasa asociada a las NETs fue bloqueada con un inhibidor. Sin embargo, el efecto observado fue revertido al tratar a las NETs con un anticuerpo bloqueante de la proteína del grupo de alta movilidad (HMGB1).

El efecto proinflamatorio de las NETs se observó también en macrófagos humanos derivados de monocitos pero no en células dendríticas derivadas de monocitos, indicando que las propiedades proinflamatorias de las NETs-MSU son específicas de ciertos tipos celulares.

En conjunto, los resultados de esta tesis indican que las NETs inducidas por MSU inducen efectos proinflamatorios en células de las vías respiratorias, que podrían contribuir al reclutamiento de neutrófilos in vivo y a la perpetuación de la inflamación y al daño del tejido pulmonar. Nuestros hallazgos podrían ser relevantes para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por una inflamación marcada del tracto respiratorio, como la fibrosis quística y el daño pulmonar agudo (ALI). En estas patologías, a pesar de haberse corroborado la presencia de grandes cantidades de NETs en el tracto respiratorio, el tratamiento con DNasas no logra resolver el cuadro inflamatorio. Los resultados de este trabajo de tesis, indicando que el tratamiento de las NETs con MNasa no reduce su capacidad proinflamatoria permiten especular que tratamientos tendientes a limitar la producción de las NETs o a bloquear a la molécula HMGB1, podrían representar opciones terapéuticas más apropiadas a fin de mitigar la inflamación que acompaña a estas patologías.

Palabras clave: Trampas extracelulares de neutrófilos, cristales de urato monosódico, neutrófilos, células epiteliales

Immunomodulatory effects of neutrophil extracellular traps (NET)

Lung tissue injury leads to the release of uric acid which at high local concentrations forms monosodium urate crystals (MSU). These crystals trigger robust neutrophilic inflammation. Upon MSU stimulation, neutrophils release extracellular traps (NET) composed by chromatin and antimicrobial proteins associated. Here we investigated whether MSU-induced NET could be involved in the development of inflammation by stimulating cytokine release by airway epithelial cells and other relevant innate immune cells such as dendritic cells and macrophages.

We found that MSU-induced NET significantly increased the secretion of IL-8 and IL-6 by lung and bronchial epithelial cells. These effects were not observed when NETosis was impaired by Diphenyleneiodonium or elastase inhibitor. Furthermore, NET did not affect the viability of airway epithelial cells, neither did they modify their morphology nor the barrier integrity of polarized cells. The epithelial stimulatory capacity of NET was not affected by degradation of DNA with micrococcal nuclease (MNase), treatment of NET with heparin or inhibition of the elastase immobilized to DNA, but was significantly reduced by pretreatment of NET with an anti-high mobility group box-1 blocking antibody (HMGB1).

Additionally this proinflammatory effect was also observed in human monocyte-derived macrophages and not in human monocyte-derived dendritic cells. This indicates that the proinflammatory response is restricted to certain cell types.

Altogether, our findings indicate that MSU-induced NET exert direct proinflammatory effects on airway epithelial cells that might contribute in vivo to further recruitment of neutrophils and perpetuation of inflammation upon lung tissue damage.

These results could be relevant for treatment of pulmonary inflammatory pathologies, like cystic fibrosis and acute lung injury (ALI). Despite the fact that it has been proved the presence of large amounts of NET in these diseases, the current treatment with DNases does not resolve the associated inflammation. Our findings indicating that MNase treatment does not reduce the inflammatory capacity of NET suggest that treatments with NETosis inhibitors or HMGB1 blocking antibodies could be relevant therapeutics options to mitigate the inflammation in these pathologies.

Key words: neutrophil extracellular traps, monosodium urate crystals, neutrophil, epithelial

Agradecimientos

A Analía, por enseñarme y guiarme a lo largo de todos estos años de tesis.

A Lau por acompañarme desde el principio, escucharme, aconsejarme y ayudarme siempre en el día a día, pasando de ser una guía en el laboratorio a una gran amiga.

A Juan, por darme las enseñanzas iniciales de este trabajo de tesis.

A Ire, Mauri, Leo y Jere por hacer el trabajo entretenido, convirtiéndose no solo en buenos compañeros sino también en buenos amigos.

A Ire, además por ayudarme con la corrección de este trabajo, y con la alineación, tamaños y otros de sus T.O.C que me resultaron muy útiles.

A Sole, por ser una gran amiga y compañía en todos estos años, por avanzar conmigo en todo momento, apoyándonos, ayudándonos y aconsejándonos tanto dentro como fuera del laboratorio.

A Kike, por compartir tanto los experimentos así como buenos momentos fuera del ámbito del laboratorio.

A Nadia, Mer, Deni, Anita, Bele, Juli, por estar siempre dispuestos a ayudar y por compartir muchos buenos momentos trabajando o divirtiéndonos, o a veces ambas cosas a la vez.

A Viky por compartir largos experimentos y darme ánimo, festejando juntas nuestros logros.

A Moni, por estar siempre dispuesta a ayudar a todos en cualquier cosa que se necesite.

A Mirta, Caro, Romi, y Gaby por escucharme y aconsejarme con los resultados de este trabajo.

A Betty por las charlas, los consejos, la buena onda y la ayuda en el laboratorio.

A mis amigas de la facultad, Yani, Lore, Gise, Susi, Lau, Mili y Jime por acompañarme desde los inicios hasta el final de la tesis.

A Mili además por ayudarme siempre con todos los trámites relacionados a esta tesis.

A mis amigos y amigas de siempre por contenerme y darme el ánimo necesario para seguir adelante siempre.

A mis papás y hermanas por apoyarme siempre en mi trabajo, incluso escuchando numerosas veces contenidos biológicos incluso en distintos idiomas.

A Fernando por bancarse los últimos días de tesis e incluso interesarse por los neutrófilos y sus trampas extracelulares. Por cuidarme y apoyarme siempre.

Índice

Propiedades inmunomoduladoras de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)

Abreviaturas	9
Introducción	11
Respuesta inmune	12
Estrategias de reconocimiento del sistema inmune	13
Células de la Inmunidad Innata: Células dendríticas, macrófagos y neutrófilos	18
Células dendríticas	19
Macrófagos	22
Neutrófilos	24
Mecanismos microbicidas independientes del oxígeno	25
Mecanismos microbicidas dependientes del oxígeno	25
Procesos que median la eliminación de los agentes infectantes	26
Fagocitosis	26
Netosis	27
Mecanismos de la netosis	30
Resolución de la inflamación y remoción de NETs	34
Potencial patogénico de las NETs	36
NETs en patologías respiratorias	38
Materiales y Métodos	44
Reactivos utilizados	45
Obtención de neutrófilos.....	46
Líneas celulares.....	47
Diferenciación de células dendríticas humanas derivadas de monocitos (CD).	48
Diferenciación de macrófagos humanos (MØ)	49
Preparación de cristales de urato monosódico (MSU).....	49
Obtención de trampas extracelulares de neutrófilos	50
Cuantificación de NETs	52
Identificación de NETs por microscopía confocal.....	53
Estimulación de células epiteliales.	54
Estimulación de células dendríticas.....	55
Estimulación de macrófagos.....	55
Evaluación de la viabilidad celular de los neutrófilos y células dendríticas.....	55

Evaluación de la viabilidad de células epiteliales post estimulación	56
Evaluación de la morfología de células epiteliales	57
Citometría de flujo.....	57
Análisis estadístico.....	58
Resultados	59
Capítulo 1: Impacto de las NETs sobre células epiteliales pulmonares	60
Los cristales de MSU estimulan la producción de NETs	61
Las NETs incrementan la secreción de citoquinas por células epiteliales del tracto respiratorio.	68
La capacidad estimuladora de las NETs sobre las células epiteliales es similar a la ejercida por diferentes PMAPs.	77
Las NETs no afectan la viabilidad de las células epiteliales	79
Identificación del factor de las NETs responsable de los efectos inmunoestimulatorios en células epiteliales	83
Capítulo 2: Impacto de las NETs sobre células dendríticas y macrófagos	91
Las NETs estimulan la secreción de IL-8 por macrófagos humanos.	92
Las NETs no estimulan la secreción de citoquinas por células dendríticas humanas derivadas de monocitos.....	93
Discusión	98
Conclusiones.....	111
Referencias	115

Abreviaturas

ALI: Injuria pulmonar aguda

CD: células dendríticas humanas derivadas de monocitos

DPI: Difeniliodonio

FITC: isotiocianato de fluoresceína

HMGB1: proteína del grupo B1 de alta movilidad

IE: inhibidor de elastasa

IRO: Intermediarios reactivos del oxígeno

LPS: lipopolisacárido

Mnasa: Nucleasa Micrococcal

MPO: mieloperoxidasa

MSU: (cristales de) urato monosódico

M ϕ : macrófagos

NETs: trampas extracelulares de neutrófilos

NLRs: receptores de tipo NOD

PE: ficoeritrina

PMA: ácido forbolmirístico

PMAD: patrones moleculares asociados a daño

PMAP: patrones moleculares asociados a patógenos

PMN: células polimorfonucleares, neutrófilos

RAGE: receptor para compuestos de glicosilación avanzada

RIG: receptores inducibles por ácido retinoico

RLC: receptores de lectina tipo C

RRP: receptores de reconocimiento de patrones

SN PMNnec: sobrenadantes de neutrófilos necróticos

SN PMNse: sobrenadantes de neutrófilos no estimulados

TLR: receptores de tipo Toll

TNF: factor de necrosis tumoral

Introducción

Respuesta inmune

Todos los organismos vertebrados coexisten en un ambiente en el cual ciertos agentes pueden resultarles potencialmente patógenos pudiendo comprometer su vida. Es por ello que, a lo largo de los procesos evolutivos, se han seleccionado positivamente sistemas de defensa que les permiten afrontar las distintas amenazas a las que están expuestos con el menor compromiso de la funcionalidad de los órganos infectados. En animales vertebrados se pueden distinguir dos tipos de mecanismos efectores de la respuesta inmune, los correspondientes a la respuesta innata y a la adaptativa. El sistema inmune innato detecta la presencia y la naturaleza de la infección, determina la localización microbiana, su viabilidad, replicación y patogenicidad. Asimismo provee la primera línea de defensa y controla el inicio y el tipo de respuesta adaptativa subsecuente (Iwasaki & Medzhitov 2015). En muchas ocasiones la respuesta inmune innata es por sí misma capaz de eliminar al invasor, hecho que dependerá del tamaño del inoculo y la virulencia del patógeno. En otras situaciones, sólo logra contener la infección hasta tanto se desarrolle una respuesta adaptativa. La misma será dirigida en forma precisa hacia el organismo invasor e involucrará la participación de linfocitos B y T que expresarán receptores específicos para estructuras moleculares presentes en dicho microorganismo a las cuales se denomina antígenos. En la mayor parte de los procesos infecciosos, estos mecanismos permitirán eliminar al patógeno. Se iniciará entonces una fase tendiente a reparar el tejido y alcanzar nuevamente la homeostasis (Medzhitov & Janeway 1997).

Estrategias de reconocimiento del sistema inmune

El sistema inmune innato y el adaptativo emplean distintas estrategias para identificar a los agentes invasores. Las de la respuesta inmune adaptativa se basan en la generación, al azar, de un diverso y variado repertorio de receptores de potenciales antígenos (receptores de las células T –TCR- y receptores de las células B –BCR-), seguido de una selección y expansión de aquellos clones con receptores con especificidades relevantes ante el encuentro con el antígeno (Medzhitov 2001). Las estrategias de reconocimiento de la respuesta inmune innata por su parte, se basan en la detección de productos constitutivos conservados de los microorganismos. Numerosas vías metabólicas y productos génicos son exclusivos de microorganismos y se encuentran ausentes en las células del hospedador. Muchos de estos productos constitutivos se encuentran conservados en la mayoría de los microorganismos que componen una misma clase y suelen ser esenciales para su supervivencia. Ejemplos de éstos son los lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas, peptidoglicanos y ácidos lipoteicoicos. Estos productos pueden ser distinguidos por el sistema inmune como señales de exposición a un microorganismo y por ello constituyen los blancos de reconocimiento de los receptores de la inmunidad innata (Medzhitov & Janeway 1997). A estos patrones moleculares conservados se los denomina patrones moleculares asociados a patógenos (PMAPs). Los receptores, por medio de los cuales las células del sistema inmune innato reconocen estos PMAPs, se denominan receptores de reconocimiento de patrones (RRP). Algunos de estos receptores se expresan en la superficie celular, otros en compartimentos intracelulares o en el citosol, mientras algunos son receptores solubles secretados a la circulación sanguínea o a los fluidos tisulares. Las principales funciones de los RRP incluyen la activación de vías de señalización proinflamatorias e inducción de apoptosis, opsonización, fagocitosis y activación

del sistema de complemento y de las cascadas de coagulación (Medzhitov 2001, Iwasaki & Medzhitov 2015).

Además de reconocer PMAPs, el sistema inmune innato es capaz de reconocer señales endógenas de daño (Matzinger 1994, Kono et al. 2014). Estas señales, conocidas como patrones moleculares asociados a daño (PMADs), están representadas por (a) moléculas del huésped que usualmente se encuentran secuestradas en el interior de las células o compartimientos subcelulares y como consecuencia del daño celular son liberadas al medio o al citoplasma y pueden ser reconocidas por RRP, o (b) moléculas generadas extracelularmente, por ejemplo por proteólisis de proteínas de la matriz extracelular a consecuencia de la liberación de enzimas producida por la disrupción celular. El daño celular que conduce a la liberación de PMADs puede ser ocasionado tanto por la presencia de un patógeno como por agentes químicos, físicos o el propio trauma mecánico. Es así que el reconocimiento de PMADs permite a las células del sistema inmune innato diferenciar tejidos sanos de tejidos estresados o dañados y activar vías de señalización que conducen al desarrollo de respuestas inflamatorias. Estos acontecimientos permiten comprender por qué tanto la exposición a radiaciones y a ciertos agentes químicos, así como el trauma ocasionado por una cirugía, pueden inducir una respuesta del sistema inmune. De hecho, es ampliamente conocido que la muerte celular por necrosis conduce a la infiltración del tejido por células de la inmunidad innata (Pittman & Kubes 2013).

Los PMADs mejor estudiados son los cristales de urato monosódico cuya formación se postula que ocurre a expensas del ácido úrico liberado de células necróticas en microambientes extracelulares ricos en sodio (Shi et al. 2003). Otros PMADs están representados por el ATP liberado desde las mitocondrias de células necróticas, la proteína del grupo de alta movilidad

B1 (HMGB1), las proteínas S100, la cadena pesada de la miosina, el ADN mitocondrial y productos generados por fragmentación del ácido hialurónico, colágeno, elastina y laminina (Kono et al. 2014). Existen también agentes químicos que son capaces de inducir la activación de RRP, como ser las sales de aluminio comúnmente empleadas como adyuvantes vacunales y el asbesto. En situaciones de daño estéril la respuesta del sistema inmune generada tras el reconocimiento de PMADs podría tener consecuencias negativas ocasionando deterioro de tejidos sanos y eventualmente su fibrosis. Sin embargo, es posible que sea un mecanismo necesario para dar una respuesta rápida a efectos de prevenir infecciones en sitios vulnerables como podría ser un tejido dañado. También podría ser una respuesta necesaria para estimular la cicatrización y la restauración de la homeostasis del tejido (Pittman & Kubes 2013).

Así como los PMAP, los PMAD también pueden ser reconocidos por los RRP. Los receptores de reconocimiento de patrones pueden ser moléculas transmembrana, citoplasmáticas o secretadas. Existen distintos tipos de RRP que se clasifican en diversas familias. La expresión de las distintas familias no es uniforme en todas las células de la inmunidad innata. Asimismo, considerando un único tipo celular, la expresión de un mismo receptor puede variar dependiendo del estado de activación. Dentro de las distintas familias de receptores de reconocimiento de patrones se encuentran los receptores de tipo Toll (*Toll-like receptors*; TLR), receptores como lectina tipo C (*Lectin C-like receptors*; CLR), receptores de tipo RIG-I (*retinoic acid inducible I-like receptors*; RLR), receptores de tipo NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain (Nod)-like receptors*; NLRs), receptores tipo AIM-2 y una familia de enzimas que funcionan como sensores de ácidos nucleicos (Takeuchi & Akira 2010, Iwasaki & Medzhitov 2015).

Los TLR humanos constituyen una familia compuesta por 10 receptores que reconocen una amplia gama de ligandos que incluyen componentes de pared celular de bacterias y hongos, lipoproteínas bacterianas, proteínas conservadas en diferentes géneros y especies bacterianas, y ácidos nucleicos bacterianos y virales. El TLR4 reconoce el lipopolisacárido (LPS), un componente de la membrana externa de las bacterias gram negativas. El TLR2 reconoce componentes de bacterias, micoplasmas, hongos y virus. El TLR5 reconoce a la flagelina, la proteína estructural del flagelo, que es el órgano que les confiere movilidad a ciertas bacterias. Los TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 reconocen los ácidos nucleicos microbianos (Takeuchi & Akira 2010). Estos receptores tienen la particularidad de expresarse en la membrana de los endosomas y, por lo tanto detectan la presencia de ácidos nucleicos a nivel intracelular, más particularmente, dentro del endosoma. Asimismo se ha comprobado que, en ciertas patologías, fragmentos de ADN propio pueden alcanzar el compartimento endosómico y activar el TLR9 (Medzhitov 2001, Akira & Takeda 2004).

Los receptores de tipo NOD constituyen una familia de receptores exclusivamente citoplasmáticos que tienen la capacidad de detectar la presencia de señales inducidas por componentes microbianos que logran acceder al citoplasma, así como también señales de daño celular (Lamkanfi & Dixit 2009).

Los receptores de lectina tipo C reconocen arreglos de hidratos de carbono que no suelen expresarse en las células del hospedador.

Los receptores RIG-1 son receptores citoplasmáticos que reconocen ARN viral y parecen ser los responsables del reconocimiento de este tipo de infecciones por la mayor parte de los tipos celulares. La activación de estos receptores conduce a la producción de IFN de tipo I (Takeuchi & Akira 2010).

Recientemente se han identificado diversos sensores citoplasmáticos para ADN como los receptores DAI, DDX41 e IFI16. A su vez, AIM2 es capaz de reconocer ADN citosólico (Xiao & Fitzgerald 2013).

Tanto la detección de patógenos como de señales de daño provenientes de la ruptura de tejidos desencadenarán la respuesta del sistema inmune innato y consecuentemente el inicio de un proceso inflamatorio. La inflamación es la respuesta protectora del organismo para promover la remoción del estímulo perjudicial, así como el proceso de reparación del tejido dañado. Esta respuesta involucra una etapa aguda que finaliza cuando los tejidos se hallan reparados. Durante la misma, el proceso es orquestado por citoquinas y quimiocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF), la interleuquina 6 (IL-6), la interleuquina 1 (IL-1) y la interleuquina 8 (IL-8) (Takeuchi & Akira 2010). A nivel local, el TNF- α induce un incremento en la permeabilidad vascular que promueve el flujo de proteínas plasmáticas al sitio de daño. En conjunto con la IL-1 β , inducen un incremento en la expresión de moléculas de adhesión en la cara luminal del endotelio vascular favoreciendo la adhesión de leucocitos al endotelio, los cuales se marginan como consecuencia de la vasodilatación y de la permeabilidad que experimentan los vasos que irrigan el tejido infectado o dañado. Además, inducen la maduración y migración de ciertos tipos de células denominadas dendríticas a los órganos linfáticos secundarios, promoviendo de este modo el inicio de la respuesta adaptativa. El TNF- α estimula a las células endoteliales a expresar proteínas que inducen la cascada de la coagulación de la sangre en los pequeños vasos locales, lo que produce su oclusión y detenimiento del flujo sanguíneo dentro de los mismos para evitar la dispersión del patógeno a tejidos distantes. Si las concentraciones de IL-1 β , TNF- α e IL-6 se incrementan, dan lugar a un cuadro inflamatorio agudo y sistémico, denominado respuesta

de fase aguda, que intenta resolver el proceso infeccioso con la eliminación de su agente causal. Las acciones sistémicas mediadas por estas citoquinas son ejercidas sobre diferentes tejidos. A nivel hipotalámico, inducen el incremento en la temperatura corporal pues promueven la síntesis de prostaglandina E2 por la ciclooxigenasa 2. A nivel de la médula ósea y del pool marginal de neutrófilos, estimulan la liberación de estas células induciendo neutrofilia; y actuando a nivel hepático, inducen la producción de proteínas de fase aguda. Entre estas proteínas se incluyen la proteína C reactiva y a la lectina de unión a manosa, que permiten al hospedador contar en etapas tempranas del proceso infeccioso con moléculas con capacidad de reconocer al microorganismo como extraño y promover su eliminación a través de la activación del sistema complemento y la fagocitosis (Hoeffel et al. 2015).

Si bien la respuesta inflamatoria es esencial para la defensa del hospedador, en ocasiones en las que no sea controlada adecuadamente, puede resultar perjudicial causando daños al propio tejido. En particular, en situaciones en la cuales la respuesta es disparada por la presencia de un estímulo inflamatorio estéril, si el mismo no es removido, puede conducir a una respuesta inflamatoria crónica que exacerba el daño a los tejidos del huésped (Rock et al. 2010).

Células de la Inmunidad Innata: Células dendríticas, macrófagos y neutrófilos

El sistema inmune innato involucra distintos tipos celulares entre los que se incluyen diversos leucocitos y células que conforman tejidos que representan la línea de defensa más temprana frente a los patógenos como los epitelios corporales, entre otros. Dentro de los leucocitos que median mecanismos innatos, en esta tesis centraremos nuestra atención en describir las

principales características de los neutrófilos, macrófagos (MØ) y células dendríticas ya que fueron los tipos celulares involucrados en nuestros estudios.

Células dendríticas

Las células dendríticas, son células presentadoras de antígenos profesionales que además de su rol en la respuesta inmune innata local, cumplen un papel clave en la iniciación de la respuesta inmune adaptativa. Están distribuidas en todos los tejidos periféricos, donde exhiben una alta capacidad endocítica que les permite tomar muestras de su entorno con alta eficiencia, en un proceso de monitoreo continuo de posibles antígenos microbianos. Como expresan numerosos RRP, receptores para complemento y para IgG, pueden detectar rápidamente la presencia de invasores. Un ejemplo de ellas, lo constituyen las células de Langerhans que se ubican en la epidermis, donde forman un entramado celular merced a sus notables prolongaciones o dendritas que funcionan como una red eficaz de atrapamiento de microorganismos que ingresan por la piel. En los tejidos periféricos, las células dendríticas se encuentran como células inmaduras. El reconocimiento del microorganismo a través de los RRP, así como la estimulación de sus receptores para citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β y el TNF α , induce su maduración y migración a órganos linfáticos secundarios drenantes del sitio de infección a fin de promover la activación de la respuesta adaptativa. Durante este proceso de maduración, las células dendríticas procesan los antígenos del agente invasor. Ellas degradan parcialmente sus proteínas a péptidos, para luego asociarlos a las moléculas de histocompatibilidad (CMH) de clase I y de clase II en un mecanismo conocido como procesamiento antigénico. Además pierden la expresión de moléculas que las mantenían unidas al parénquima del tejido y comienzan a expresar moléculas que promueven su migración a los órganos linfáticos secundarios, como el receptor de quimiocinas CCR7.

Cuando ingresan a los órganos linfáticos secundarios drenantes del sitio de infección, completan su maduración. En estos órganos, las células dendríticas presentan a los linfocitos T los antígenos derivados del microorganismo asociados a moléculas del CMH sobre su superficie celular. Durante su maduración, las células dendríticas también incrementan la expresión de otras moléculas requeridas para la activación de los linfocitos T, conocidas como moléculas coestimuladoras, entre las cuales se destacan CD80 y CD86 (Banchereau et al. 2000).

Una vez activadas, las células dendríticas tienen la capacidad de secretar diferentes familias de citoquinas, que contribuyen a definir el curso de la respuesta inmune adaptativa. Las células dendríticas son las únicas capaces de activar a los linfocitos T vírgenes, y según las citoquinas que liberen y dependiendo de las citoquinas producidas por otras células de su entorno, promoverán la diferenciación de los linfocitos T CD4 hacia distintos perfiles, como Th1, Th2, Thf, Th17 o Treg. Cada uno de estos perfiles pone en juego diferentes mecanismos inmunitarios. Las células Th1 producen IFN gamma y cumplen un rol crítico en la respuesta inmune protectora frente a bacterias intracelulares y virus. Las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-25 y son críticas para la expulsión de parásitos extracelulares como helmintos. Las células Th17 son relevantes en la respuesta frente a bacterias extracelulares y hongos a través de la producción de IL-17a, IL-17f, e IL-22; las células Treg median la supresión de los diferentes mecanismos efectores propios de la inmunidad adaptativa y por ende, juegan un rol clave en la regulación de la homeostasis linfocitaria, su activación y función. Las células Thf por su parte, colaboran con los linfocitos B permitiéndoles su posterior diferenciación en plasmocitos productores de anticuerpos (Zhu & Paul 2010).

Las células dendríticas poseen una remarcada heterogeneidad relacionada a su origen, fenotipo, localización tisular, y función (Banchereau et al. 2000). Se encuentran presentes en los tejidos linfoides primarios (médula ósea y timo) y secundarios (ganglios linfáticos, bazo, tejido linfoide asociado a mucosas), en la sangre, la piel, las mucosas y en los diferentes órganos. Según su fenotipo y funcionalidad se pueden clasificar en células dendríticas convencionales o mieloides y células dendríticas plasmocitoides. La función central de las primeras es activar a los linfocitos T vírgenes, mientras que la de las plasmocitoides es producir Interferones de tipo I en la fase aguda de las infecciones virales (Steinman & Idoyaga 2010).

Además de existir poblaciones de CD convencionales derivadas de un precursor común, se ha descrito también, que durante procesos infecciosos, los monocitos pueden diferenciarse en el tejido a células dendríticas que luego migran a los ganglios linfáticos. Éstas se denominan células dendríticas derivadas de monocitos (moCDs) o células dendríticas inflamatorias (Segura & Amigorena 2013). En modelos murinos, se encontraron en los tejidos linfoides luego de condiciones específicas de estimulación como *Leishmania major*, *Listeria monocytogenes*, y virus de influenza (Steinman & Idoyaga 2010). El análisis de la diferenciación de monocitos durante la infección por *Leishmania major* reveló que los monocitos se reclutan a la dermis y a los ganglios linfáticos drenantes, diferenciándose a células dendríticas en ambos lugares. Las moDCs reclutadas a la dermis, que subsecuentemente pueden migrar a ganglios linfáticos drenantes, son responsables de la inducción de una respuesta protectora hacia el parásito, induciendo un perfil linfocitario de tipo Th1. En contraste las moDCs diferenciadas en ganglio, son inmaduras, y aparentemente no contribuyen significativamente a la inmunidad de las células T contra *Leishmania* (León & Ardavín 2008).

Estudios con monocitos aislados de sangre periférica humana demostraron que la diferenciación de monocitos a células dendríticas *in vitro*, está controlada por la citoquina denominada factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y por la interleuquina 4 (IL-4) (Sallusto & Lanzavecchia 1994). Estudios adicionales han identificado poblaciones de células dendríticas inflamatorias presentes en aislamientos de sitios inflamatorios como líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoidea o muestras de pacientes con cáncer de ovario o mama. Estas dendríticas mostraron un fenotipo único que carecía de los marcadores distintivos de las células dendríticas convencionales. El análisis del transcriptoma de estas células mostró un enriquecimiento en el perfil de expresión génica de células dendríticas derivadas de monocitos, con mayor similitud a los monocitos respecto a los precursores de dendríticas convencionales. Sobre la base de estos hallazgos se sugirió que las células dendríticas inflamatorias humanas, al igual que sus contrapartes murinas, derivan de monocitos (Segura & Amigorena 2013).

Macrófagos

Al igual que las células dendríticas, los macrófagos son células presentadoras de antígeno profesionales que presentan péptidos a los linfocitos T a través de moléculas del CMH de las clases I y II. Son células dotadas de una alta capacidad fagocítica y microbicida. Reconocen a los microorganismos y a sus productos a través de distintas familias de RRP y de los receptores de opsoninas (RFc y receptores para componentes del complemento). Por otra parte, los macrófagos expresan receptores para una gran variedad de citoquinas y quimiocinas. En los tejidos constituyen poblaciones estables y adquieren fenotipos especializados, según el microambiente circundante. Existen distintas poblaciones de macrófagos según su ubicación tisular, hay macrófagos alveolares en el pulmón, células de Kupffer en el hígado, macrófagos

esplénicos del bazo, osteoclastos en el hueso, células de la microglía en el sistema nervioso central, e histiocitos en el tejido conectivo. Son células de vida media larga, a las que tradicionalmente se las consideró como células diferenciadas a partir de los monocitos circulantes que se extravasaron en los diferentes tejidos. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que muchas poblaciones estables de macrófagos tisulares se desarrollan a partir de precursores eritromieloides derivados del saco vitelino, que pueblan los tejidos temprano durante la embriogénesis y se autorrenuevan durante la vida adulta merced a propiedades de “células madre” (Dey et al. 2014). Otros macrófagos derivan de precursores que migran desde el hígado fetal durante el desarrollo embrionario, mientras que otros derivan de monocitos. Por ejemplo, las células de Kupffer, la microglía, y los macrófagos cardíacos derivan principalmente del saco embrionario, mientras los macrófagos peritoneales y alveolares derivan del hígado fetal. Otros macrófagos residentes en tejidos, en cambio, derivan tanto de precursores con propiedades de células madre, como de precursores del saco vitelino (Hoeffel & Ginhoux 2015).

En todas las localizaciones, los macrófagos pueden ejercer un rol antiinfeccioso. Al activarse, los macrófagos pueden adquirir distintos perfiles funcionales, caracterizados por la capacidad de desempeñar funciones inflamatorias, representados por los llamados macrófagos M1, o antiinflamatorios, el prototipo de los cuales lo constituyen los denominados macrófagos M2. Entre ambos extremos de perfiles funcionales, otros perfiles han sido definidos sobre la base de su capacidad de ejecutar funciones mixtas entre ambos tipos. Los macrófagos no son células estáticas sino que pueden sufrir cambios funcionales y fenotípicos que les permiten realizar diversas funciones en respuesta a los cambios ambientales (Stout & Suttles 2004).

Los macrófagos M1 producen las citoquinas proinflamatorias IL-1, IL-6, TNF- α , IL-12, IL-8 e IL-23. Asimismo muestran una actividad fagocítica y microbicida incrementada. Los macrófagos M2 producen grandes concentraciones de las citoquinas interleuquina 10 (IL-10) y TGF- β . Los acontecimientos capaces de conducir a los macrófagos a diferenciarse en un perfil M1 o inflamatorio incluyen la activación inducida a través del TLR4, TLR9 y NLRs, así como la mediada por citoquinas y quimiocinas inflamatorias. La diferenciación hacia un perfil M2 es promovida, en cambio, por las citoquinas IL-4, IL-13 e IL-10, la ingestión de células apoptóticas y los glucocorticoides (Mills 2015).

Como ya se ha mencionado, las citoquinas IL-1, TNF- α e IL-6 median la inducción de una respuesta inflamatoria aguda, local y sistémica. Las acciones sistémicas mediadas por estas citoquinas conforman una respuesta conocida como respuesta de fase aguda, que involucra (a) la producción de proteínas de fase aguda que median potentes mecanismos antimicrobianos y protegen al hospedador de las posibles acciones perjudiciales asociadas a la respuesta inflamatoria; (b) el aumento de la temperatura corporal que ejerce un efecto microbiostático, disminuyendo la tasa de replicación bacteriana; y (c) un incremento en la disponibilidad de neutrófilos quienes acudirán a los focos de infección (Summers et al. 2010).

Neutrófilos

Ante la infección de un tejido o frente al daño tisular, los primeros leucocitos en ser reclutados desde la circulación sanguínea son los neutrófilos. Éstas son las células de la inmunidad innata que constituyen la primera línea de defensa del organismo. Se consideran potentes células inflamatorias. Una vez que acceden al sitio de infección ejecutan funciones para intentar contenerla y en lo posible, resolverla (Amulic et al. 2012). Para ello, los neutrófilos son capaces de activar dos tipos de mecanismos microbicidas: los mecanismos independientes del

oxígeno, que involucran a proteínas con acción antimicrobiana; y los mecanismos dependientes del oxígeno que requieren la activación de la enzima Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH) oxidasa y la consecuente producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO). Estos mecanismos integrarán los distintos procesos que ponen en marcha los neutrófilos para intentar eliminar a los microorganismos invasores.

Mecanismos microbicidas independientes del oxígeno

Los mecanismos microbicidas independientes del oxígeno abarcan a aquellos ejercidos por las proteínas presentes en sus gránulos, en los cuales reside parte de la actividad citotóxica ejercida por los neutrófilos. Estos contienen distintas proteínas y enzimas hidrolíticas, tales como péptidos catiónicos, proteasas, lactoferrina y mieloperoxidasa (MPO) para destruir a los microorganismos invasores. Según la presencia o ausencia de MPO, los gránulos pueden clasificarse como peroxidasa positivos (también denominados como gránulos primarios o azurófilos) o como peroxidasa negativos (que incluyen a los gránulos secundarios o específicos, los gránulos de gelatinasa y a las vesículas secretorias). Los gránulos peroxidasa negativos contienen en su mayoría diversas proteínas integrales de membrana, además de otras moléculas con funciones relevantes para su acción antimicrobiana y su acceso a los tejidos infectados. Los gránulos peroxidasa positivos albergan distintas serinproteasas tales como catepsina G, elastasa, y proteinasa 3. El contenido de estos gránulos puede también cumplir un rol en la patogénesis asociada a infecciones agudas e inflamación (Mayer-Scholl et al. 2004).

Mecanismos microbicidas dependientes del oxígeno

Los neutrófilos poseen un complejo enzimático denominado NADPH oxidasa que comprende componentes citosólicos, las proteínas p40^{phox}, p47^{phox} y p67^{phox}, y componentes asociados a

membrana, las moléculas p22^{phox} y gp91^{phox} que conforman un heterodímero conocido como citocromo b558. Este citocromo está localizado en la membrana de las vesículas secretorias y de los gránulos específicos del neutrófilo. La separación física de sus componentes garantiza la inactividad de la enzima en condiciones en las que el neutrófilo se encuentra en reposo. Cuando la célula es estimulada por agonistas proinflamatorios, los componentes citosólicos se translocan a la membrana plasmática y a la membrana del endosoma naciente (a las cuales han contribuido con sus membranas las vesículas secretorias y los gránulos específicos), y se asocian al citocromo b558 generando una oxidasa activa que media un proceso conocido como estallido respiratorio. Al activarse la NADPH oxidasa se generan grandes cantidades de intermediarios reactivos del oxígeno, entre ellos, anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales de hidroxilo (-OH) y ácido hipocloroso (OHCl). Este último se forma en presencia de cloro (Cl) en una reacción catalizada por la enzima mieloperoxidasa (Verhoef, 1993). Estas especies, altamente reactivas, son liberadas en los fagosomas, donde oxidan componentes críticos de lípidos y proteínas microbianas. Asimismo los IRO son liberados en el citosol donde alteran el estado de reducción de la célula y oxidan el contenido celular incluyendo proteínas y lípidos, modificando su función. En circunstancias patológicas los intermediarios reactivos de oxígeno pueden ser liberados hacia el medio extracelular, donde pueden resultar responsables del daño de los tejidos circundantes y de la exacerbación de la inflamación (Fialkow et al. 2007).

Procesos que median la eliminación de los agentes infectantes

Fagocitosis

Los neutrófilos junto con los macrófagos poseen la capacidad de capturar y degradar intracelularmente a los microorganismos, lo que los convierte en fagocitos profesionales. De

esta manera no sólo eliminan patógenos sino también restos celulares. Las células fagocíticas poseen receptores especializados para reconocer a sus blancos, y por medio de esta maquinaria median la internalización e inician los mecanismos degradativos, que culminarán en la muerte o eliminación de los microorganismos y partículas fagocitados (Lee et al. 2003).

Los neutrófilos son rápidos y potentes fagocitadores. Luego de la unión de microorganismos opsonizados con anticuerpos o componentes del complemento a sus receptores específicos, o del reconocimiento a través de receptores como lectina tipo C, la membrana del neutrófilo sufre una invaginación que permite conducir al microorganismo a un fagosoma. Este proceso es regulado por cascadas de señalización intracelular y rearrreglos del citoesqueleto. Subsecuentemente, los gránulos primarios y secundarios se fusionan al fagosoma, descargando su contenido con funciones antimicrobianas. Simultáneamente, la NADPH oxidasa se ensambla sobre la membrana del fagosoma naciente, generando anión superóxido, a partir del cual luego se generan los otros IRO. En conjunto con las enzimas aportadas por los gránulos, los intermediarios reactivos del oxígeno mediarán la muerte del microorganismo fagocitado (Kruger et al. 2015).

Netosis

Además de la fagocitosis, los neutrófilos pueden mediar la muerte extracelular de microorganismos a través de la liberación de trampas extracelulares conocidas como NETs (del acrónimo en inglés *Neutrophil Extracellular Traps*). Las NETs se forman como consecuencia de la liberación al medio extracelular de la cromatina descondensada (histonas y ADN) junto con ciertas proteínas nucleares, citoplasmáticas y granulares asociadas. Estas NETs son capaces de unir y mediar la muerte extracelular tanto de bacterias Gram positivas como negativas, y hongos evitando así su diseminación (Fuchs et al. 2007). Algunas de las

proteínas que se han visto asociadas a las NETs son: elastasa, mieloperoxidasa, catepsina G, lactoferrina, azurocidina, proteinasa 3, lisozima C, defensinas 1 y 3, histonas H2A, H2B, H3, H4, proteínas de unión a calcio A8, A9 y A12, actina α y β , miosina 9, plastina-2, citoqueratina-10, catalasa, α -enolasa, transquetolasa, pentraxina 3, calprotectina y HMGB1 (Urban et al. 2009, Jaillon et al. 2007, Mitroulis et al. 2011). Dentro de éstas, las histonas H2A, H2B, H3 y H4, son las proteínas más abundantes. La estequiometría de las histonas es diferente en las NETs respecto al núcleo intacto del neutrófilo, así como sus modificaciones postraduccionales. En particular, se ha observado que las histonas liberadas en las NETs se encuentran citrulinadas (Wang, et al. 2009).

La liberación de trampas extracelulares no está circunscripta únicamente a los neutrófilos. También se ha observado en otros tipos celulares como eosinófilos, basófilos, mastocitos, monocitos y macrófagos. Asimismo, no es exclusiva de seres humanos y ratones, sino que se ha descrito en caballos, peces, gatos, conejos y algunos invertebrados (Vorobjeva & Pinegin 2014).

Las NETs humanas presentan varias diferencias respecto a las de ratón. Las células murinas, al menos *in vitro*, liberan NETs con una cinética considerablemente más lenta y con menor eficiencia. Las NETs murinas, asimismo, tienen una apariencia más compacta respecto a las humanas. Por otra parte, la mayoría de los estudios en ratón emplean neutrófilos derivados de médula ósea, mientras que la fuente predominante de NETs en humanos es la derivada de neutrófilos de sangre periférica, lo que puede contribuir a las diferencias observadas entre ambas especies (Vorobjeva & Pinegin 2014).

La netosis puede desencadenarse frente a diversos estímulos, tanto de origen microbiano como estímulos químicos y estímulos inflamatorios estériles. Se ha descrito la inducción de

netosis por microorganismos como *Candida albicans*, *Aspergillus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus*, entre otros (Vorobjeva & Pinegin 2014). Asimismo las NETs pueden producirse en respuesta a estímulos químicos como el ácido forbol mirístico (PMA) o los ionóforos de calcio, y frente a estímulos inflamatorios estériles como los cristales de urato monosódico (MSU), así como también en respuesta a las citoquinas TNF- α e IL-8 (Kaplan & Radic 2012, Parker et al. 2012, Mitroulis et al. 2011).

La composición de las NETs podría variar según el estímulo que las induce. En particular, se ha descrito por ejemplo que las NETs liberadas en respuesta a *Candida albicans* contienen una proteína denominada calprotectina, que se encuentra ausente en las NETs liberadas en respuesta a PMA (Urban et al. 2009).

La netosis es un proceso de muerte celular como la necrosis o la apoptosis, sin embargo es muy diferente de estos últimos. En la apoptosis, los neutrófilos conservan la cromatina condensada y el núcleo se fragmenta, sin que se rompa la envoltura nuclear ni que haya vacuolización citoplasmática. Las organelas en el citoplasma se mantienen intactas. En la necrosis el núcleo pierde su estructura y los lóbulos se fusionan en una masa homogénea, sin división entre eu y heterocromatina. La membrana nuclear permanece intacta y el núcleo queda claramente separado del citoplasma. La estructura de las organelas tampoco se ve afectada. En la netosis, en cambio, la envoltura nuclear se desintegra, mezclándose el contenido nuclear con el citoplasmático, las membranas internas se pierden y las organelas citoplasmáticas desaparecen por completo. Además, la fragmentación del ADN no se observa en la netosis (Fuchs et al. 2007).

La cantidad de NETs liberadas podría ser variable de acuerdo al estímulo, así como la cinética del proceso. Por ejemplo en respuesta a *S. aureus* se liberan mayor cantidad de NETs y la cinética es más rápida respecto al PMA (Fuchs et al. 2007).

El mecanismo por el cual se induce la netosis parece depender del estímulo inductor. Se ha observado que con la mayoría de los estímulos se requiere de IRO para desencadenar el proceso de netosis. Tal es el caso de agonistas como con el PMA o los cristales de urato monosódico. Sin embargo, también han sido descritos otros estímulos en el que el proceso parece ser independiente de éstos, como con el ácido úrico, la ionomicina o algunas bacterias (Arai et al. 2014).

Mecanismos de la netosis

La generación de NETs requiere de la descondensación de la cromatina. En un estado de reposo, al igual que en todas las células eucarióticas, el ADN del neutrófilo se encuentra empaquetado alrededor de un núcleo conformado por un octámero de histonas (que incluye a las histonas H3, H2B, H2A y H4) formando nucleosomas. La formación de órdenes superiores de estructura de la cromatina esta mediada por el ADN espaciador e histonas de ligación (*linker*). La unión de histonas de ligación a los polinucleosomas permite que la cromatina esté aún más compactada formando una fibra de 30 nm. Ciertas modificaciones postraduccionales de las histonas tales como la acetilación, fosforilación y metilación, regulan varias de las funciones de la cromatina, desde la transcripción hasta la condensación o descondensación. En particular, durante la NETosis, las histonas sufren modificaciones que permiten la descondensación de la cromatina. Durante este proceso actuarán enzimas de la familia de las peptidil deaminasas (PADs), que se encargan de convertir por desaminación a la proteína

arginina (Arg) en citrulina (Cit), un aminoácido no convencional en proteínas. La enzima peptidil deaminasa de tipo IV (PAD4), es dependiente de calcio y tiene niveles altos de expresión en neutrófilos, localizándose principalmente en el núcleo. Esta enzima actúa sobre las histonas H3, H2A, y H4, produciendo su citrulinación. Esta modificación induce la descondensación de la cromatina (Wang et al. 2009). Esta descondensación permite que continúen actuando sobre la cromatina la elastasa y la mieloperoxidasa. En los neutrófilos en reposo la elastasa y la mieloperoxidasa se hallan en los gránulos azurófilos. Tras la activación celular por estímulos que inducen NETosis, la MPO y la elastasa se translocan al núcleo. Esto ocurre, en general, posteriormente a la activación de la NADPH oxidasa y a la consecuente producción de intermediarios reactivos del oxígeno. Frente a estímulos como el PMA, se ha demostrado que la activación de la NADPH oxidasa es indispensable para que se lleve a cabo la netosis. De hecho, individuos con deficiencias en esta enzima (pacientes que padecen enfermedad granulomatosa crónica, CGD) no son capaces de liberar NETs frente a estímulos como el PMA (Fuchs et al. 2007). Asimismo inhibidores farmacológicos de esta enzima como el DPI (difeniliodonio), inhiben la netosis en respuesta a PMA, bacterias, glucosa oxidasa o MSU (Fuchs et al., 2007, Schorn 2012). No se ha dilucidado completamente el mecanismo por el cual la elastasa y la mieloperoxidasa se translocan al núcleo, pero se postula que la producción de IRO podría promover su disociación de la matriz de proteoglicano permitiendo que escapen de los gránulos y se transloquen al núcleo. Una vez allí, la elastasa, degradará a las histonas H2B, H4 y la histona de ligación H1 promoviendo así la descondensación de la cromatina. La elastasa debe estar activa para llevar a cabo esta descondensación y este paso es fundamental para que se desencadene el proceso, y se ha comprobado que inhibidores de esta enzima bloquean por completo la netosis (Papayannopoulos et al. 2010). La mieloperoxidasa se une a la cromatina en etapas más tardías del proceso, colaborando

cooperativamente con la elastasa en la descondensación de la cromatina. Esta función no dependería de su actividad (Papayannopoulos et al. 2010). Luego de la descondensación y de la asociación de las proteínas específicas, tiene lugar la ruptura celular y la liberación de las NETs (Figura 1).

En el caso de estímulos que no requieren de los IRO, como la ionomicina, el mecanismo desencadenante de la netosis podría involucrar la movilización de calcio. De hecho, en respuesta a ionomicina se ha demostrado que los inhibidores de la NADPH oxidasa no inhiben la netosis, mientras ésta sí se ve afectada por el agregado de quelantes de calcio que impiden la activación de PAD4 (Parker et al. 2012).

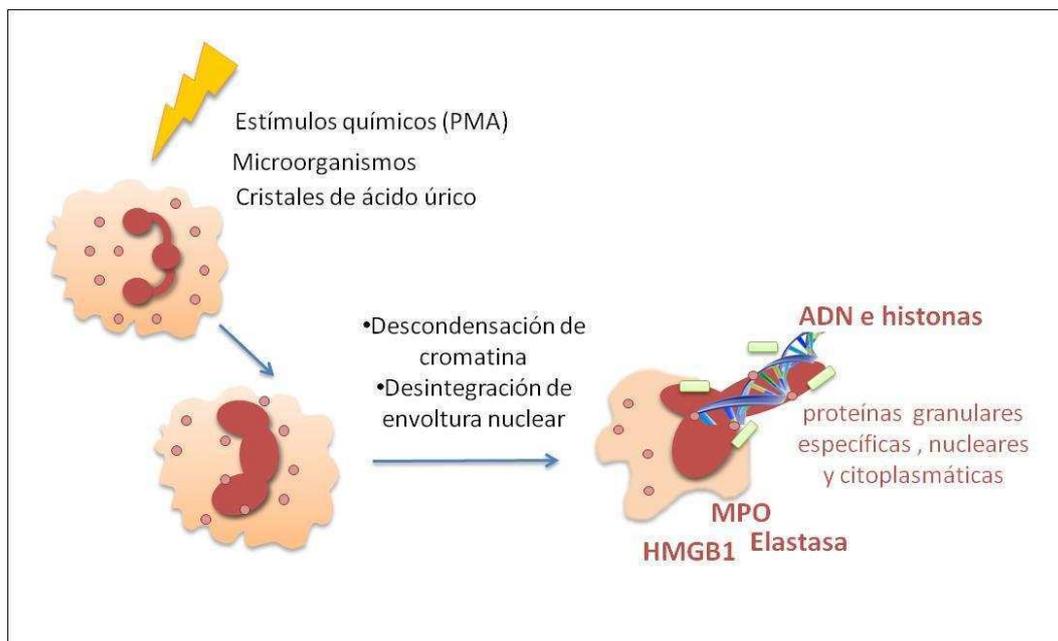


Figura 1. Esquema del proceso de netosis

Recientemente también se ha descrito una forma de netosis alternativa a la convencional, denominada netosis vital. En esta forma de netosis, el neutrófilo que liberó la NET conserva su membrana citoplasmática intacta, preservando, al menos por un determinado tiempo, su

viabilidad, pudiendo realizar funciones como quimiotaxis o fagocitosis (Yipp et al. 2012). Este modo alternativo de netosis se daría en respuesta al reconocimiento de ligandos de microbios por medio de los receptores del neutrófilo y con la colaboración de plaquetas *in vitro* (Clark, 2007). Se ha observado netosis vital, por ejemplo, en respuesta a *Staphylococcus aureus in vitro* (F. Pilszczek, 2010). El ADN se empaqueta en vesículas que pasan a través del citoplasma y luego se liberan al medio extracelular, donde liberan la cromatina (Figura 2). Este proceso no sería dependiente de los intermediarios reactivos del oxígeno. Estudios *in vivo* en un modelo murino de infección bacteriana demostraron por microscopía confocal intravital que la infección por estafilococos en la piel estimulan este tipo de netosis, activando receptores de PMAPs y al sistema complemento (B. Yipp, 2012). Numerosos neutrófilos vivos sin núcleo fueron observados en abscesos causados por bacterias gram positivas. En otros estudios, se observó que las plaquetas interactúan con las bacterias gram negativas o con LPS causando su activación y consecuente asociación con los neutrófilos. La unión de las plaquetas activadas induce la activación de los neutrófilos y la liberación de NETs por un mecanismo de NETosis vital (Yipp & Kubes 2013).

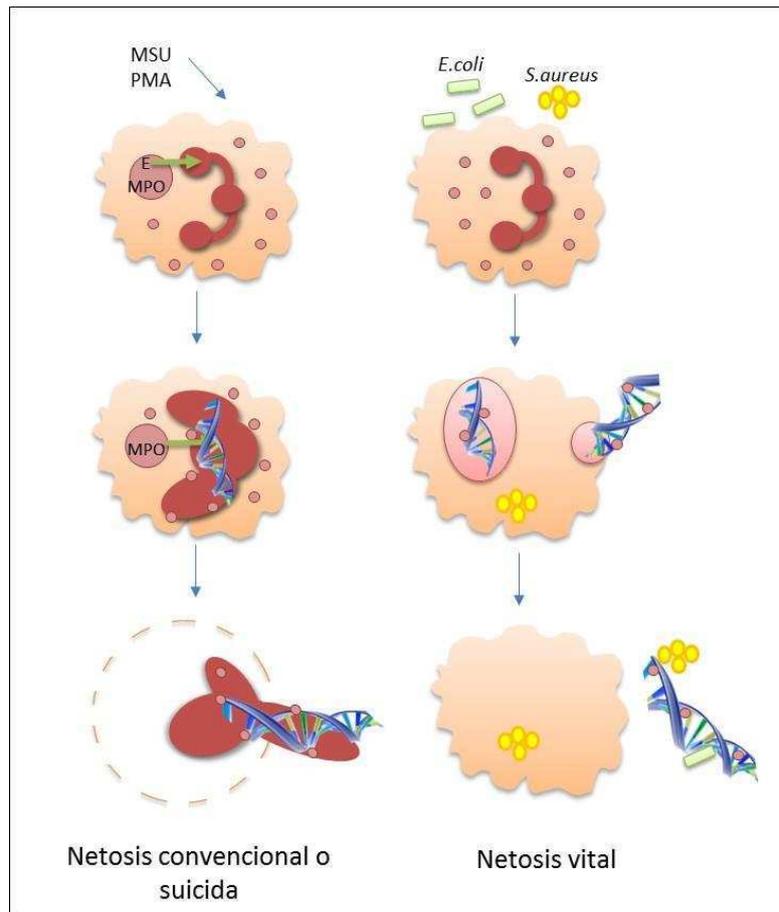


Figura 2: Netosis convencional o suicida y netosis vital

Resolución de la inflamación y remoción de NETs

Para evitar la progresión de un proceso inflamatorio agudo hacia uno crónico y persistente, la reacción inflamatoria inicial debe resolverse activamente. De esta manera, se evita el daño desmesurado de los tejidos. La resolución de este proceso se realiza de forma controlada en distintos pasos. Éstos incluyen el cese de la infiltración de neutrófilos hacia los tejidos, la regulación de citoquinas y quimiocinas, la inducción de la apoptosis en neutrófilos y su consecuente eliminación por macrófagos, la diferenciación de los macrófagos proinflamatorios en un perfil antiinflamatorio y por último la iniciación del proceso de

reparación de tejidos dañados. Todos estos eventos llevarán al retorno a la homeostasis de los tejidos (Amulic et al. 2012).

Durante los procesos inflamatorios, una vez que se extravasan a los tejidos, los neutrófilos reprograman su repertorio genético de manera de extender considerablemente su vida media. Esto es consecuencia de que reciben numerosas señales de sobrevida, tales como citoquinas, productos bacterianos, o bajas tensiones de oxígeno. Muchas citoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento como GM-CSF pueden extender la vida de un neutrófilo de unas horas a días. Por ello, la regulación precisa de la apoptosis de los neutrófilos es un paso esencial para resolver la inflamación. La apoptosis en el neutrófilo lleva a la exposición en la membrana de la fosfatidil serina, molécula que representa una señal de fagocitosis para el macrófago, junto con la liberación de lisofosfatidilcolina, la cual promueve la migración del macrófago hacia el foco inflamatorio (Lauber et al. 2003).

Una vez que el macrófago fagocita células apoptóticas, experimenta un cambio fenotípico hacia un perfil antiinflamatorio. Estos macrófagos sufrirán una modificación de su metabolismo lipídico que los conducirá a secretar productos que contribuyen a resolver la inflamación, tales como lipoxinas y resolvinas (Amulic et al. 2012) Estos mediadores suprimen la activación de neutrófilos y reclutan monocitos, los cuales contribuirán a la remoción de las células apoptóticas. Además estos macrófagos secretarán citoquinas antiinflamatorias como la IL-10, que inhibirán la producción de citoquinas proinflamatorias.

Otro acontecimiento fundamental para prevenir la perpetuación del proceso inflamatorio es la inhibición del infiltrado de neutrófilos, por ser éstas las células con mayor poder de inducción de daño tisular. Para que cese el reclutamiento de los mismos, se deben dismantelar los gradientes de citoquinas y quimiocinas creados para atraerlos al foco inflamatorio y los mediadores proinflamatorios deben ser reemplazados por mediadores

proresolutorios de la inflamación (Headland & Norling 2015). Los macrófagos también poseen un papel relevante en la resolución de la inflamación, así como en las etapas tempranas de la reparación de los tejidos. Son los encargados de eliminar las señales inflamatorias y de la remoción de citoquinas. Para esto, liberan proteasas en el sitio de inflamación, clivando quimiocinas e inactivándolas (Boe et al. 2015).

Estudios previos determinaron que los macrófagos también pueden contribuir a la eliminación de las NETs a través de un proceso de fagocitosis y degradación lisosomal. Se ha observado que la remoción de NETs es facilitada por proteínas como la Dnasa I que media su degradación. Sin embargo, las concentraciones fisiológicas de Dnasa I son insuficientes para degradar por completo las NETs, evidenciando que este mecanismo no es efectivo por sí solo. En este sentido, también se demostró que la proteína del complemento C1q, que media la opsonización de las NETs, favorece su captura por los macrófagos (Farrera 2013). Sin embargo, en contraste con estos hallazgos, otros estudios indicaron que C1q inhibe la degradación de NETs por la DNasa I (Leffler et al. 2012). No está claro aún cuáles son las consecuencias de la fagocitosis de las NETs por macrófagos, más allá de ser sujetas a degradación (Braian et al. 2013).

Potencial patogénico de las NETs

Las NETs contienen diversas proteínas que pueden comportarse como PMADs, ya que son alarminas o señales endógenas de daño, como HMGB1, el péptido LL-37 y las defensinas. En particular, HMGB1 es una proteína abundante y conservada, con importantes funciones biológicas tanto dentro como fuera de la célula. En el núcleo, HMGB1 interactúa con el ADN e histonas determinando la estructura de la cromatina y regulando el proceso de

transcripción. Cuando está fuera de la célula, adquiere una nueva identidad, sirviendo de alarmina o PMAD (Magna & Pisetsky 2014). HMGB1 es capaz de cumplir diversos roles como alarmina, tanto en la patogénesis de distintas enfermedades o bien mediando diversos procesos que van desde la inflamación hasta la reparación. Las acciones biológicas tan diversas de esta proteína son el reflejo de sus características bioquímicas y su propensión a sufrir modificaciones postraduccionales, las cuales a su vez determinan su interacción con PMAPs, citoquinas y quimiocinas. La actividad de HMGB1 depende del estado redox de tres residuos de cisteína en las posiciones 23, 45 y 106. Con un puente disulfuro en las posiciones 23 y 45 y un tiol libre en la posición 106, HMGB1 puede interactuar con TLR4 e inducir la producción de citoquinas. Por el contrario, cuando todos los sulfidrilos están en estado de tioles, no estimulan a TLR4 pero pueden unir a CXCL12 e inducir quimiotaxis a través de CXCR4. Si todos los grupos sulfidrilos están oxidados a sulfonatos, HMGB1 carece de esta propiedad. Las diferentes formas de muerte celular (necrosis, apoptosis, piroptosis y netosis) pueden conducir a la liberación de isoformas de HMGB1 con distintos estados de oxidación, hecho que tendrá consecuencias funcionales diversas (Magna & Pisetsky 2014).

Algunos componentes de las NETs, como el ADN y LL-37, constituyen el blanco de los anticuerpos producidos por pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico, siendo las NETs una fuente de autoantígenos. En estos pacientes se demostró que aquellos que presentaban una baja capacidad de degradar a las NETs exhibían mayor severidad de la enfermedad (Pinegin et al. 2015). Además de su rol en enfermedades autoinmunes como fuente de autoantígenos, las NETs han sido asociadas a la prolongación de inflamación en diversas patologías, promoviendo el daño de diversos tejidos. Por ello se ha postulado que la remoción ineficiente de NETs podría conducir a generar daño tisular (Figura 3) (Boe et al. 2015).

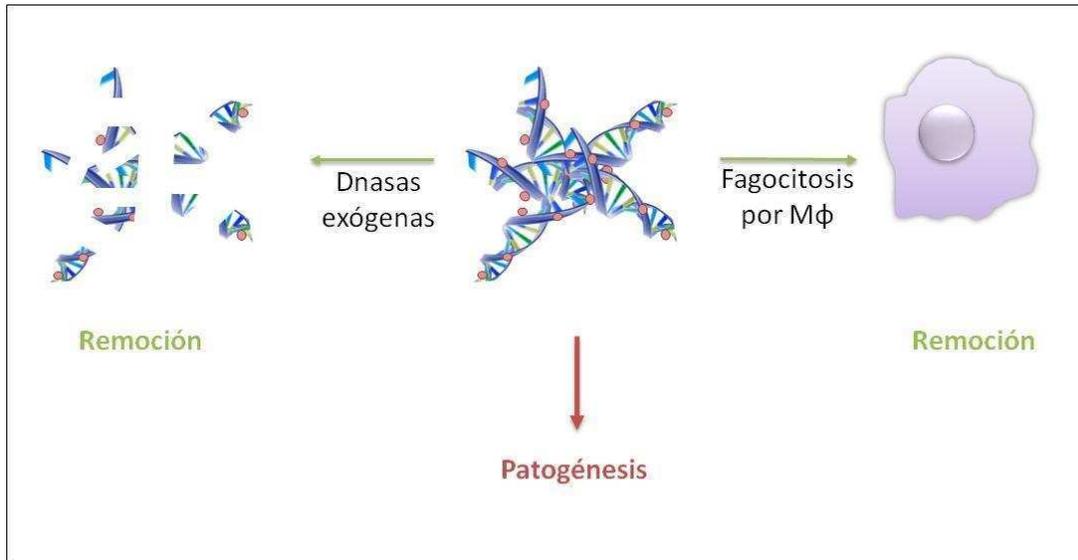


Figura 3. Mecanismos de remoción de NETs

Se ha observado que las NETs promueven la aterosclerosis, la trombosis y otras complicaciones vasculares (Pinegin et al. 2015, Brill et al. 2012). Las NETs pueden proveer un andamiaje para la formación de trombos, promoviendo la adhesión de plaquetas y glóbulos rojos y concentrando proteínas efectoras y factores de coagulación. El anticoagulante heparina es capaz de remover las histonas de las fibras de cromatina de las NETs, induciendo su desestabilización, sugiriendo una nueva explicación de su efecto antitrombótico (Kaplan & Radic 2012). Asimismo la interacción entre plaquetas y neutrófilos puede inducir la netosis, causando daño tisular en sepsis (Clark et al. 2007).

NETs en patologías respiratorias

La mucosa respiratoria se encuentra continuamente expuesta a potenciales patógenos. Por este motivo, la integridad del epitelio respiratorio depende de un sistema de defensa finamente regulado. El sistema inmune innato provee la protección inicial ante los

microorganismos y promueve el desarrollo de la respuesta adaptativa. El epitelio respiratorio no sólo provee una barrera mecánica con una función pasiva, sino que contribuye activamente a la respuesta innata (Parker & Prince 2011). El epitelio es capaz de detectar la presencia de microorganismos y de promover acciones que contribuyan a su eliminación. Se ha descrito que las células del epitelio respiratorio expresan diversos receptores de reconocimiento de patrones de la familia Toll y de la familia NLRs mediante los cuales pueden responder al desafío microbiano (Parker & Prince 2011, Muir et al. 2004). A su vez, también son capaces de expresar otros tipos de receptores tales como el receptor para compuestos de glicosilación avanzada, (RAGE del acrónimo en inglés *receptor for advanced glycation endproducts*). Estos compuestos son el resultado de la glicosilación y oxidación irreversible de proteínas, las cuales se asocian al envejecimiento tisular (Fehrenbach et al. 1998, Katsuoka et al. 1997).

La estimulación de los RRP epiteliales incrementa la secreción de péptidos antimicrobianos así como mucinas hacia el lumen de las vías respiratorias. Las mucinas son las glicoproteínas componentes del moco que atrapan microorganismos. El moco constituye una barrera importante del sistema respiratorio, manteniendo limpio y húmedo el tracto respiratorio, permitiendo el intercambio gaseoso y atrapando potenciales patógenos. Junto con estas proteínas, la estimulación de RRP epiteliales conduce a la liberación de citoquinas y quimiocinas, como IL-6, CXCL8, IL-1 β , GM-CSF, y G-CSF que inician una reacción inflamatoria. Esta respuesta implica el reclutamiento de fagocitos, como neutrófilos y macrófagos, que van a encargarse de remover a los microorganismos que no fueron eliminados por la primera línea de defensa; así como de células dendríticas que van a contribuir a establecer una respuesta inmune adaptativa con la consecuente activación de linfocitos, en caso de que la infección así lo amerite (Parker & Prince 2011).

Los neutrófilos son las primeras células del sistema inmune en arribar al sitio de injuria. Como consecuencia de las citoquinas y quimiocinas producidas tras el reconocimiento de microorganismos a través RRP en la mucosa aérea, los neutrófilos se adhieren al endotelio, y egresan a través de vasos pequeños hacia el espacio intersticial. Posteriormente ocurre una migración transepitelial desde el intersticio hacia el espacio alveolar. Los neutrófilos deben modificar su forma para atravesar el pequeño diámetro de los capilares pulmonares. Para esto, deben inducirse cambios en el citoesqueleto que ocurren luego de su interacción con el endotelio (Figura 4) (Grommes & Soehnlein 2011).

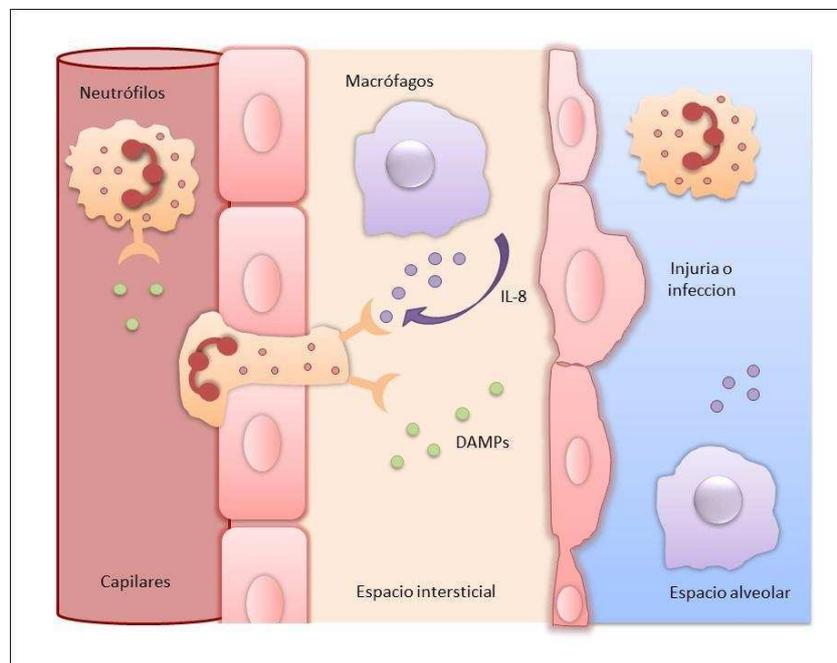


Figura 4. Migración de los neutrófilos hasta el espacio alveolar

Dada la capacidad de la respuesta inflamatoria de producir daño tisular, resulta crítico regular su intensidad y duración ya que una respuesta inflamatoria excesiva podría comprometer la función respiratoria. De hecho, muchas patologías pulmonares son consecuencia de la activación de mecanismos inmunes innatos o adaptativos. Un ejemplo de ello lo constituye la

injuria pulmonar aguda (del acrónimo en inglés *acute lung injury* ALI), un desorden clínico severo que puede ser causado por factores directos como una neumonía o por la aspiración del contenido gástrico, o por factores indirectos, como la sepsis o las transfusiones. La inflamación que acompaña al desarrollo de esta enfermedad involucra el reclutamiento masivo de neutrófilos a los tejidos injuriados, la producción de edema alveolar y un compromiso del intercambio adecuado de gases. La injuria de las células epiteliales alveolares incrementa la permeabilidad entre el espacio alveolar y los vasos sanguíneos. El infiltrado de neutrófilos que ocurre en respuesta a quimiocinas producidas por las células epiteliales y macrófagos, es considerado un elemento central en la patogénesis de la enfermedad (Grommes & Soehnlein 2011). En pacientes con ALI, además se hallaron niveles incrementados de señales de daño, tales como elevados niveles de ácido úrico (Kuipers et al. 2012), los cuales pueden causar inflamación y fibrosis (Gasse et al. 2009). El ácido úrico es el producto final del catabolismo de purinas. La mayor parte del ácido úrico producido se disuelve en la sangre y es excretado en la orina por medio de los riñones. Tanto cuando se reduce la remoción de ácido úrico; cuando el catabolismo de las purinas se encuentra incrementado; como cuando se produce daño celular, se acumulan elevados niveles de ácido úrico en circulación. Cuando estos límites exceden los de la solubilidad máxima, éste comienza a precipitar como cristales de urato monosódico (MSU) en el medio extracelular. Una vez formados, los cristales actúan como una señal endógena de daño estimulando el desencadenamiento de una respuesta inflamatoria. La acumulación de estos cristales en los tejidos es perjudicial (Shi et al. 2010). Los cristales son capaces de activar el inflamasoma e inducir la producción de IL-1 β y el reclutamiento de neutrófilos (Gasse et al. 2009). De esta manera, las deposiciones de MSU suelen estar acompañadas de un masivo infiltrado leucocitario. Se ha demostrado también

que los neutrófilos son capaces de liberar trampas extracelulares en respuesta a los cristales de ácido úrico (Schorn et al. 2012).

Sobre la base de los antecedentes descritos, en este trabajo de tesis se evaluó el impacto de las NETs inducidas por MSU sobre la capacidad proinflamatoria de células epiteliales respiratorias, macrófagos y células dendríticas.

Objetivos

1. Determinar si las NETs inducidas por señales de daño como el MSU ejercen efectos inmunomodulatorios en células epiteliales pulmonares y bronquiales.
2. Determinar si estas NETs poseen propiedades inmunomodulatorias sobre otras células del sistema inmune innato que pudiesen resultar relevantes para el desarrollo de procesos inflamatorios en las vías aéreas, como células dendríticas y macrófagos.

Materiales y Métodos

Reactivos utilizados

Los medios de cultivo RPMI 1640 y DMEM fueron obtenidos de HyClone Laboratories (Logan, UT). El suero fetal bovino se obtuvo de Internegocios (Buenos Aires, Argentina). El Ficoll y el dextrán 500 utilizados fueron obtenidos de GE Healthcare (Munich, Alemania) y el Triyosom fue adquirido de Justesa Imágenes (Argentina). El kit de aislamiento de monocitos y la IL-4 recombinante fueron adquiridos de Miltenyi Biotec (Alemania). La nucleasa micrococcal (MNasa) se adquirió de Worthington. El sustrato TMB se obtuvo de Thermo Fisher Scientific Life Technologies (Massachusetts, MA). El anticuerpo anti-elastasa humana se adquirió de Calbiochem (Massachusetts, MA), los anticuerpos anti-IgG total de conejo y de ratón junto con todos los anticuerpos secundarios fueron adquiridos en Jackson Immunoresearch Laboratories (West Grove, PA). Los colorantes TO-PRO-3 y SybrGold se adquirieron de Life Technologies (Carlsbad, CA). El anticuerpo anti-CD14 conjugado a ficoeritrina, el anticuerpo anti-nucleosoma humano, junto con el kit de ELISA para la detección de IL-8, e IL-6 se adquirieron en BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ). El kit de ELISA para la detección de CCL2 (MCP-1) humana fue obtenido de eBioscience (San Diego, CA). El colágeno y la fibronectina humanas se adquirieron de Advanced Biomatrix (Carlsbad, CA). La heparina utilizada fue de la marca Fondaparinux. El líquido de montaje empleado (Aqua-Poly/Mount Coverslipping Medium) fue adquirido de Polysciences (Warrington, PA). Las cámaras de cultivo para los ensayos de microscopía confocal (Lab-Tek chambers) se obtuvieron de Nalge Nunc International, New York, NY. El ensayo de toxicidad por LDH (CytoTox96® Non Radiactive Cytotoxicity assay) fue adquirido de Promega. Todo el resto de los reactivos utilizados fueron obtenidos en Sigma Aldrich (St. Louis, MO). El anticuerpo anti-HMGB1 (clon 2G7) fue provisto gentilmente por el Dr. Kevin Tracey (The Feinstein Institute for Medical Research, USA).

Obtención de neutrófilos

Los neutrófilos fueron obtenidos de muestras de sangre periférica de dadores sanos bajo consentimiento informado, por punción de la vena del antebrazo. Los neutrófilos fueron aislados a partir de sangre heparinizada mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Triyosom de 1,077 g/ml de densidad y sedimentación con Dextrán 6%, de acuerdo a lo previamente descrito (Gabelloni et al. 2013). Los eritrocitos contaminantes fueron removidos por lisis hipotónica con agua. Luego de un lavado con solución fisiológica, las células (>97% de granulocitos neutrófilos determinado por citometría de flujo) fueron resuspendidas en medio completo: RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina 100 unidades/ml y estreptomicina 100 µg/ml.

Previo a su utilización, todas las preparaciones de neutrófilos fueron inmunomarcadas con un anticuerpo anti-CD14 conjugado a ficoeritrina (PE) y analizadas mediante citometría de flujo para garantizar que la contaminación con monocitos fuera menor al 0,5% y que los parámetros dispersión *forward* y *side* (FSC y SSC respectivamente) fueran compatibles con los de células no activadas (Figura 5).

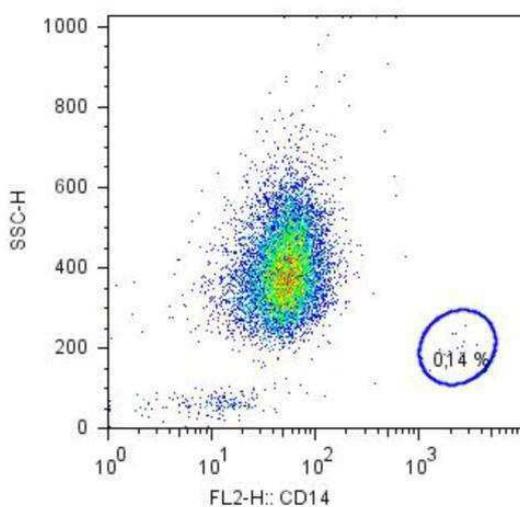


Figura 5. Pureza de las preparaciones de neutrófilos empleadas. La figura muestra un gráfico de puntos (dot plot) representativo de granularidad en función de la expresión de CD14 obtenido por citometría de flujo. Dado que la expresión de CD14 en monocitos supera en más de un orden de magnitud a la que exhiben los neutrófilos, este tipo de análisis permite determinar el grado de contaminación con monocitos que presenta la muestra (0,14% en este ejemplo).

Líneas celulares

Se emplearon tres líneas celulares de mucosa respiratoria humana: A549, BEAS-2B y 16HBE14o⁻. La línea A549 es una línea epitelial alveolar obtenida a partir un carcinoma de pulmón humano (Giard et al. 1973). La línea BEAS-2B es una línea celular aislada a partir de epitelio humano bronquial normal obtenido por autopsia de un individuo sin cáncer por transfección con adenovirus (Ad12SV40) (Ke et al. 1988). La línea 16HBE14o⁻ es una línea epitelial obtenida a partir de una muestra de epitelio pulmonar humano por transfección con el plásmido pSVori (A. Cozens, 1994).

Las líneas A549 (cedida por el Dr. Pablo Baldi, IDEHU-UBA) y BEAS-2B (cedida por el Dr. Martín Rumbo, IIFP-UNLP) fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina (100 U/ml), estreptomina (100 µg/ml) y glutamina (2 mM). Las células BEAS-2B fueron sembradas sobre una matriz de colágeno (30 µg/ml), fibronectina (10 µg/ml) y seroalbúmina bovina (0.01%). Las células fueron crecidas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

Las células 16HBE14o⁻ fueron crecidas sobre filtros Transwells® durante 14 días para alcanzar su polarización. La misma fue corroborada mediante evaluación de la resistencia eléctrica transmembrana mediante un voltohmetro para células epiteliales. Las células 16HBE14o⁻ fueron provistas por el Dr. Dieter Gruenert (UCSF, USA).

Diferenciación de células dendríticas humanas derivadas de monocitos (CD).

Las células mononucleares fueron aisladas de sangre periférica por centrifugación y gradiente de densidad en Ficoll-Triyosom. Luego los monocitos fueron purificados mediante un kit anti-CD14-MicroBead (Miltenyi) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente los monocitos fueron cultivados a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ durante 5 días en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, penicilina (100 U/mL), estreptomina (100 µg/mL), 10 ng/ml de IL-4 y 30 µg/ml GM-CSF. La diferenciación y activación de las células dendríticas obtenidas fue controlada mediante el monitoreo de la expresión de CD1a y de CD86 el día 5 de cultivo por citometría de flujo. Las preparaciones empleadas fueron aquellas en las que más del 70% de la población exhibiese una alta expresión del marcador de células dendríticas CD1a y una baja expresión del marcador de activación CD86 (Figura 6).

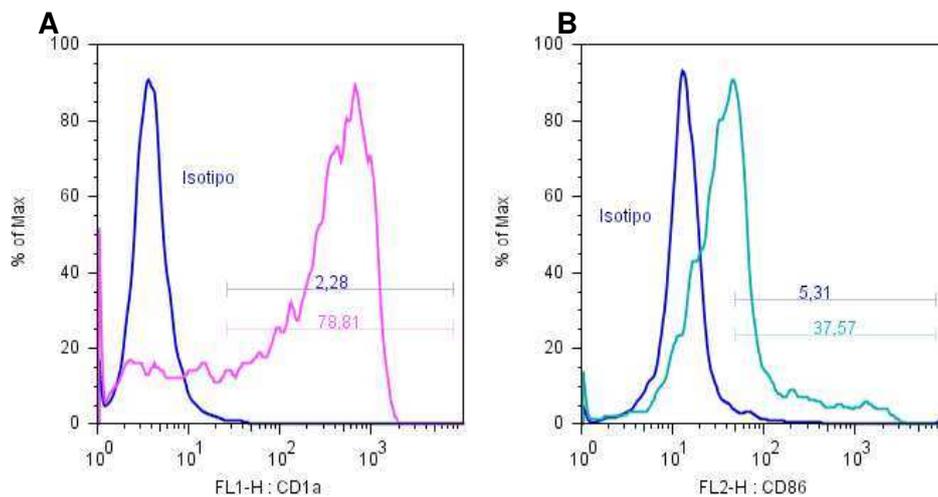


Figura 6. Perfil de las células dendríticas humanas diferenciadas a partir de monocitos de sangre periférica. Las células diferenciadas con GM-CSF e IL-4 durante 5 días fueron marcadas con un anticuerpo anti CD1a conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) y con un anticuerpo anti CD86 conjugado a PE. La figura muestra histogramas representativos de la expresión de CD1a (A) y de CD86 (B).

Diferenciación de macrófagos humanos (MØ)

Las células mononucleares fueron aisladas de sangre periférica por centrifugación y gradiente de densidad en Ficoll-Triyosom. Luego fueron incubadas en placas de cultivo durante una hora a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ en medio sin suero para permitir la adhesión de los monocitos. Posteriormente se removió el medio de cultivo para eliminar a las células no adheridas y a las células adheridas se las resuspendió en medio RPMI 1640 suplementado con 10% SFB, penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL) y 50 ng/ml de M-CSF. Las mismas fueron cultivadas durante 5 días a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

Preparación de cristales de urato monosódico (MSU)

Los cristales de urato monosódico fueron preparados a partir de ácido úrico como fue descrito previamente (Martinon et al. 2006). Brevemente, se disolvieron 1,68 g de ácido úrico en 100 ml de NaOH 0,01M calentado a 70°C. Se mantuvo el pH entre 7,1 y 7,2. Luego, se dejó decantar la solución a temperatura ambiente en agitación durante 24 horas. Los cristales precipitados fueron aislados, lavados con etanol y secados por evaporación. Posteriormente fueron resuspendidos en *buffer* fosfato (PBS) por sonicación a una concentración de 50 mg/ml, autoclavados y fraccionados en alícuotas. Su tamaño y forma fue verificado mediante microscopía. Las alícuotas fueron conservadas a -20°C hasta su utilización.

Obtención de trampas extracelulares de neutrófilos

Los neutrófilos aislados como se indicó previamente (2×10^6 /ml) fueron estimulados con MSU (300 μ g/ml) por 1 hora a 37°C en medio RPMI con 10% de SFB previamente calentado a 65°C a fin de inactivar las Dnasa endógenas. Luego los neutrófilos fueron suavemente agitados, centrifugados, el medio fue remplazado por uno fresco y se prosiguió con el cultivo por 3 horas adicionales a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Luego las NETs fueron separadas de los restos celulares mediante un sonificado suave de 60 segundos (40 Hz; baño ultrasónico W200) y posterior centrifugación. Los sobrenadantes conteniendo las NETs fueron recolectados. Se verificó que el pulso ultrasónico no afectase la viabilidad de los neutrófilos, mediante incorporación del colorante 7-Aminoactinomicina D (7AAD) y análisis por citometría de flujo. Alícuotas de estos sobrenadantes fueron empleadas para cuantificar su contenido de ADN mediante el agente intercalante *Sybr Gold* y la determinación de la absorbancia por fluorimetría utilizando un fluorómetro. La concentración de ADN fue determinada mediante interpolación en una curva estándar realizada con concentraciones conocidas de ADN de timo bovino. Asimismo se corroboró por microscopía confocal que los neutrófilos que habían sido tratados con MSU durante 1 hora y luego lavados, no contuvieran cristales extracelulares. Los cristales fueron revelados por reflexión y el ADN se visualizó por tinción con el colorante Sytox Green (Figura 7).

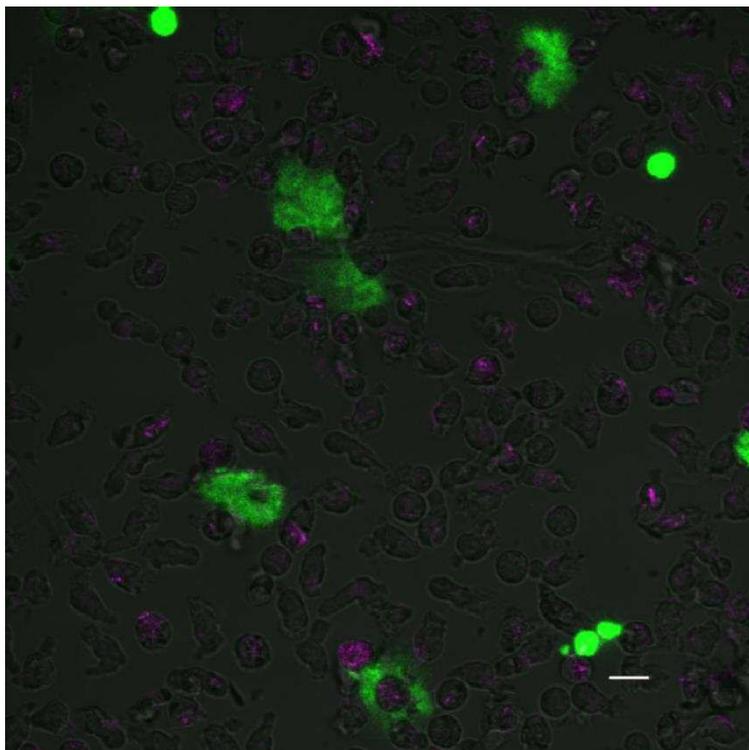


Figura 7: Los cristales de MSU presentes en el medio extracelular luego de una hora de cultivo con los neutrófilos pudieron ser removidos con el paso de lavado. Los neutrófilos (5×10^6 PMN/ml) fueron estimulados MSU por 1 hora a 37°C . Luego fueron centrifugados y el pellet fue resuspendido en medio fresco. Las células fueron sembradas en cámaras de cultivo (*Cellview glass bottom dishes*) tratadas previamente con poli-L-lisina, y luego fueron observadas por microscopía confocal. Los cristales de MSU fueron revelados por reflexión (magenta), identificándose, en su mayoría, dentro de los neutrófilos. Las NETs fueron reveladas por el colorante de ADN Sytox Green (verde). Barra: $10 \mu\text{m}$.

Paralelamente, para la condición basal se cultivó la misma cantidad de neutrófilos con el vehículo del MSU siguiendo el mismo protocolo detallado anteriormente. Alternativamente, a fin de inducir necrosis, se calentó a los neutrófilos a 45°C durante 10 minutos y posteriormente se los incubó durante 4 horas a 37°C (Kono et al. 2012). Al cabo de este tiempo las muestras fueron centrifugadas y los sobrenadantes fueron recolectados. Asimismo, en algunos casos, para corroborar la ausencia de efectos mediados por MSU residual que pudiese permanecer en las preparaciones luego del paso de remoción, se utilizaron neutrófilos fijados con paraformaldehído 4% durante 30

minutos, que luego de ser lavados exhaustivamente fueron incubados con MSU siguiendo el procedimiento anterior.

Para los experimentos de inhibición de la NETosis, los neutrófilos fueron preincubados con DPI (10 μ M) o con el inhibidor de elastasa a 10 μ M (MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val chloromethyl ketone (MeOSu-AAPV-CMK, Sigma-Aldrich) durante 30 minutos, luego fueron estimulados con MSU según el mismo procedimiento detallado previamente.

Asimismo para los experimentos conducidos para determinar el rol proinflamatorio del ADN de las NETs, los neutrófilos fueron cultivados con MSU, en presencia o ausencia de Nucleasa micrococcal (Mnasa, 10 U/ml), y sometidos al mismo proceso de obtención de NETs descrito previamente.

En algunas experimentos, luego de su aislamiento, las NETs fueron incubadas durante 20 minutos con el anticuerpo anti HMGB1 (20 μ g/ml) con agitación suave, o incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de elastasa. En otros experimentos, luego de su aislamiento, las NETs fueron calentadas durante 10 minutos a 70°C para inactivar los componentes proteicos.

Cuantificación de NETs

Las NETs fueron cuantificadas determinando las concentraciones de ADN y de mieloperoxidasa (MPO), y la actividad de elastasa. El ADN fue cuantificado como se describió previamente. La concentración de MPO en las NETs fue determinada mediante la reacción con el sustrato TMB por 10 minutos y posterior detección de la absorbancia a 450 nm e interpolación con una curva estándar. La actividad de elastasa fue determinada usando el sustrato específico N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val.

Brevemente, las NETs fueron incubadas con el sustrato (1 nM) durante 18 horas y luego se determinó la absorbancia a 405 nm. Como control positivo de la reacción se utilizaron neutrófilos lisados con tritón X-100 0,5%, como parámetro de actividad de elastasa total.

Identificación de NETs por microscopía confocal

Para confirmar la capacidad del MSU de inducir la formación de NETs, 1×10^6 neutrófilos fueron sembrados sobre cubreobjetos para microscopía esterilizados previamente con alcohol y pretratados por 3 horas con poli-L-lisina. Luego los neutrófilos fueron estimulados con MSU (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 4 horas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO_2 . Durante la última hora de cultivo se adicionó MNasa (10 U/ml) o vehículo. Al cabo de este tiempo las muestras fueron fijadas con PFA 4% y permeabilizadas con Tritón X-100 0,5% en PBS. Posteriormente fueron bloqueadas con suero de cabra 5% en PBS durante 1 hora a 37°C . Luego fueron incubadas con un anticuerpo anti-elastasa humana hecho en conejo (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y con un anticuerpo antinucleosoma humano hecho en ratón (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o con los controles correspondientes de isotipo a la misma concentración durante 1 hora. A continuación, luego de un lavado, las muestras fueron incubadas con los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo conjugado a DyLight488 (1:200) y anti-IgG de ratón conjugado a DyLight549 (1:200) durante 30 minutos. Para la tinción del ADN las muestras fueron incubadas con TO-PRO-3 (1:1000) por 10 minutos. Los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos utilizando Aqua-Poly/Mount. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Olympus FluoView 1000 (Tokyo, Japón) equipado con un objetivo Plapon 60X/NA1.42 y fueron analizadas con el software Olympus FV10-ASW.

En algunos casos, el ADN fue coloreado con yoduro de propidio. Alternativamente también se utilizó un anticuerpo primario anti-HMGB1 hecho en ratón (1 µg/ml) o su control de isotipo correspondiente, y luego un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a DyLight549 (1:200) y el ADN de estas muestras fue teñido con TO-PRO-3.

Para confirmar que el ADN cuantificado por fluorimetría correspondiese a NETs, los sobrenadantes de los neutrófilos estimulados con MSU fueron sembrados sobre una cámara Lab-Tek tratada previamente con poli-L-lisina y exhaustivamente lavada, e incubados durante 1 hora. Luego las muestras fueron fijadas con PFA 4% durante 30 minutos. Posteriormente se bloquearon con 5% de suero de cabra en PBS y se tiñeron para la visualización de elastasa, nucleosoma y ADN, como se describió previamente.

Estimulación de células epiteliales.

Las células epiteliales A549 y BEAS-2B fueron cultivadas hasta el 80% de confluencia. Luego fueron cultivadas por 18 horas adicionales a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ en presencia o ausencia de 200 µl de NETs inducidas por MSU aisladas a partir de 1x10⁶ neutrófilos siguiendo el protocolo arriba descrito. Alternativamente las células epiteliales fueron cultivadas con sobrenadantes de PMNs no estimulados o con sobrenadantes de PMNs necróticos, o de PMNs previamente fijados y luego estimulados con MSU. En otros experimentos las células epiteliales fueron tratadas con sobrenadantes de PMNs estimulados con MSU en presencia de inhibidores de la NETosis (DPI o IE), o alternativamente con NETs tratadas con Mnasa, con Inhibidor de elastasa o con un anticuerpo bloqueante antiHMGB1. En todos los casos las preparaciones de NETs fueron utilizadas inmediatamente luego de su obtención. Luego del período de cultivo

de 18 horas se recolectaron los sobrenadantes y se determinaron las concentraciones de IL-8, IL-6 y CCL-2 por ELISA siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Estimulación de células dendríticas

Las células dendríticas (2×10^5), obtenidas según lo descrito previamente, fueron incubadas en presencia o ausencia de 200 μ l de NETs aisladas a partir de 1×10^6 neutrófilos, durante 18 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Luego los sobrenadantes fueron recolectados y las concentraciones de IL-8, IL-6, TNF- α e IL-1 β fueron determinadas por ELISA. Las células fueron inmunomarcadas con anticuerpos específicos contra distintos marcadores de activación (CD86, HLA-DR, CD40) y fueron analizadas por citometría de flujo.

Estimulación de macrófagos

Los macrófagos fueron cultivados en presencia o ausencia de 200 μ l de NETs aisladas a partir de 1×10^6 neutrófilos, o de sobrenadantes provenientes de neutrófilos no estimulados, durante 18 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Luego los sobrenadantes fueron recolectados y la concentración de las citoquinas IL-6 e IL-8 fue determinada por ELISA.

Evaluación de la viabilidad celular de los neutrófilos y células dendríticas

Para determinar la viabilidad de los neutrófilos sometidos al tratamiento de sonicación de 60 segundos para provocar la separación de las NETs que podrían haber quedado

unidas a restos celulares, las células fueron incubadas con el colorante 7-aminoactinomicina D (7-AAD, 10 µg/ml). A la concentración empleada, este colorante es permeable a través de las membranas de las células no viables, es decir, aquéllas que sufrieron apoptosis o necrosis. La incorporación de 7-AAD fue monitoreada a través de la detección de la emisión de fluorescencia en el canal FL-3 por citometría de flujo. Se observaron histogramas de 2 picos, uno de baja intensidad de fluorescencia, correspondiente a las células que no incorporaron 7-AAD y otro de alta intensidad, correspondiente a células no viables que sí lo hicieron. Sobre esta segunda población se determinó el porcentaje de células correspondiente. El mismo procedimiento se utilizó para evaluar la viabilidad de las células dendríticas luego de 18 horas de incubación.

Evaluación de la viabilidad de células epiteliales post estimulación

Luego de la incubación de 18 horas con las NETs o los respectivos controles, las células epiteliales A549 y BEAS-2B fueron levantadas con tripsina. Posteriormente fueron lavadas con PBS y resuspendidas en el buffer de marcación (buffer HEPES). A continuación las células fueron marcadas con anexina V-FITC (1:20) durante 15 minutos y posterior tinción con ioduro de propidio (1 µg/ml) y analizadas por citometría de flujo. Para las células epiteliales 16HBE14o⁻ polarizadas, al cabo de las 18 horas de cultivo con los respectivos estímulos (vehículo, NETs o sobrenadante de neutrófilos estimulados con MSU en presencia de inhibidor de elastasa), se recolectaron los sobrenadantes y se determinó la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) como medida de

viabilidad celular. Como control positivo de este ensayo se utilizó el sobrenadante de células lisadas con Tritón X-100 0,5%. Asimismo se determinó la resistencia eléctrica de la monocapa celular en el transwell luego de las 18 horas de cultivo. Se analizó también la permeabilidad al dextrán conjugado a FITC (dextrán-FITC) como medida de la integridad de la monocapa. Para ello se incubaron a las células con dextrán-FITC durante 3 horas, al cabo de las cuales, se recolectó el contenido del pocillo inferior y se cuantificó la fluorescencia utilizando un lector de microplacas Victor 3 con excitación a 492 nm y detección de la emisión a 520 nm. Como control positivo se evaluó el pasaje del dextrán-FITC a través de la membrana del transwell en ausencia de células.

Evaluación de la morfología de células epiteliales

Al cabo de las 18 horas de incubación con los respectivos agonistas, las células epiteliales A549 y BEAS-2B fueron lavadas dos veces con PBS y fijadas con metanol frío 100% durante 10 minutos. Luego fueron teñidas con una solución de Cristal violeta 0,5% en metanol 25% por 10 minutos, y fueron lavadas exhaustivamente con agua. Luego fueron observadas en un microscopio óptico invertido (Nikon Eclipse TE2000-S).

Citometría de flujo

Los estudios que involucraron citometría de flujo fueron realizados empleando un citómetro de flujo FACScalibur, Becton Dickinson. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software FlowJo, Tree Star Inc.

Análisis estadístico

Los datos fueron presentados como la media \pm error standard de n experimentos realizados por triplicado. Luego de verificarse que los datos pasaran el test de normalidad de D'Agostino & Pearson, la significación estadística de los resultados obtenidos fue determinada mediante la prueba de ANOVA de dos factores con medidas repetidas seguida por un test de comparaciones múltiples de Bonferroni utilizando GraphPad Prism version 6.00 para Windows. Se definió la significación estadística como $p < 0,05$.

Resultados

Capítulo 1: Impacto de las NETs sobre células epiteliales pulmonares

Los cristales de MSU estimulan la producción de NETs

Estudios previos realizados en ratones demostraron que los neutrófilos pueden ser reclutados al pulmón en respuesta a MSU, una señal de daño endógena que puede ser producida por la cristalización del ácido úrico liberado de células dañadas en microambientes ricos en sodio luego de la injuria tisular (Pittman & Kubes 2013, Gasse et al. 2009). Otros estudios también demostraron que el MSU es capaz de inducir NETosis (Mitroulis et al. 2011). Por ello, en primer lugar, se determinó la potencia de este estímulo como inductor de la generación de NETs. Con este fin, los neutrófilos fueron estimulados con MSU (300 µg/ml), con ácido forbol mirístico (PMA ,50 ng/ml) como control positivo o con vehículo como control negativo, durante 4 horas a 37°C. Luego, la producción de NETs fue evaluada por inmunomarcación y microscopía confocal. Dado que en las NETs la elastasa y la MPO se hallan asociadas al ADN, se evaluó la colocalización del ADN con estas proteínas. Los neutrófilos estimulados con MSU liberaron abundante cantidad de NETs (Figura 8 y 9). No obstante, las cantidades detectadas fueron menores a las observadas en respuesta a la estimulación con PMA (Figura 8) siendo éste el estímulo más potente utilizado ampliamente para la producción de NETs *in vitro*. Cabe destacar, que los cristales de MSU resultaron más eficientes en la inducción de NETs respecto a otros estímulos reportados en literatura como inductores de la NETosis (Vorobjeva & Pinegin 2014), como ser la inmunoglobulina G (IgG) agregada por calor (no mostrado), el LPS o la glucosa oxidasa (GO) (Figura 10). Dado que un componente estructural de las NETs es el ADN, para confirmar la identidad de las NETs producidas en respuesta a MSU, se corroboró que las mismas se desintegraran por acción de la Nucleasa Micrococcal (MNasa). Para esto, se estimuló a los neutrófilos con

MSU en presencia o ausencia de MNasa (10 U/ml) y luego se determinó la presencia de NETs mediante microscopía confocal evaluando la colocalización del ADN con nucleosomas y elastasa (Figura 11). El tratamiento con MNasa resultó efectivo para la degradación del ADN y consecuentemente para la disgregación de las NETs.

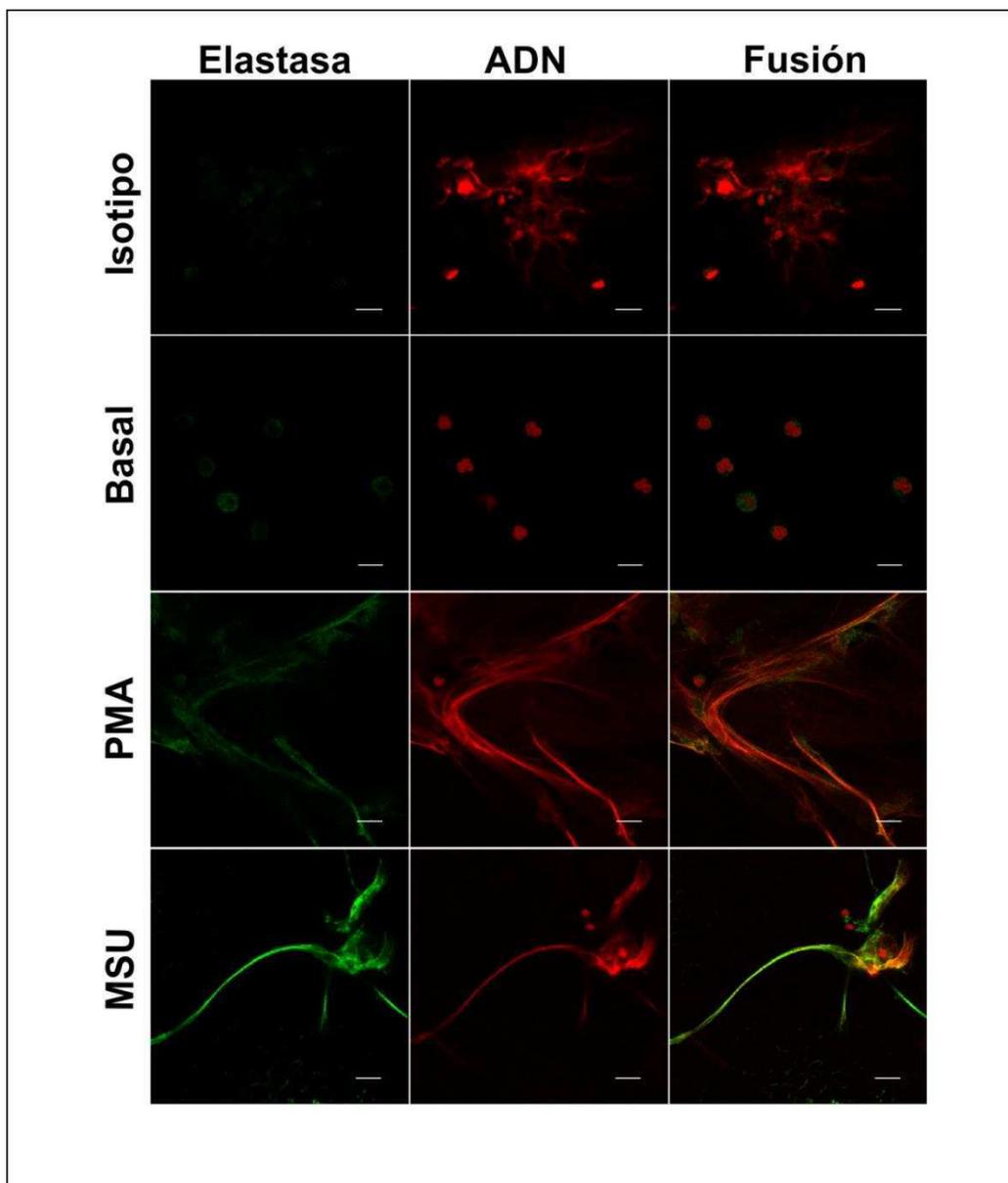


Figura 8. Los cristales de MSU estimulan la liberación de NETs en las que la elastasa colocaliza con ADN. Los neutrófilos fueron estimulados con MSU, PMA (control positivo) o vehículo (condición basal) durante 4 horas at 37°C. Luego fueron marcados con yoduro de propidio para visualizar al ADN (rojo) y con anticuerpos anti-elastasa (verde). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal. Las mismas son representativas de 3 experimentos independientes. Magnificación: 600X. La barra equivale a 20 μm .

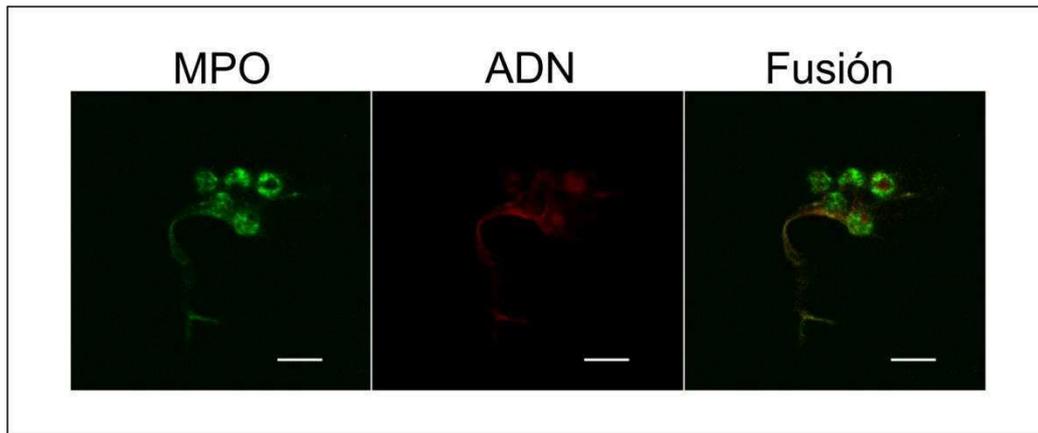


Figura 9. Los cristales de MSU estimulan la liberación de NETs en las que la MPO colocaliza con ADN. Los neutrófilos fueron estimulados con MSU durante 4 horas at 37°C. Luego fueron marcados con yoduro de propidio para visualizar al ADN (rojo) y con anticuerpos anti-MPO (verde). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal. Las mismas son representativas de 2 experimentos independientes. Magnificación: 600X. La barra equivale a 20 μ m.

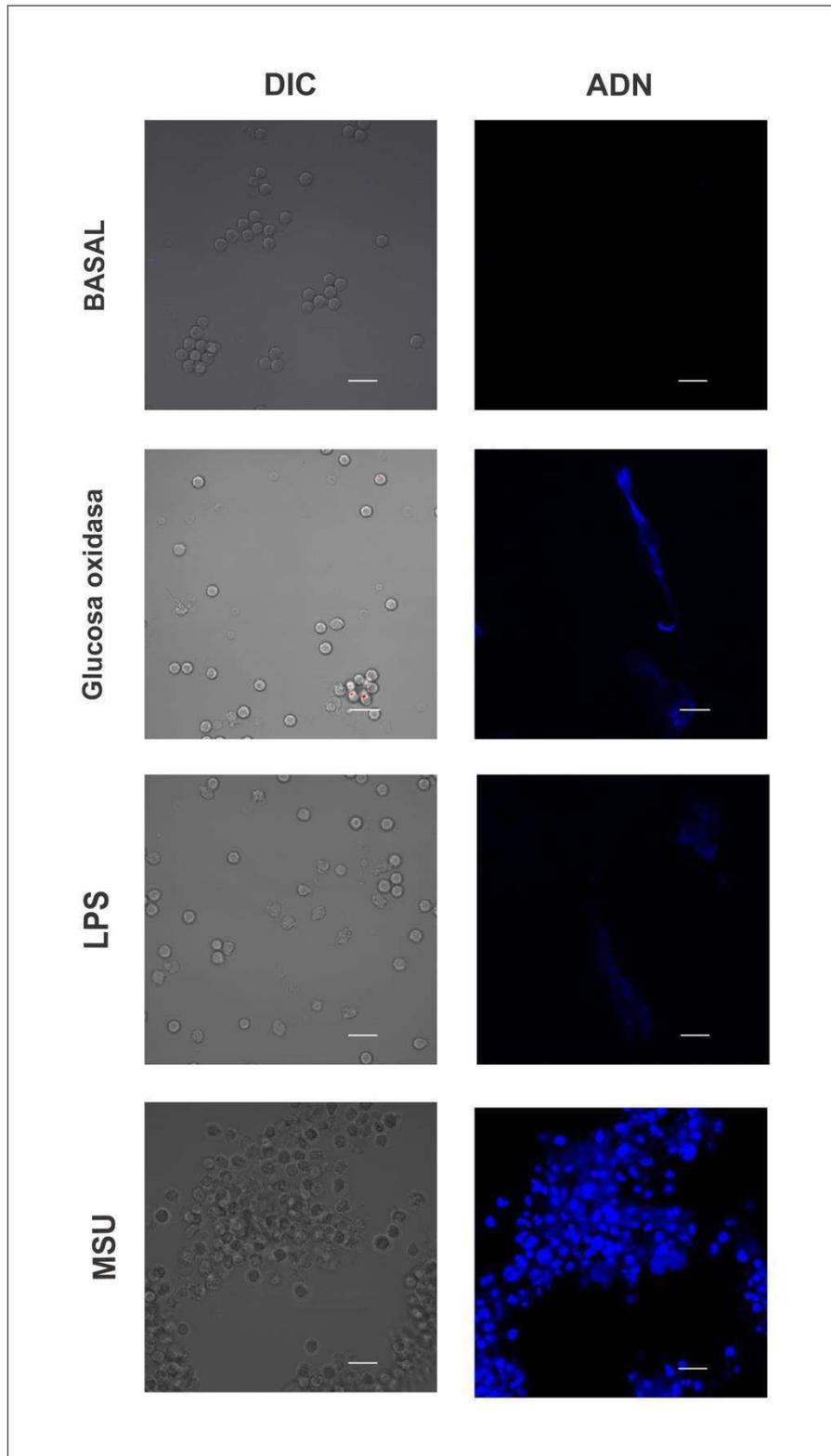


Figura 10. El MSU es un potente inductor de NETosis. Para determinar la capacidad de inducir NETosis del MSU, los neutrófilos fueron incubados con MSU (300 $\mu\text{g/ml}$), LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), glucosa oxidasa (GO; 100 mU/ml) o vehículo (Basal) durante 4 horas a 37°C. Luego fueron teñidos con TOPRO para la visualización del ADN (Azul). Las muestras fueron analizadas por microscopía confocal. Las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes. La barra equivale a 20 μm .

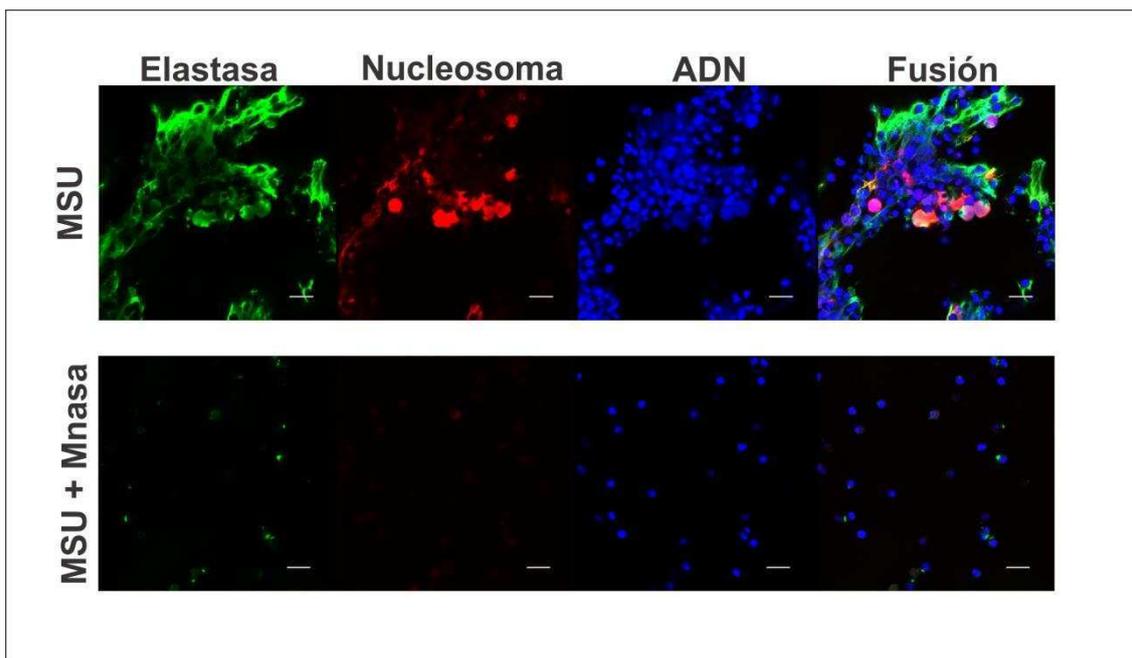


Figura 11. El tratamiento con MNasa indujo la degradación de las NETs inducidas por MSU. Los neutrófilos fueron incubados con MSU (300 $\mu\text{g/ml}$) durante 4 horas a 37°C. Durante la última hora de cultivo se adicionó MNasa (10 U/ml) o vehículo. Luego las preparaciones fueron inmunomarcadas con anticuerpos anti-elastasa (verde) y anti-nucleosomas (rojo), y teñidos con TOPRO para la visualización del ADN (azul). Las imágenes fueron adquiridas por microscopía confocal y son representativas de 2 experimentos independientes. La barra equivale a 20 μm .

Con el objeto de disponer de una medida cuantitativa de la capacidad del MSU de inducir NETosis, se procedió a la cuantificación del ADN, de la MPO y a la determinación de la actividad de elastasa en los sobrenadantes de neutrófilos estimulados con MSU. A los valores obtenidos se los comparó con los determinados en los sobrenadantes de neutrófilos no estimulados (basal).

La cuantificación del ADN fue realizada por fluorimetría evaluando la fluorescencia emitida luego de la incorporación a las muestras del agente intercalante SybrGold e interpolación con una curva estándar (Figura 12 A). Para confirmar que la fluorescencia detectada correspondiese al ADN, en paralelo se evaluó el impacto del tratamiento de los sobrenadantes con MNasa, que como se demostró en la figura 11, es capaz de degradar a las NETs. Teniendo en cuenta que en la condición basal, a juzgar por las

imágenes de microscopía confocal, en el tiempo de cultivo empleado no se produce NETosis espontánea ni necrosis, el hecho de que en estos sobrenadantes se detecte fluorescencia y la misma no sea diferente de la obtenida luego del tratamiento con MNasa, sugirió que este método también detecta fluorescencia emitida por otros componentes del sobrenadante que no corresponden a ADN. No obstante esto, en la Figura 12 A se describen como concentraciones de ADN a los valores de totales obtenidos al interpolar el valor de fluorescencia en la curva estándar. El MSU indujo un incremento significativo en la concentración de ADN determinada en los sobrenadantes de cultivo de neutrófilos, la cual fue reducida hasta los niveles detectados en los sobrenadantes de neutrófilos no estimulados cuando los mismos fueron tratados con MNasa. Los resultados de estos ensayos también arrojaron un incremento significativo de la concentración de MPO y de la actividad de elastasa en los sobrenadantes de neutrófilos estimulados con MSU respecto a los sobrenadantes de neutrófilos no estimulados (Figura 12 B y C).

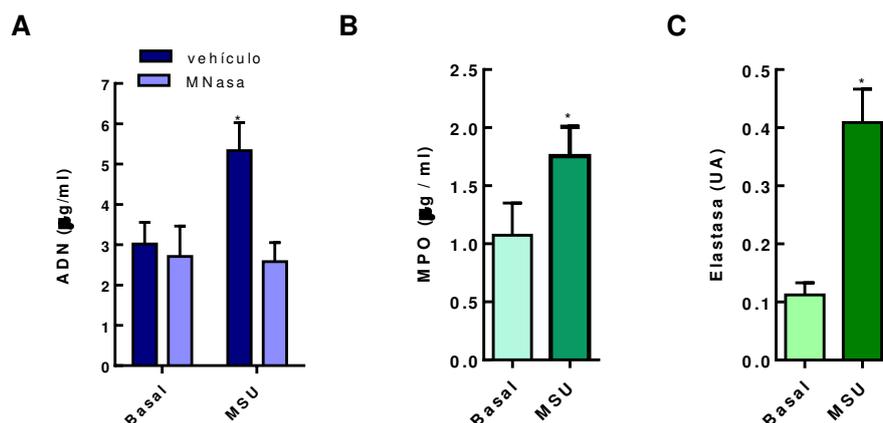


Figura 12. La estimulación de neutrófilos con MSU induce un incremento de la concentración de ADN y MPO así como de la actividad de elastasa en los sobrenadantes de cultivo. Los neutrófilos fueron estimulados con MSU o vehículo durante 4 horas con presencia o ausencia de MNasa durante la última hora de cultivo. Luego se colectaron los sobrenadantes y en ellos se determinó la concentración de ADN por fluorimetría (A), la concentración de MPO (B) y se determinó la actividad de elastasa expresada en unidades arbitrarias de absorbancia. (C). Los datos representan la media \pm SEM de 3 (A) 4 (B) y 4 (C) experimentos independientes. * $p < 0.05$ respecto al Basal.

Con el objeto de ensayar la capacidad inmunomoduladora de las NETs sobre distintos tipos celulares, se estandarizó un protocolo que permitiese aislarlas tanto de los restos celulares como del estímulo inductor. Para ello se estimuló a los neutrófilos con MSU durante una hora, luego se les reemplazó el sobrenadante tras una breve agitación y centrifugación y se cultivaron durante tres horas adicionales. Posteriormente se separaron las NETs de los restos celulares mediante un sonicado suave, centrifugación y posterior recuperación de los sobrenadantes. Para verificar la eficiencia de este procedimiento se corroboró la presencia de NETs en los sobrenadantes obtenidos mediante microscopía confocal. Para ello, los sobrenadantes fueron sembrados sobre una cámara Lab-teck pretratada con poly-L-lisina, coloreados con IP e inmunomarcados con anticuerpos antielastasa y antinucleosoma. La microscopía confocal reveló la presencia de ADN colocalizando con ambas proteínas sólo en los sobrenadantes de neutrófilos estimulados con MSU (Figura 13). Además, se determinó la concentración de ADN en los sobrenadantes obtenidos luego del sonicado, resultando significativamente mayor en los sobrenadantes provenientes del tratamiento con MSU (ver Figura 19).

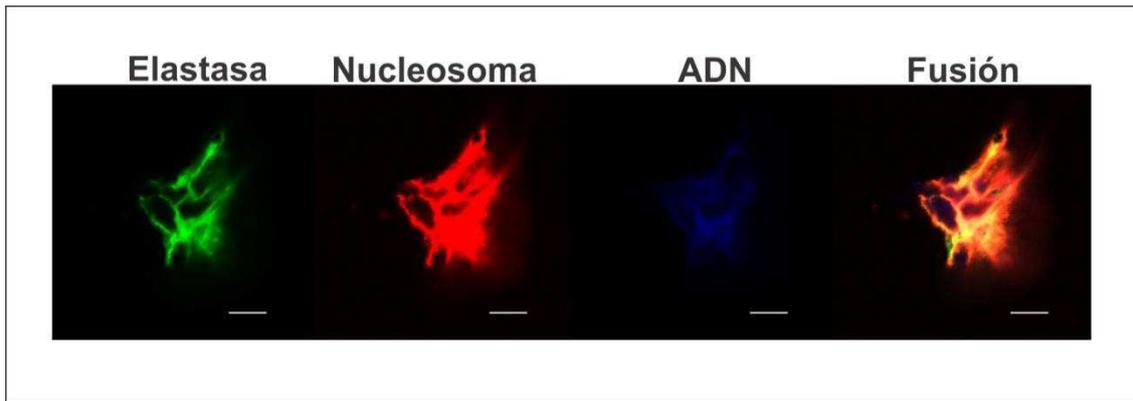


Figura 13. El protocolo desarrollado resultó eficiente para el aislamiento de NETs. Los sobrenadantes de neutrófilos estimulados con MSU se sembraron sobre una cámara Lab-teck. Luego la elastasa (verde) y los nucleosomas (rojo) fueron revelados con anticuerpos específicos y el ADN fue coloreado con TO-PRO3 (azul). La imagen es representativa de 2 experimentos independientes. Magnificación 600x. La barra equivale a 10 μm .

Las NETs incrementan la secreción de citoquinas por células epiteliales del tracto respiratorio.

Las NETs provenientes de 10^6 neutrófilos, aisladas siguiendo el protocolo descrito en el ítem precedente, fueron utilizadas para evaluar su efecto sobre células epiteliales pulmonares. Para ello, monocapas con 80-90% de confluencia de células epiteliales alveolares A549 fueron cultivadas en presencia o ausencia de NETs o de sus correspondientes controles por 18 hs a 37°C. Posteriormente las concentraciones de la citoquina IL-6 y de la quimiocina IL-8 fueron determinadas por ELISA. Las NETs incrementaron marcadamente la producción de IL-8 e IL-6 por las células epiteliales alveolares A549 (Figura 14). Los sobrenadantes de neutrófilos necróticos (SN PMNnec) obtenidos por calentamiento de los mismos a 45°C, y los sobrenadantes de neutrófilos no estimulados (SN PMNse), también aumentaron la secreción de IL-8 por las células A549 pero este incremento fue significativamente menor al inducido por las NETs. Para descartar la contribución de las citoquinas aportadas por los sobrenadantes de neutrófilos a los niveles de citoquinas detectados en los sobrenadantes de células

epiteliales, también se determinaron sus concentraciones en los primeros. Como era de esperar, los ensayos no detectaron IL-6 en las preparaciones de NETs. Por otra parte, las concentraciones de IL-8 determinadas en las mismas (alrededor de 146 pg/ml) fueron despreciables frente a las producidas, aún en condiciones basales, por las células epiteliales.

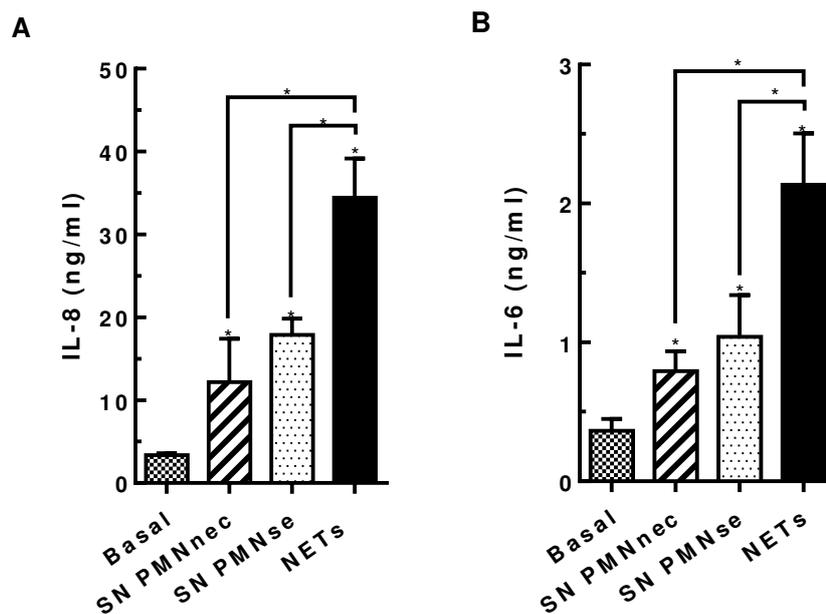


Figura 14. Las NETs incrementaron la secreción de IL-8 e IL-6 por células epiteliales A549. Las células epiteliales A549 se cultivaron con NETs, con el sobrenadante de neutrófilos muertos por necrosis (SN PMNnec), con el sobrenadante de neutrófilos no estimulados (SN PMNse) o con vehículo (Basal) durante 18 hs a 37°C. Luego se recuperaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de IL-8 (A) e IL-6 (B) por ELISA. Los datos representan la media \pm SEM de 4 experimentos realizados por triplicado. Anova de dos factores con medidas repetidas con post test de Bonferroni. * $p < 0.05$.

A continuación se realizaron diluciones seriadas de las preparaciones de NETs y se ensayó su impacto sobre las células epiteliales A549. Se observó que el efecto estimulador de las NETs fue dependiente de la concentración de las mismas (Figura 15).

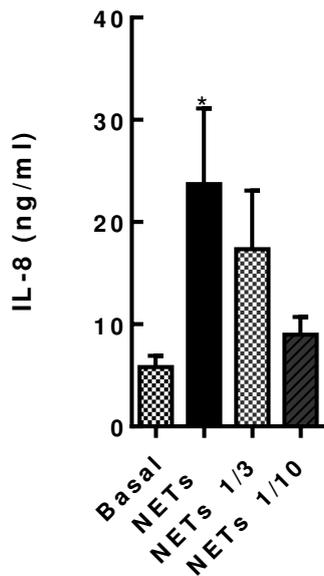


Figura 15 . El efecto estimulador de las NETs sobre las células A549 es dependiente de su concentración. Las células epiteliales A549 se incubaron con distintas diluciones de las NETs durante 18 hs a 37°C. Luego se recuperaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de IL-8 por ELISA. Los datos representan la media \pm SEM de 4 experimentos realizados por triplicado. Anova de dos factores con medidas repetidas con post test de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto al basal.

A fin de descartar que el efecto adjudicado a las NETs pudiera deberse a trazas de MSU que podrían estar contenidas en las preparaciones de NETs, se realizaron dos abordajes. Por un lado, se estudió el impacto directo del MSU sobre las células A549. Considerando que de acuerdo a las imágenes de microscopía confocal, el paso de eliminación de los cristales realizado a la hora de estimulación de los neutrófilos con el MSU es muy eficiente, y sólo se evidenciaron cristales en el interior de las células que los fagocitaron (Figura 7) era de esperar que las preparaciones de NETs no contuvieran niveles de MSU superiores a 30 $\mu\text{g/ml}$ (un décimo de las empleadas para estimular a los neutrófilos). Por ello, estos ensayos fueron conducidos con concentraciones de MSU de 30 $\mu\text{g/ml}$ y 15 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, en algunos experimentos también se testearon concentraciones de 300 $\mu\text{g/ml}$, arrojando resultados similares (datos no mostrados). El MSU por sí mismo no fue capaz de incrementar la secreción de IL-6 respecto de la producción basal a ninguna de las concentraciones ensayadas. Por otro lado, se evaluó el efecto ejercido sobre las células A549 de sobrenadantes de neutrófilos fijados y luego estimulados con

MSU siguiendo el mismo protocolo que el aplicado a neutrófilos viables para la obtención de NETs. En estas condiciones, cualquier efecto ejercido por los sobrenadantes sería adjudicable a los cristales remanentes. Sin embargo, estos sobrenadantes tampoco fueron capaces de estimular la secreción de IL-6, descartando que trazas de MSU que pudiesen estar presentes en las NETs fueran responsables del efecto proinflamatorio ejercido sobre las células epiteliales (Figura 16).

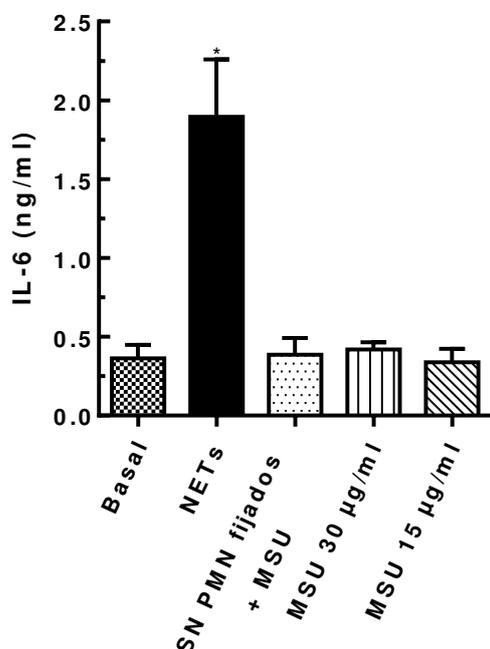


Figura 16. Los cristales de MSU no estimulan por sí mismos la secreción de IL-6 por células epiteliales A549. Las células epiteliales A549 se cultivaron con NETs, con distintas concentraciones de MSU, con sobrenadantes de neutrófilos fijados, lavados y luego tratados con MSU (SN PMN fijados + MSU) o con vehículo (Basal) durante 18 hs a 37°C. Luego se recuperaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de IL-6 por ELISA. Los datos representan la media \pm SEM de 5 experimentos realizados por triplicado. Anova de dos factores con medidas repetidas con post test de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto al basal.

Con el objeto de determinar si el efecto inmunoestimulador de las NETs también era ejercido sobre células epiteliales bronquiales, se ensayó su impacto sobre monocapas 80-90% confluentes de células BEAS-2B. Las NETs también incrementaron significativamente la secreción de IL-8 e IL-6 por estas células respecto a la detectada en la condición basal o la inducida por los sobrenadantes de neutrófilos necróticos. La

estimulación ejercida por las NETs también fue significativamente mayor a la inducida en respuesta a los sobrenadantes de neutrófilos no estimulados (Figura 17).

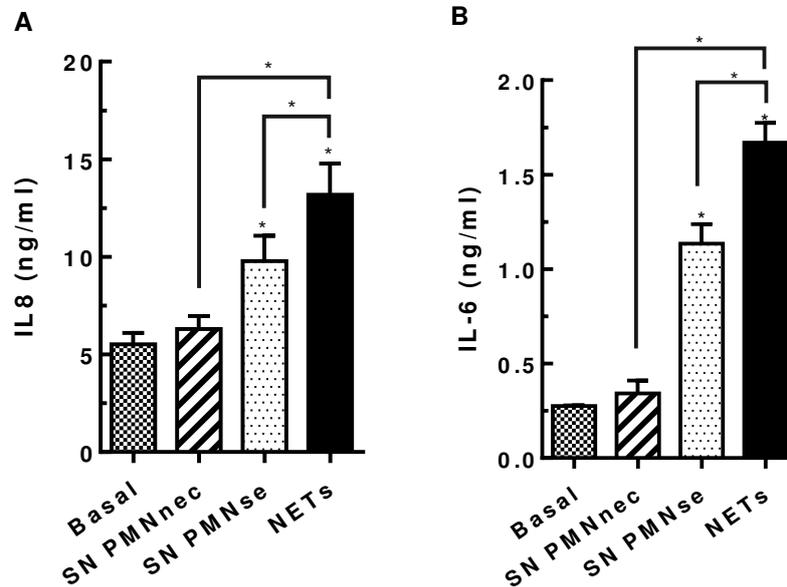


Figura 17. Las NETs incrementaron la secreción de IL-8 e IL-6 por células epiteliales BEAS-2B. Las células epiteliales BEAS-2B se incubaron con NETs, con el sobrenadante de neutrófilos necróticos (PMNnec), con el sobrenadante de neutrófilos no estimulados (PMNse) o con vehículo (Basal) durante 18 hs a 37°C. Luego se recuperaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de IL-8 (A) e IL-6 (B) por ELISA. Los datos representan la media \pm SEM de 4 (IL-6) y 3 (IL-8) experimentos realizados por triplicado. Anova de dos factores con medidas repetidas con post test de Bonferroni. * $p < 0.05$

Nosotros razonamos que cuando los neutrófilos son reclutados al pulmón en respuesta a señales de daño, podrían ser activados tanto a nivel de los capilares pulmonares, del espacio intersticial como a nivel del lumen respiratorio (Grommes & Soehnlein 2011). En este último caso, en la medida que el epitelio mantuviera su integridad, las células epiteliales serían estimuladas sólo por su cara apical debido a que las mismas exhiben *in vivo* una distribución polarizada. Por ello, para simular *in vitro* esta situación, se evaluó el impacto de las NETs al ser aplicadas sobre la cara apical de un cultivo de células epiteliales bronquiales 16HBE14o⁻ crecidas en forma polarizada sobre filtros Transwell. Las NETs incrementaron significativamente la secreción de IL-8 hacia el lado apical del

epitelio respecto de los niveles de IL-8 observados cuando las células fueron cultivadas en presencia de sobrenadantes de neutrófilos no estimulados (Figura 18), pero no modularon la secreción de citoquinas hacia la cara basolateral del epitelio.

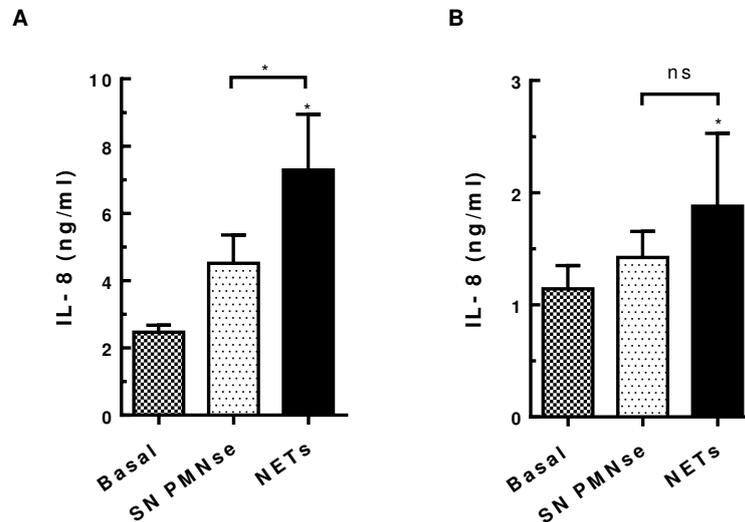


Figura 18. Las NETs incrementaron la secreción de IL-8 por células epiteliales 16HBE14o polarizadas hacia la cara apical y no hacia la cara basal. Las NETs, sobrenadantes de neutrófilos no estimulados o medio de cultivo (basal) fueron depositados sobre la cara apical de un cultivo confluyente de células epiteliales 16HBE14o crecidas en forma polarizada. Luego las células fueron cultivadas durante 18 hs a 37°C, al cabo de las cuales se recuperaron los sobrenadantes y se determinaron las concentraciones de IL-8 secretadas hacia la cara apical (A) o basolateral (B) por ELISA. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos realizados por triplicado. Anova de dos factores con medidas repetidas con post test de Bonferroni. * $p < 0.05$. ns: No significativo.

En conjunto, los resultados obtenidos indicaron que las preparaciones de NETs exhibían un mayor potencial inmunoestimulador sobre células epiteliales que los sobrenadantes de neutrófilos no estimulados. Para confirmar que fuesen las NETs contenidas en esta preparaciones las responsables del incremento en la producción de citoquinas, se procedió a estimular a los neutrófilos con MSU en presencia o ausencia de inhibidores de la NETosis por 4 horas y a evaluar el impacto de los sobrenadantes de estos cultivos sobre la capacidad de las células epiteliales A549 y BEAS-2B de secretar IL-6 e IL-8. Como inhibidores de la NETosis se emplearon tanto Difeniliodonio (DPI) como

un inhibidor de elastasa (IE). El DPI fue utilizado por su capacidad de inhibir a la NADPH oxidasa, ya que previamente fue demostrado que la NETosis inducida por MSU requiere de la formación de IRO e involucra la actividad de esta enzima (Schorn et al. 2012). Por otra parte, se utilizó un inhibidor de elastasa porque es sabido que el desencadenamiento de la NETosis involucra la translocación al núcleo de esta enzima para promover la descondensación de la cromatina (Papayannopoulos et al. 2010) y estudios previos habían empleado un inhibidor de elastasa para impedir la NETosis *in vivo* (Cools-Lartigue et al. 2013). En primer lugar, se corroboró que bajo nuestras condiciones experimentales tanto el DPI como el IE inhibieran la NETosis. Como ya habíamos demostrado que el ADN liberado en respuesta a MSU pertenece a las NETs (Figura 8 y 9) como medida de NETosis se determinó el contenido de ADN en los sobrenadantes de neutrófilos estimulados con MSU en presencia o ausencia de DPI o IE. Como se observa en la Figura 19, ambos compuestos inhibieron la liberación de NETs inducida por MSU.

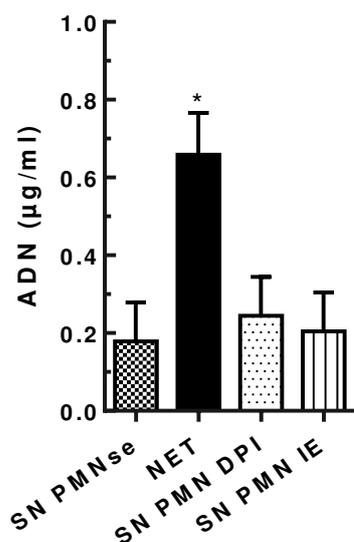


Figura 19. El DPI y el IE inhibieron la NETosis inducida por MSU. Los neutrófilos fueron estimulados con MSU en presencia o ausencia de DPI o del IE durante 4 horas a 37°C. Luego se colectaron los sobrenadantes y en ellos se cuantificó el contenido de ADN mediante el agente intercalante SybrGold por fluorometría, como una medida de la producción de NETs. Los datos están expresados como la media \pm SEM de 6 experimentos en los que el contenido de ADN de los sobrenadantes fue calculado luego de restar el valor obtenido en un ensayo paralelo en presencia de MNasa. * $p < 0.05$ respecto a SN PMNse.

En paralelo, estos sobrenadantes fueron depositados sobre monocapas de células epiteliales A549, las cuales fueron cultivadas por 18 horas adicionales, al cabo de las cuales se determinaron las concentraciones de citoquinas secretadas al medio. Como se observa en la Figura 20, los sobrenadantes provenientes de neutrófilos estimulados con MSU en presencia de los inhibidores de la NETosis no fueron capaces de incrementar la secreción de IL-6 o IL-8 por encima de la inducida por los sobrenadantes de los neutrófilos no estimulados. Estos resultados no son atribuibles a un efecto del DPI o del IE sobre las propias células epiteliales ya que en ensayos paralelos, los mismos no modificaron significativamente la producción basal de citoquinas por las células epiteliales (Figura 20).

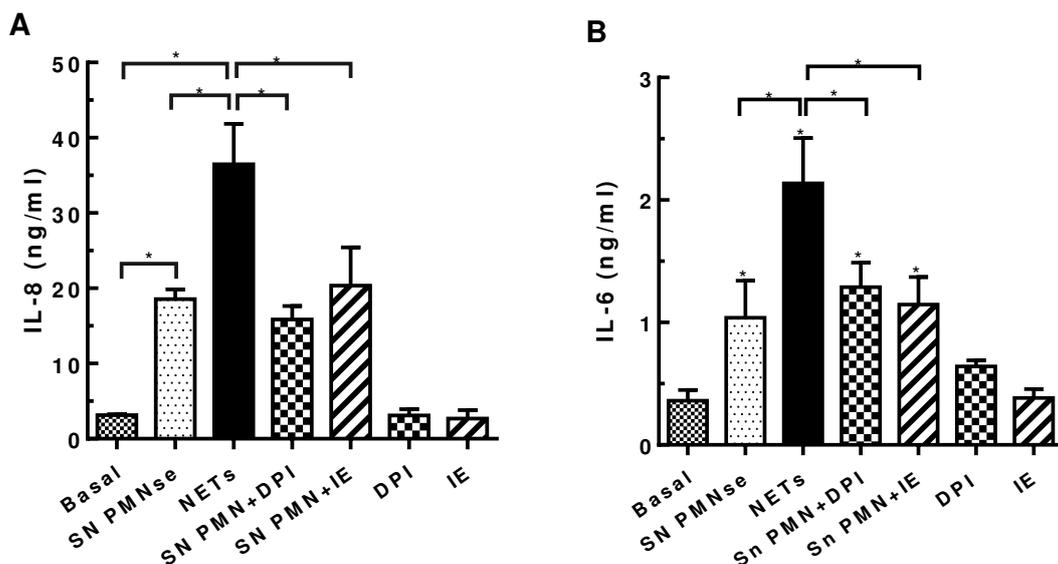


Figura 20 . Las NETs son las responsables del efecto estimulador de la producción citoquinas por células A549. Las células epiteliales A549 fueron estimuladas con NETs, con sobrenadantes de neutrófilos no estimulados, con sobrenadantes de neutrófilos estimulados con MSU en presencia de inhibidores de la NETosis (SN PMN+DPI 10 μ M y SN PMN+IE 10 μ M), sólo con DPI (10 μ M) o sólo con IE (10 μ M), durante 18 horas a 37°C. Luego se recolectaron los sobrenadantes y se determinaron las concentraciones de IL-8 (A) e IL6 (B) por ELISA. Los datos representan la media \pm SEM de 4 experimentos realizados por triplicado. Anova de dos factores con medidas repetidas con post test de Bonferroni. * $p < 0.05$.

Luego se realizó el mismo ensayo sobre células BEAS-2B. Al igual que lo observado en las células A549, los sobrenadantes provenientes de neutrófilos estimulados con MSU en presencia de los inhibidores de la NETosis DPI e IE, fueron incapaces de promover la secreción de IL-6 o IL-8 por encima de la inducida por los sobrenadantes de los neutrófilos no estimulados. A su vez, esta secreción fue significativamente menor que la inducida por las NETs. Los inhibidores tampoco modularon por sí mismos, la secreción de citoquinas respecto al nivel basal producido por las células BEAS-2B (Figura 21).

En conjunto, los hallazgos realizados sugirieron que las NETs son las responsables del efecto inmunoestimulador de las células epiteliales A549 y BEAS-2B.

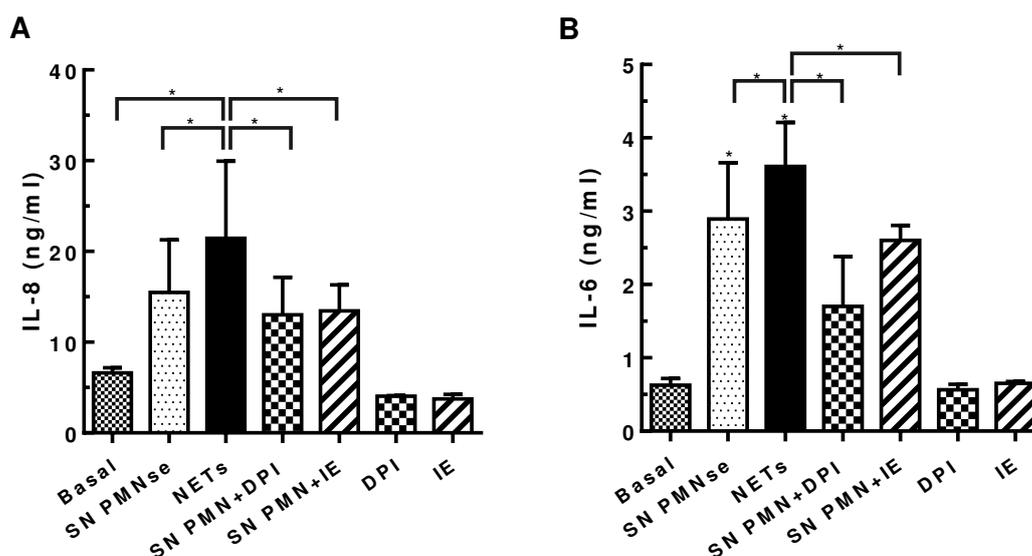


Figura 21 . Las NETs son las responsables del efecto estimulador de la secreción de citoquinas por células BEAS-2B. Las células epiteliales BEAS-2B fueron estimuladas con NETs, con sobrenadantes de neutrófilos no estimulados, con sobrenadantes de neutrófilos estimulados con MSU en presencia de inhibidores de la NETosis (SN PMN+DPI 10 μ M y SN PMN+IE 10 μ M), sólo con DPI (10 μ M) o sólo con IE (10 μ M), por 18 horas a 37°C. Luego se recolectaron los sobrenadantes y se determinaron las concentraciones de IL-8 (A) e IL6 (B) por ELISA. Los datos representan la media \pm SEM de 4 experimentos realizados por triplicado. Anova de dos factores con medidas repetidas con post test de Bonferroni. * $p < 0.05$.

La capacidad estimuladora de las NETs sobre las células epiteliales es similar a la ejercida por diferentes PMAPs.

Con el objeto de determinar el potencial estimulador de las NETs sobre las células epiteliales, se comparó su capacidad de inducir la estimulación de citoquinas con la de agonistas conocidos de TLRs empleados a concentraciones que se encuentran en el rango de aquellas consideradas como estándar para células epiteliales. Para ello, se estimuló a monocapas 80-90% confluentes de células epiteliales A549 con NETs, LPS, PAM2CSK4, PAM3CSK4 o con flagelina por 18 hs. a 37°C y luego se determinó su capacidad de inducir la secreción de IL-6, IL-8 y CCL-2. Como se observa en la Figura 22, las NETs estimularon la producción de IL-8 en niveles similares a los alcanzados por la estimulación con LPS, PAM2CSK4 y PAM3CSK4. Asimismo indujeron niveles de secreción de IL-6 similares a los inducidos por LPS y PAM3CSK4 (Figura 22).

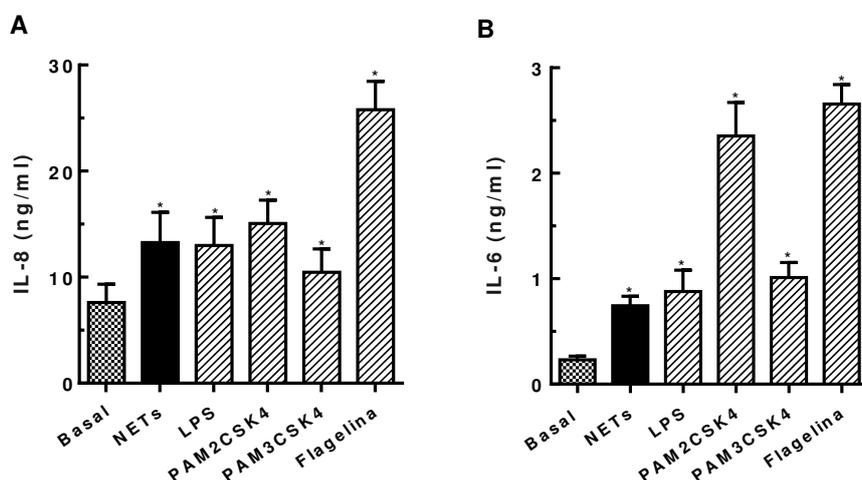


Figura 22. Las NETs presentan una capacidad estimuladora similar a la exhibida por algunos agonistas de TLRs. Las células A549 fueron estimuladas con NETs inducidas por MSU, con el agonista de TLR4, LPS (*E. coli* O111:B4, 250 ng/ml); con los agonistas de TLR2 PAM2CSK4 (100 ng/ml) y PAM3CSK4 (1 µg/ml) o con el agonista de TLR5, flagelina (2 µg/ml). Luego fueron cultivadas por 18 hs a 37°C, al cabo de las cuales se determinaron las concentraciones de IL-8 (A) e IL-6 (B) en los sobrenadantes por ELISA. Los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos realizados por triplicado. Anova de dos factores con medidas repetidas con post test de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto al basal. NETs vs LPS o PAM3CSK4 no significativo.

Las NETs también indujeron la secreción de la quimiocina CCL-2 en niveles similares a los inducidos por LPS y PAM3CSK4 (Figura 23). La capacidad estimuladora de las NETs en todos los casos fue menor a la inducida por flagelina.

En conjunto, estos resultados sugieren que las NETs tienen una capacidad para estimular la secreción de citoquinas por las células epiteliales que no difiere significativamente de la que exhiben algunos agonistas de TLRs.

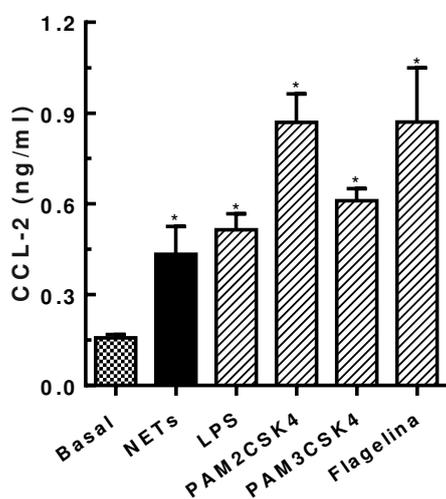


Figura 23. Las NETs presentan una capacidad estimuladora en la secreción de CCL-2 similar a la de algunos agonistas de TLRs. Las células A549 fueron estimuladas con NETs inducidas por MSU, LPS (*E. coli* O111:B4, 250 ng/ml); PAM2CSK4 (100 ng/ml), PAM3CSK4 (1 µg/ml) o flagelina (2 µg/ml) durante 18 hs a 37°C. Luego se determinó la concentración de CCL-2 en los sobrenadantes por ELISA. Los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos realizados por triplicado. Anova de dos factores con medidas repetidas con post test de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto al basal.

Con el objeto de determinar si las NET podrían sinergizar el efecto del LPS sobre la secreción de citoquinas por las células epiteliales, se estimuló a monocapas de células A549 simultáneamente con NETs y LPS. Sin embargo, la estimulación conjunta con ambos agonistas ejerció un efecto aditivo sobre la secreción de IL-6 respecto a la inducida por ambos estímulos individualmente (Figura 24).

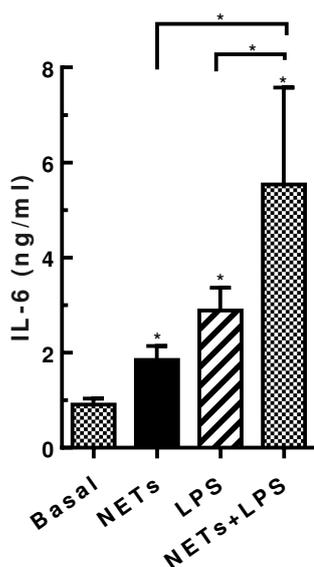


Figura 24. Impacto de la estimulación conjunta con NETs y LPS. Las células A549 fueron estimuladas con NETs inducidas por MSU, LPS (*E. coli* O111:B4, 250 ng/ml) o NETs + LPS durante 18 hs a 37°C. Luego se determinaron las concentraciones de CCL-2 en los sobrenadantes por ELISA. Los datos representan la media \pm SEM de 5 experimentos realizados por triplicado. Anova de dos factores con medidas repetidas con post test de Bonferroni. * $p < 0.05$.

Las NETs no afectan la viabilidad de las células epiteliales

En un estudio previo, Saffarzadeh M. y colaboradores reportaron que las NETs inducidas por PMA conducen a la muerte de las células epiteliales (Saffarzadeh et al. 2012). Por ello, para determinar si este es un fenómeno general atribuible a las NETs de cualquier origen, se evaluó el impacto de las NETs inducidas por MSU sobre la viabilidad de las células epiteliales A549 y BEAS-2B. Luego de las 18 hs de cultivo en presencia de NETs, se marcó a las células epiteliales con IP y anexina V conjugada a FITC, y se las analizó luego por citometría de flujo. Tanto las células A549 (Figura 25) como las BEAS-2B (datos no mostrados), presentaron porcentajes similares de células necróticas y apoptóticas al ser cultivadas con la NETs, en relación a los exhibidos en la condición basal.

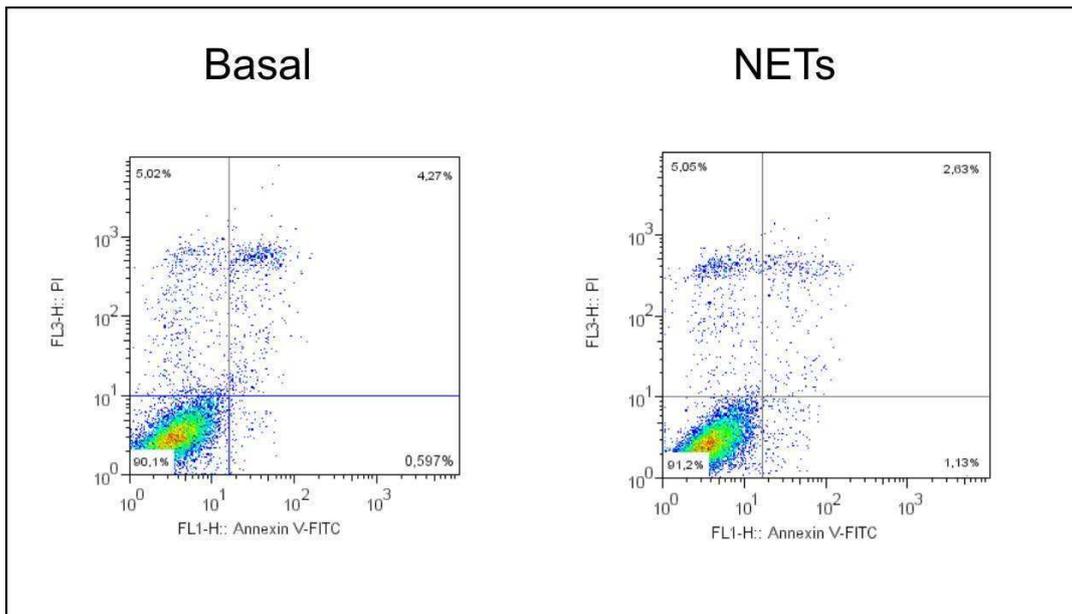


Figura 25. Las NETs no afectaron la viabilidad de las células epiteliales A549. Las células A549 fueron estimuladas con NETs inducidas por MSU durante 18 hs a 37°C. Luego fueron teñidas con IP y anexina V conjugada a FITC y analizadas por citometría de flujo. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

En experimentos adicionales se evaluó si las NETs inducidas por MSU afectaban la morfología de las células epiteliales. Para ello se cultivaron a monocapas de células A549 o BEAS-2B en presencia o ausencia de NETs durante 18 hs. a 37°C. Al cabo de este tiempo, las células fueron fijadas, coloreadas con cristal violeta, y observadas por microscopía óptica. Los resultados indicaron que las NETs no indujeron cambios morfológicos evidenciables en ninguno de los tipos celulares (Figura 26).

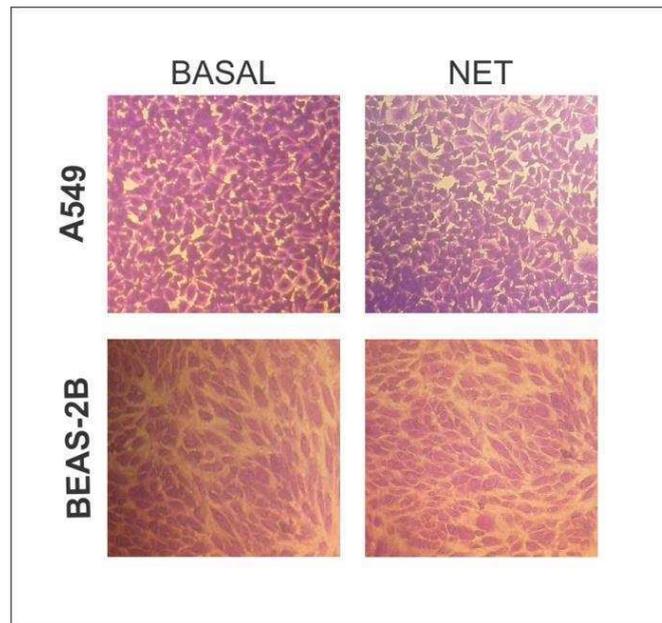


Figura 26. Las NETs no afectaron la morfología de las células epiteliales. Las células A549 y BEAS-2B fueron cultivadas en presencia o ausencia de NETs inducidas por MSU durante 18 hs. a 37°C. Luego las células fueron fijadas con metanol y teñidas con cristal violeta. Posteriormente fueron analizadas por microscopía óptica. Magnificación: 200X. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

En conjunto, estos resultados sugirieron que las NETs inducidas por MSU no afectan la viabilidad de las células epiteliales.

Por otra parte, también se evaluó si las NETs afectaban la integridad de la barrera epitelial en células 16HBE14o⁻ polarizadas. Para ello, se crecieron a las células epiteliales bronquiales 16HBE14o⁻ sobre membranas de filtros Transwell[®]. Una vez que el cultivo alcanzó una resistencia eléctrica transepitelial (RET) acorde al de una monocapa crecida en forma polarizada (alrededor de 1800 $\Omega \cdot \text{cm}^2$), el mismo fue expuesto en su cara apical a NETs inducidas por MSU, a sobrenadantes de neutrófilos no estimulados o vehículo por 18hs. a 37°C. Luego se evaluó la liberación de LDH al medio como una medida de la viabilidad. La Figura 27 muestra que las NETs no indujeron cambios en los niveles de LDH detectados en el medio, respecto a los niveles de LDH detectados en el medio de cultivo

de células epiteliales cultivadas con vehículo (condición basal) o con sobrenadantes de neutrófilos no estimulados.

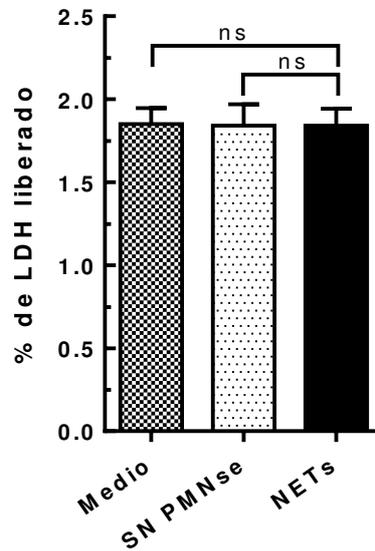


Figura 27. Las NETs no afectaron la viabilidad de las células epiteliales 16HBE14o polarizadas. Las células 16HBE14o fueron crecidas en forma polarizada sobre membranas de filtros Transwell® y luego fueron incubadas apicalmente con NETs inducidas con MSU, con sobrenadantes de neutrófilos no estimulados (SN PMNse) o con vehículo (Medio) durante 18 hs a 37°C. Al cabo de este tiempo se recolectaron los sobrenadantes en contacto con la cara apical y se determinó en ellos la concentración de LDH. Los datos representan la media \pm SEM de 5 experimentos realizados por triplicado analizados con un test de Anova de dos factores con medidas repetidas con post test de Bonferroni. ns: No significativo.

En los mismos cultivos también se determinaron la RET de la monocapa y su permeabilidad a dextrán conjugado a FITC (dextrán-FITC). Como se observa en la Figura 28, tampoco se hallaron diferencias en estos parámetros entre células expuestas a NETs, a sobrenadantes de neutrófilos no estimulados o a vehículo.

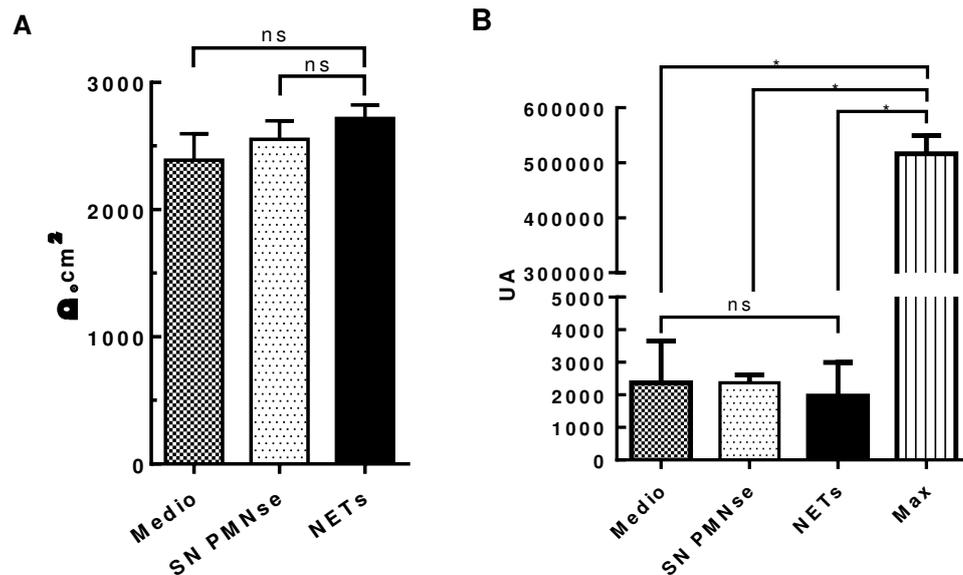


Figura 28. Las NETs no afectaron la integridad de la monocapa de células epiteliales 16HBE14o polarizadas. Las células 16HBE14o fueron crecidas en forma polarizada sobre membranas de filtros Transwell® y luego fueron incubadas con NETs inducidas con MSU, con sobrenadantes de neutrófilos no estimulados o con vehículo (Medio) durante 18 hs a 37°C. Al cabo de este tiempo se midió la RET de la monocapa (A) y su permeabilidad a dextrán-FITC (B). Como control positivo de este ensayo de permeabilidad se determinó la permeabilidad a dextrán-FITC de una membrana Transwell® carente de células (Max). Los resultados están expresados en unidades arbitrarias de fluorescencia. Los datos representan la media \pm SEM de 5 experimentos realizados por triplicado. * $p < 0.05$. ns: No significativo.

Estos resultados en conjunto indican que las NETs inducidas por MSU no afectaron la integridad de las monocapas polarizadas de células epiteliales.

Identificación del factor de las NETs responsable de los efectos inmunoestimulatorios en células epiteliales

Los siguientes experimentos tuvieron por objetivo determinar qué componente/s de las NETs es responsable de los efectos inmunoestimulatorios observados en las células epiteliales A549 y BEAS-2B. Para ello, en primer lugar se analizó si esta capacidad se sustentaba en el ADN que las compone. Con este fin, se estimuló a los neutrófilos con MSU en presencia y ausencia de una concentración alta de MNasa (10 U/ml),

aprovechando su capacidad de degradar al ADN de la NETs y en consecuencia de dismantelar a las mismas, tal como se demostró en la Figura 11. Luego de las 4 hs de incubación, se recuperaron los sobrenadantes y se los empleó para estimular a las células epiteliales A549. Dado que la MNasa no podía ser eliminada de los sobrenadantes de los neutrófilos y estaría presente también durante el cultivo con las células epiteliales, también se evaluó el impacto de esta enzima sobre las células epiteliales. Como se muestra en la Figura 29, la digestión de las NETs con Mnasa no modificó la capacidad de la preparación de inducir el incremento en la secreción de IL-8 o IL-6. La MNasa por sí misma no modificó significativamente la secreción de estas citoquinas por las células epiteliales. Estos resultados no sólo descartaron al ADN como responsable del efecto inmunoestimulador de las NETS sobre las células epiteliales sino también sugirieron que algún otro componente de las mismas ejerce este efecto estando o no asociado al ADN.

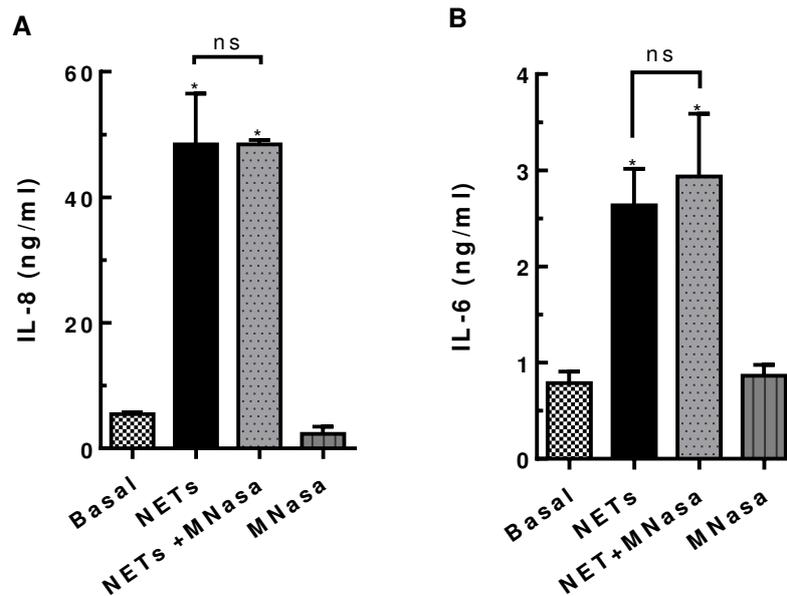


Figura 29. El ADN de las NETs no es el responsable del efecto estimulador sobre las células epiteliales. Las células A549 fueron cultivadas con NETs, con NETs digeridas con Mnsa 10 U/ml, con Mnsa 10 U/ml sola o con vehículo (Basal) durante 18 hs a 37°C. Luego se obtuvieron los sobrenadantes y se determinó la concentración de IL-8 (A) e IL-6 (B) por ELISA. Los datos representan la media \pm SEM de 4 experimentos realizados por triplicado. Anova de dos factores con medidas repetidas con post test de Bonferroni $*p < 0.05$ respecto al basal. ns: No significativo.

Dado que otro de los componentes más representados en las NETs son las histonas, a continuación se evaluó el impacto de las mismas sobre la capacidad de producir citoquinas de las células epiteliales. Estudios previos demostraron que la heparina, debido a su marcada carga eléctrica negativa, compite con el ADN, pegándose con alta afinidad a las histonas y disociándolas de la cromatina (Fuchs et al. 2010). Aprovechando estas propiedades, luego de aislar a las NETs, se las incubó por 30 minutos con heparina de bajo peso molecular (Fondaparinux). Luego se las empleó para estimular a las células epiteliales A549 y comparar su efecto con el ejercido por las NETs no tratadas con heparina. Dado que la heparina estaría presente en las preparaciones de NETs tratadas con esta molécula, también se evaluó el impacto que la misma ejercía por si misma sobre las células epiteliales. El tratamiento de NETs con heparina no modificó su capacidad de

inducir la secreción de IL-6 por las células epiteliales, indicando que las histonas no fueron las responsables del efecto inmunoestimulador sobre células epiteliales (Figura 30). La heparina tampoco moduló la secreción de IL-6 por estas células.

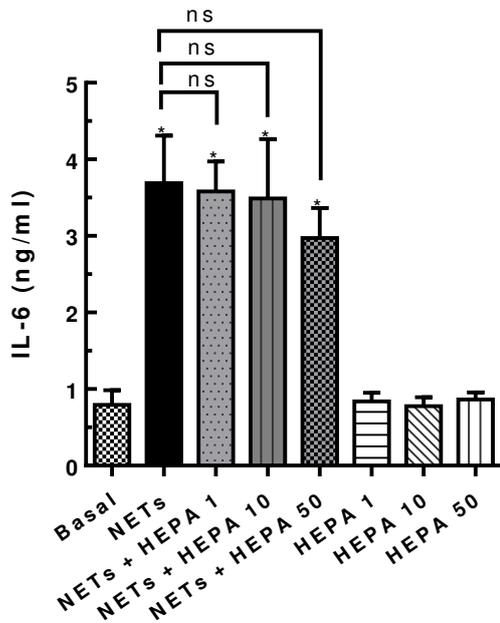


Figura 30. Las histonas de las NETs no son las responsables de su efecto inmunoestimulador sobre las células epiteliales. Las células A549 fueron cultivadas con NETs, con NETs tratadas con 1, 10 o 50 U/ml de heparina, con heparina sola (1, 10 o 50 U/ml) o con vehículo (Basal) por 18 hs a 37°C. Luego se obtuvieron los sobrenadantes y se determinó la concentración de IL-6 por ELISA. Los datos representan la media \pm SEM de 4 experimentos realizados por triplicado. Anova de dos factores con medidas repetidas con post test de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto al basal. ns: No significativo

A continuación, se evaluó el efecto del tratamiento térmico de las NETs sobre sus propiedades estimuladoras. Para ello se calentó a las mismas por 30 minutos a 70°C y se las empleó para estimular a las células A549 durante 18 horas. El tratamiento con calor prácticamente eliminó la capacidad inmunoestimuladora de las NETs (Figura 31), sugiriendo que algún componente proteico sensible al calor sería responsable de la estimulación de la secreción de citoquinas por las células epiteliales.

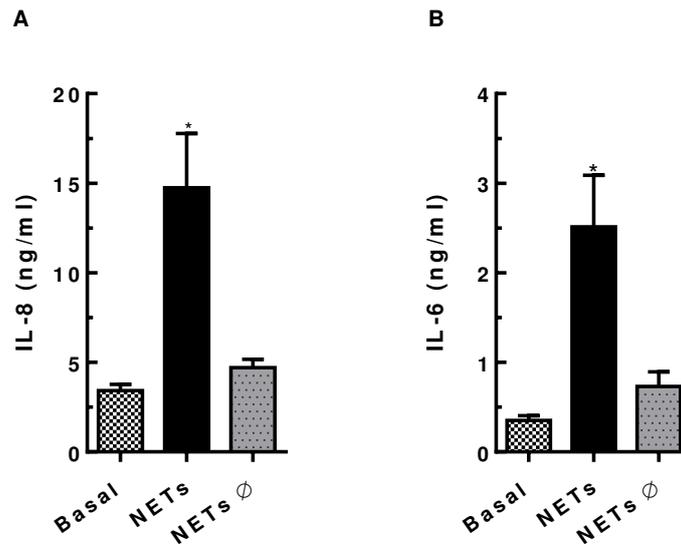


Figura 31. El calentamiento de las NETs elimina su capacidad estimuladora sobre células epiteliales A549. Las células A549 fueron cultivadas por 18 hs a 37°C con vehículo, NETs, o con NETs tratadas previamente a 70°C por 30 minutos. Luego se determinó la concentración de IL-8 (A) e IL-6 (B) en los sobrenadantes por ELISA. Los datos representan la media \pm SEM de 9 (IL-8) y 4 (IL-6) experimentos realizados por triplicado. Anova de dos factores con medidas repetidas con post test de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto al basal.

La elastasa es una serinoproteasa altamente catiónica que se encuentra asociada en grandes cantidades a las NETs. Estudios previos demostraron que esta enzima es capaz de estimular a células epiteliales a producir citoquinas y en consecuencia, a inducir inflamación pulmonar (Bergin et al. 2008, Walsh et al. 2001). Para determinar si la elastasa contenida en las NETs era responsable de los efectos proinflamatorios observados en las células epiteliales, se trató a las NETs, una vez obtenidas con un inhibidor de elastasa y se evaluó su capacidad de estimular a las células epiteliales A549. Sin embargo, la inhibición de la elastasa no afectó la capacidad estimuladora de las NETs, indicando que esta proteína, asociada al ADN de las NETs, no era la responsable del efecto observado (Figura 32).

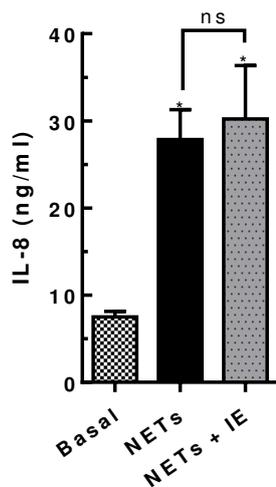


Figura 32. La elastasa presente en las NETs no es la responsable del efecto estimulador sobre las células epiteliales. Las células A549 fueron incubadas con NETs, con NETs tratadas con el inhibidor de elastasa o con vehículo durante 18 hs a 37°C. Luego se determinó la concentración de IL-8 por ELISA. Los datos representan la media \pm SEM de 5 experimentos realizados por triplicado. Anova de dos factores con medidas repetidas con post test de Bonferroni. * $p < 0.05$. ns: No significativo.

Estudios previos reportaron que la proteína nuclear de alta movilidad de grupo 1 (HMGB1) funciona como PMAD, induciendo la secreción de citoquinas proinflamatorias cuando es liberada al medio extracelular. La HMGB1 es una proteína cuya presencia ha sido reportada en las NETs (Magna & Pisetsky 2014). Por ello, en primer lugar se realizaron experimentos para confirmar que en nuestras manos esta alarmina también estuviera presente en nuestras preparaciones de NETs. Mediante el uso de un anticuerpo monoclonal específico contra esta proteína, se corroboró su colocalización con el ADN mediante microscopía confocal (Figura 33).

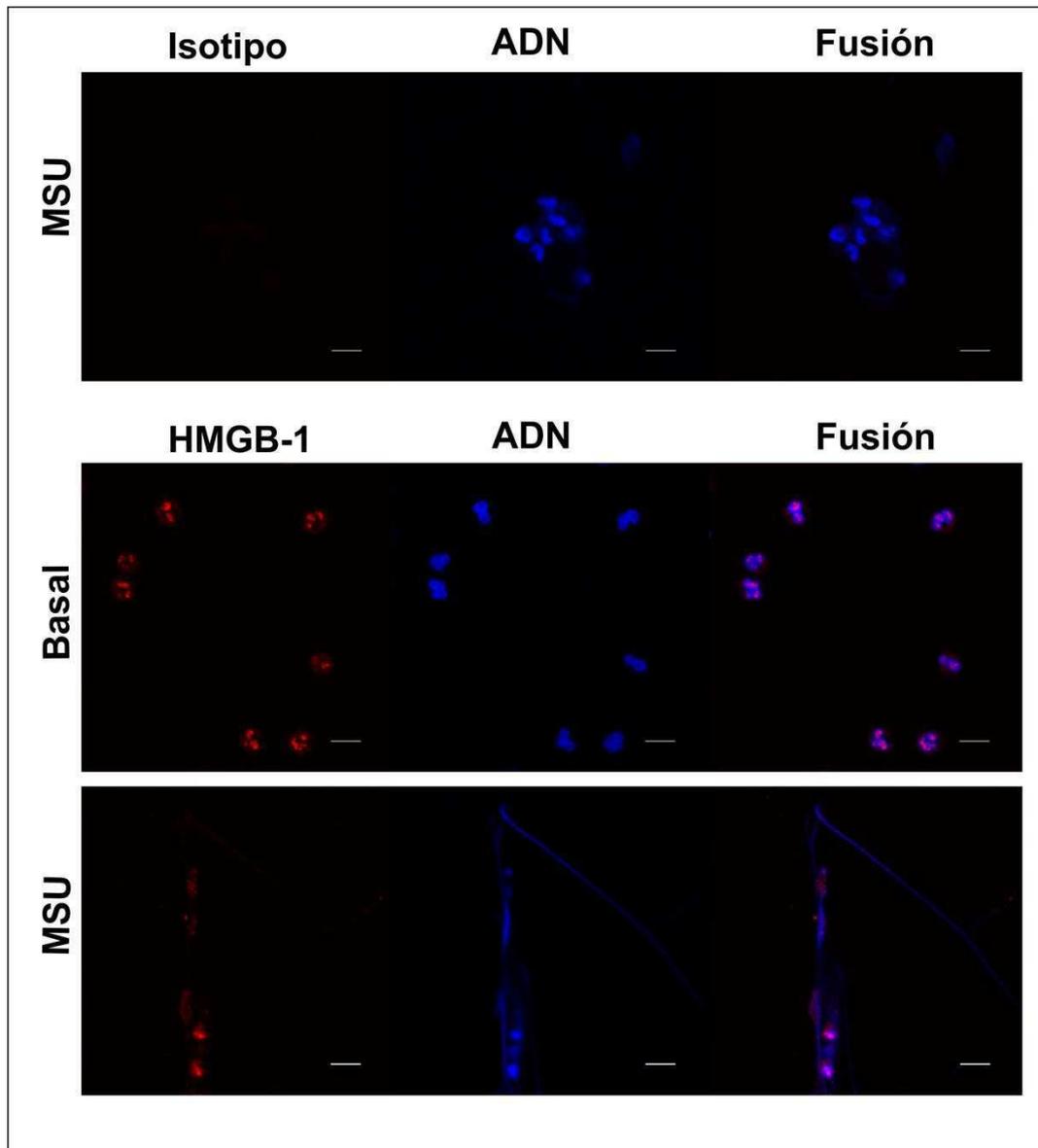


Figura 33. La proteína HMGB1 se encuentra en las NETs inducidas por MSU. Los neutrófilos fueron estimulados con MSU o vehículo (basal) durante 4 h at 37°C y luego fueron inmunomarcados con un anticuerpo anti-HMGB1 (rojo) o el anticuerpo control de isotipo correspondiente e Ioduro de propidio para visualizar al ADN (azul). Las muestras fueron analizadas por microscopía confocal. Las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes. La barra equivale a 10 μ m.

Luego, se evaluó el rol de HMGB1 en las propiedades inmunomodulatorias de las NETs sobre células epiteliales. Para este fin, una vez aisladas, las NETs fueron incubadas con un anticuerpo bloqueante antiHMGB1 y luego se evaluó su efecto sobre las células A549. Como control se incubó a las NETs con un anticuerpo con el isotipo correspondiente. Asimismo se verificó que ninguno de los anticuerpos ejerciese un efecto por sí mismo sobre las células epiteliales. El

tratamiento de las NETs con el anticuerpo neutralizante de HMGB1 inhibió significativamente el incremento de la secreción de IL-6 e IL-8 inducido por las NETs, en contraste al anticuerpo control de isotipo que no ejerció efectos significativos (Figura 34). Estos resultados sugieren que la proteína HMGB1 es un componente relevante responsable del efecto estimulador de las NETs en la secreción de citoquinas proinflamatorias por las células epiteliales pulmonares.

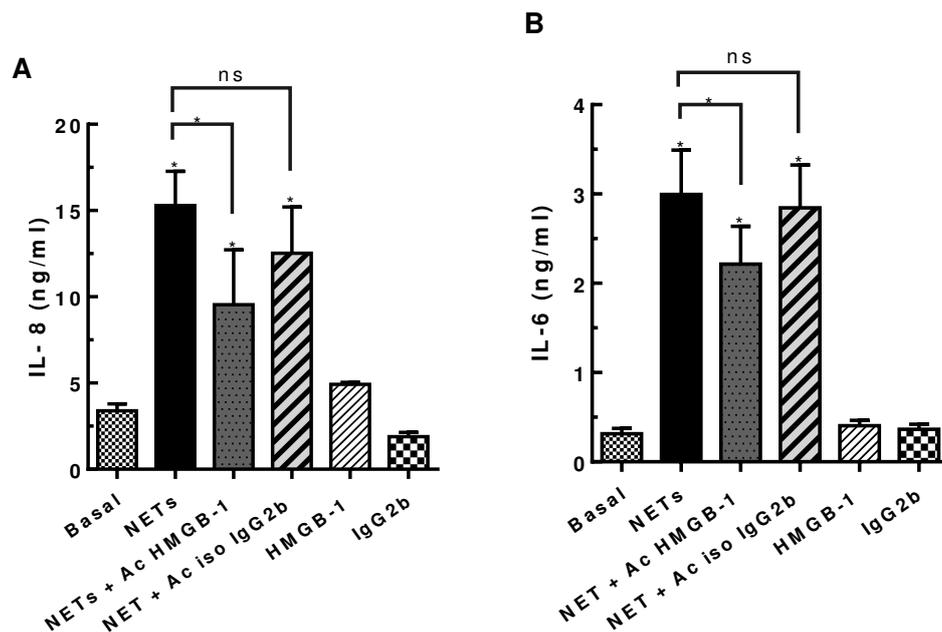


Figura 34. La proteína HMGB1 es responsable del efecto inmunoestimulador de las NETs sobre las células epiteliales. Las células A549 fueron estimuladas con NETs, con NETs incubadas con el anticuerpo bloqueante antiHMGB1 (20 µg/ml), con NETs incubadas con un anticuerpo IgG2b control de isotipo (20 µg/ml), con el anticuerpo antiHMGB1 (20 µg/ml), con el control de isotipo (20 µg/ml) o con vehículo (Basal) durante 18 hs a 37°C. Luego se determinó la concentración de IL-8 (A) e IL-6 (B) por ELISA. Los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos realizados por triplicado. Anova de dos factores con medidas repetidas con post test de Bonferroni. * $p < 0.05$. ns: No significativo.

Capítulo 2: Impacto de las NETs sobre células dendríticas y macrófagos

Las NETs estimulan la secreción de IL-8 por macrófagos humanos.

A fin de determinar si los efectos estimulatorios de las NETs sobre la secreción de citoquinas eran específicos para las células epiteliales, se evaluó su impacto sobre otros tipos celulares. En primer lugar se estudió su efecto sobre macrófagos humanos diferenciados de monocitos de sangre periférica. Para ello, se cultivó a los macrófagos con NETs inducidas por MSU o con vehículo durante 18 horas a 37°C. Las NETs indujeron un incremento significativo de la secreción de IL-8 por macrófagos, respecto de la determinada en la condición basal. Los neutrófilos no estimulados también indujeron la secreción de IL-8, siendo la alcanzada por las NETs significativamente mayor. Asimismo, para corroborar que el efecto observado se debiese a las NETs, se inhibió la NETosis con el inhibidor de elastasa y luego se utilizaron estos sobrenadantes para estimular a los macrófagos. Los sobrenadantes de cultivo de macrófagos que fueron expuestos a sobrenadantes de neutrófilos estimulados con MSU en presencia de IE, exhibieron niveles de IL-8 similares a los obtenidos con neutrófilos no estimulados. A su vez se evaluó el efecto del IE sobre los macrófagos para descartar potenciales efectos. El inhibidor por sí mismo no estimuló la secreción de IL-8. En conjunto, estos hallazgos indicaron que las NETs son las responsables del incremento en la secreción de IL-8 por los macrófagos. En el caso de IL-6, la estimulación ejercida por las NETs no fue significativamente distinta a la ejercida por los sobrenadantes provenientes de neutrófilos no estimulados (Figura 35).

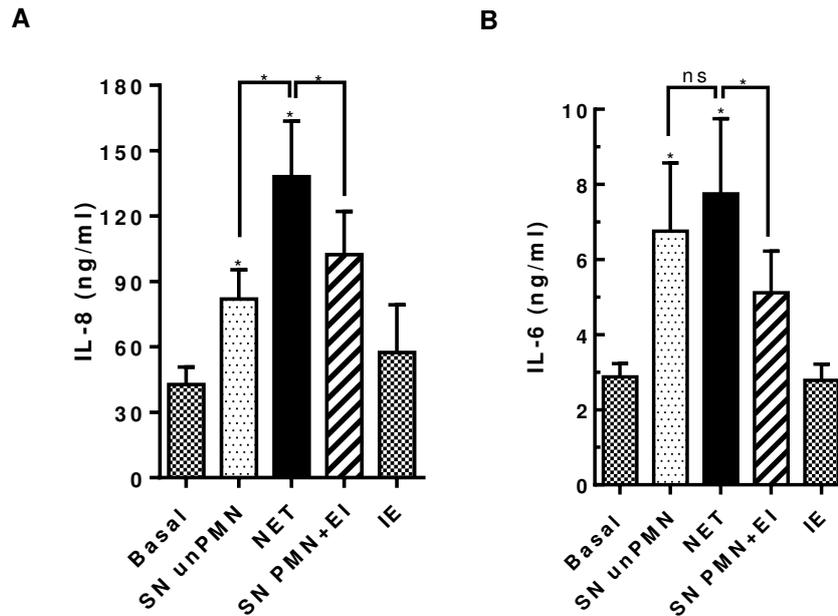


Figura 35. Las NETs estimularon la secreción de IL-8 por macrófagos humanos derivados de monocitos. Los macrófagos obtenidos por diferenciación con M-CSF a partir de monocitos, fueron cultivados por 18 hs. a 37°C con NETs, vehículo o sobrenadantes provenientes de neutrófilos estimulados con MSU en presencia del inhibidor de elastasa. Luego se colectaron los sobrenadantes y se determinaron las concentraciones de IL-6 (A) e IL-8 (B) por ELISA. Los datos representan la media \pm SEM de 4 experimentos realizados por triplicado. Anova de dos factores con medidas repetidas con post test de Bonferroni. * $p < 0.05$. ns: No significativo

Las NETs no estimulan la secreción de citoquinas por células dendríticas humanas derivadas de monocitos.

De modo similar, se estudió el impacto de las NETs sobre células dendríticas humanas derivadas de monocitos (CD). Para ello, se incubaron las células dendríticas con NETs inducidas con MSU, con sobrenadante de neutrófilos no estimulados o con vehículo durante 18 horas a 37°C. Como control positivo de activación se utilizó LPS. Los resultados indicaron que las NETs, al igual que el sobrenadante de neutrófilos no estimulados, no indujeron la secreción de IL-6 e IL-8 por encima de los niveles basales (Figura 36). El LPS por sí mismo fue capaz de estimular la secreción de ambas citoquinas, indicando que la ausencia de respuesta a la estimulación con NETs no se debió a una incapacidad de las células de responder a la estimulación. Con el objeto de determinar si las NETs eran capaces de modular la respuesta

de citoquinas inducida por el LPS, se realizaron ensayos adicionales en los que se estimuló a las CD con LPS en ausencia o presencia de NETs o de sobrenadante de neutrófilos no estimulados. Las NETs incrementaron significativamente la secreción de IL-8 y disminuyeron la secreción de IL-6 inducidas por LPS. Sin embargo, este efecto no fue diferente del ejercido por los sobrenadantes de neutrófilos no estimulados cultivados en presencia de LPS, sugiriendo que no son las NETs las responsables de la modulación observada (Figura 36).

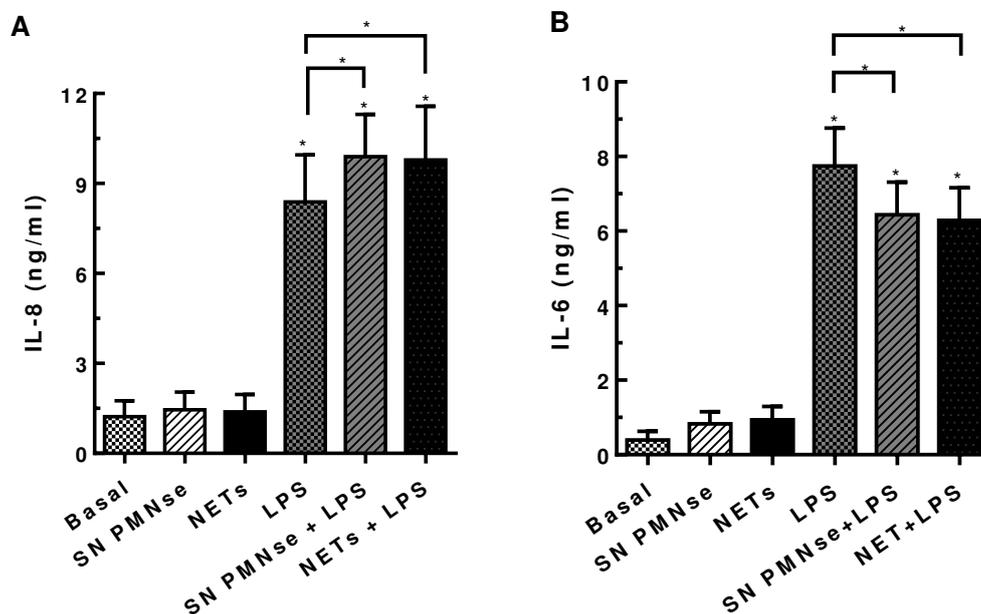


Figura 36. Las NETs no indujeron la secreción de IL-6 ni de IL-8 por CD humanas pero modularon levemente aquella inducida por LPS. Células dendríticas diferenciadas de monocitos fueron cultivadas con sobrenadantes de neutrófilos no estimulados (SN PMNse), con NETs, o con vehículo (Basal), en presencia o ausencia de LPS (150 ng/ml) durante 18 hs. a 37°C. Luego se recolectaron los sobrenadantes y en ellos se determinaron las concentraciones de IL-6 e IL-8 por ELISA. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos realizados por triplicado. Anova de dos factores con medidas repetidas con post test de Bonferroni. * $p < 0.05$.

Asimismo se analizó la producción de IL-10 por CD estimuladas con NETs en presencia o ausencia de LPS obteniéndose los mismos resultados que para IL-8 (Figura 37).

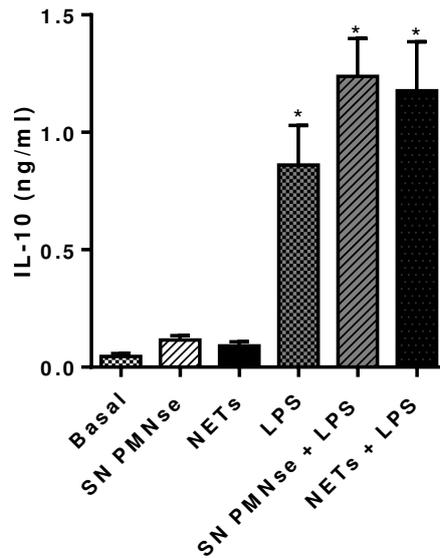


Figura 37. Las NETs no indujeron la secreción de IL10 por CD humanas. Células dendríticas diferenciadas de monocitos fueron cultivadas con sobrenadantes de neutrófilos no estimulados (SN PMNse), con NETs, o con vehículo (Basal) en presencia o ausencia de LPS (150 ng/ml) durante 18 hs. a 37°C. Luego se recolectaron los sobrenadantes y en ellos se determinó la concentración de IL-10 por ELISA. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos realizados por triplicado. Anova de dos factores con medidas repetidas con post test de Bonferroni. * $p < 0.05$.

En experimentos adicionales también se evaluó si las NETs presentaban la capacidad de inducir la maduración de las CD, determinada en función de su habilidad para inducir la expresión de los marcadores HLA-DR, CD86 y HLA-ABC. Para ello se cultivó a las CD con NETs inducidas con MSU, con sobrenadante de neutrófilos no estimulados, con vehículo o con LPS (control positivo) por 18 horas a 37°C. Luego se analizó la expresión de los marcadores mencionados por citometría de flujo. No se observaron diferencias significativas en la expresión de ninguno de los marcadores de activación respecto de la determinada en CD cultivadas con el sobrenadante de neutrófilos no estimulados o por CD no tratadas (Basal) (Figura 38). Estos resultados indicaron que las NETs no inducen por sí mismas la maduración de las CD.

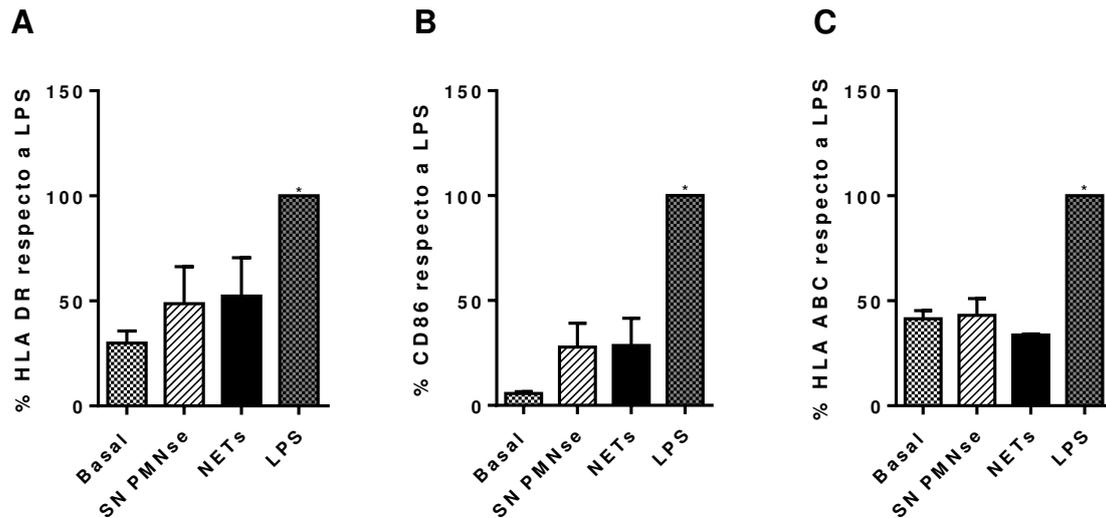


Figura 38. Las NETs no indujeron la maduración de células dendríticas. Las CD fueron cultivadas con sobrenadantes de neutrófilos no estimulados (SN PMNse), con NETs, con LPS (150 ng/ml) o con vehículo (Basal) durante 18 hs. a 37°C. Luego se inmunomarcaron con anticuerpos específicos de HLA-DR (A), CD86 (B) y HLA-ABC (C) y se analizaron por citometría de flujo. Debido a la diferencia de expresión basal de estos marcadores entre los distintos dadores de células dendríticas, se utilizó como control positivo de activación al LPS y todos los valores obtenidos fueron relativizados respecto a la expresión con LPS como la media \pm SEM de 4 (A), 5 (B) y 3 (C) experimentos. Anova de dos factores con post test de Bonferroni. * $p < 0.05$.

Además se evaluó la viabilidad de las células dendríticas expuestas a los sobrenadantes de neutrófilos no estimulados o a NETs. No se observaron diferencias en la incorporación del colorante 7-AAD entre el control (Basal) y ambos tratamientos. De igual modo que con las células epiteliales, las NETs no afectaron la viabilidad de las células dendríticas (Figura 39).

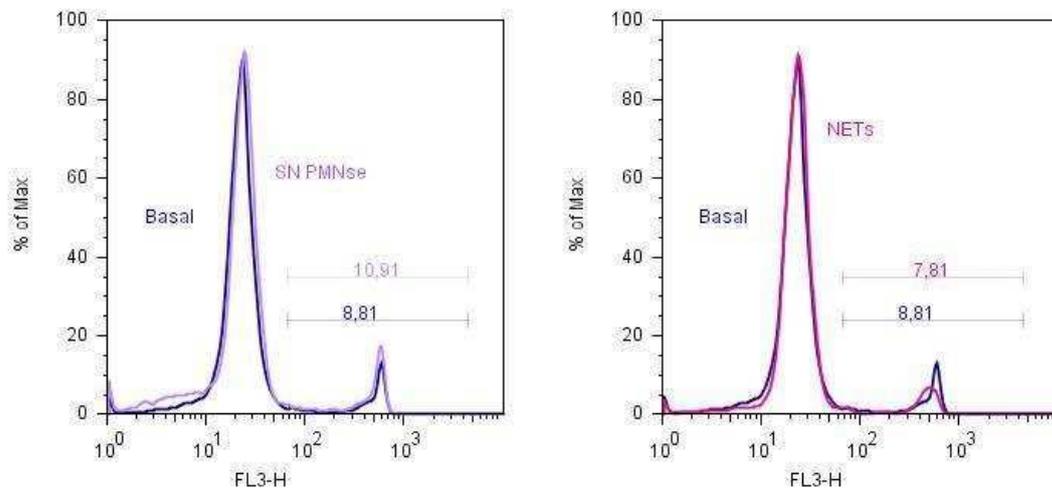


Figura 39. Las NETs no afectaron la viabilidad de CD humanas. Las células dendríticas fueron cultivadas con vehículo (Basal), sobrenadantes de neutrófilos no estimulados (SN PMNse) o con NETs durante 18 hs. a 37°C. Luego se tiñeron con el colorante 7-AAD y se analizaron por citometría de flujo. Se muestra un experimento representativo de 4 experimentos independientes.

Estos datos, en su conjunto, sugieren que la capacidad estimuladora de las NETs estaría restringida a ciertos tipos celulares.

Discusión

En el presente trabajo de tesis se determinó que las NETs pueden poseer propiedades inmunomoduladoras sobre otros tipos celulares. Los resultados obtenidos indicaron que las NETs producidas en respuesta a MSU incrementaron la secreción de citoquinas proinflamatorias tanto en células epiteliales alveolares como bronquiales humanas. Asimismo incrementaron la secreción de IL-8 por macrófagos humanos, no observándose estos efectos sobre células dendríticas humanas.

Otro aspecto relevante de este estudio fue determinar no sólo que un DAMP como los cristales de MSU podrían también promover respuestas proinflamatorias a través de la generación de NETs, sino además que este estímulo resulta adecuado para ser empleado en estudios sobre el rol inmunomodulatorio de las NETs. Este hallazgo cobra importancia teniendo en cuenta que el PMA, el estímulo más utilizado en literatura para la inducción de NETosis, de acuerdo a nuestros estudios no puede ser eliminado de las NETs aun cuando los neutrófilos sean exhaustivamente lavados antes de liberarlas. Estos hallazgos implican que parte de los efectos que han sido adjudicados en algunos estudios a las NETs podrían no corresponder a las mismas sino al PMA residual presente en las preparaciones de NETs (Saffarzadeh et al. 2012). Nuestros estudios, por el contrario, demostraron que el MSU puede ser eliminado del medio extracelular antes de que las NETs sean liberadas y que sólo permanecen en la preparación pequeñas cantidades que corresponden a los cristales fagocitados (Figura 7). Aun cuando estas pequeñas cantidades podrían luego formar parte de las NETs en caso de que esos neutrófilos sufrieran NETosis, también es posible determinar el impacto de los cristales per sé sobre la células blanco a estudiar. Es por ello que las NETs inducidas por MSU constituyen, además, una herramienta apropiada para analizar la capacidad de las NETs de ejercer efectos sobre otros tipos celulares. Los resultados de este

trabajo, permitieron corroborar que los cristales de MSU son potentes inductores de NETosis, demostrando también que este estímulo posee mayor eficacia para inducir la liberación de NETs que otros descriptos en literatura como el LPS o la GO (Fuchs et al. 2007).

En este estudio, las NETs producidas en respuesta a MSU incrementaron significativamente la producción de IL-6 e IL-8 en células epiteliales más allá de los niveles inducidos por los sobrenadantes de los neutrófilos muertos por necrosis inducida por calor, indicando que los componentes solubles intracelulares liberados durante la necrosis no producen el mismo efecto que las NETs. Esto podría deberse a que los componentes celulares se liberen diferencialmente dependiendo el tipo de muerte celular. Algunas proteínas podrían no ser liberadas durante la necrosis o no estar tan accesibles como puede ocurrir en la NETosis.

Por otra parte, si bien los sobrenadantes de neutrófilos no estimulados indujeron la secreción de citoquinas, este efecto fue significativamente menor que el ejercido por las NETs. Esta estimulación podría ser consecuencia de algún factor soluble liberado por los neutrófilos en su estado basal, como podrían ser las bajas concentraciones de IL-8 que, como demostramos, son secretadas por los neutrófilos luego de las 4 hs de cultivo, ya que se ha reportado que esta quimiocina es un agonista de células epiteliales (Bautista et al. 2009). Cuando los neutrófilos fueron estimulados con MSU en presencia de inhibidores de la NETosis (DPI y el inhibidor de elastasa), como era de esperar no se liberaron NETs al sobrenadante. Por ello, nuestros hallazgos indicando que sobrenadantes de neutrófilos estimulados con MSU en presencia de estos inhibidores estimularon la secreción de citoquinas por células epiteliales en niveles similares a los sobrenadantes provenientes de neutrófilos no estimulados, sugieren que las NETs constituyen el componente estimulador en los sobrenadantes de neutrófilos estimulados con MSU. Dado que la IL-6 es una potente citoquina proinflamatoria, y que tanto

la IL-8 como el CCL-2 (MCP-1) tienen la capacidad de estimular el reclutamiento de neutrófilos y monocitos, nuestros resultados indican que las NETs ejercen efectos proinflamatorios a través de la estimulación de las células de epitelio respiratorio.

Este estudio también estableció que las NETs inducidas por MSU no afectan la viabilidad de las células A549, BEAS-2B o 16HBE14o-. A juzgar por los resultados obtenidos por microscopía, por medición de la resistencia eléctrica transmembrana y por la permeabilidad a dextrán-FITC, las NETs tampoco afectan la integridad y la estabilidad de la monocapa epitelial. Estas observaciones contrastan con las halladas por Saffarzadeh y colaboradores (Saffarzadeh et al. 2012), quienes reportaron efectos citotóxicos de las NETs en las líneas epiteliales humanas HPAEC y A549 y en las células epiteliales murinas MLE-12 y AT-II. Estas diferencias podrían deberse tanto a que este estudio empleó NETs inducidas por PMA, agonista que como se ha detallado anteriormente, permanece en las preparaciones de NETs y podría ser responsable de parte de los efectos atribuidos a las NETs, así como al procedimiento metodológico empleado para su aislamiento.

Las NETs inducidas por MSU podrían formarse en numerosos escenarios a nivel pulmonar. El ácido úrico es generado en forma continua intracelularmente por degradación de las purinas y alcanza altas concentraciones, las cuales pueden aún incrementarse cuando la célula muere y degrada su ADN y ARN (Kono et al. 2010). Estudios previos indicaron que el ácido úrico es liberado de las células pulmonares probablemente como una consecuencia de su injuria y necrosis (Gasse et al. 2009). Cuando el ácido úrico se encuentra a concentraciones elevadas, precipita y forma cristales que causan inflamación (Mayor et al. 2006). Basándose en estos hechos, Gasse y colaboradores hipotetizaron que los cristales de ácido úrico se forman en los sitios de injuria. Estos autores indujeron inflamación pulmonar en un modelo murino de

fibrosis mediante la administración intranasal de Bleomicina, observando que la misma es mediada por el ácido úrico. Las concentraciones de ácido úrico se hallaron aumentadas en el pulmón, en donde además se observó un incremento en el reclutamiento de neutrófilos. Los estudios determinaron que la administración exógena de cristales de ácido úrico en las vías aéreas activa al inflammasoma NALP3, la producción de IL1 beta, e induce eventos que recapitulan la inflamación pulmonar inducida por Bleomicina. Sobre la base de este reporte, es posible hipotetizar que en este tipo de escenarios en los que el daño tisular conduzca a incrementar las concentraciones locales de ácido úrico a nivel pulmonar, la formación de cristales de MSU y el consecuente reclutamiento de neutrófilos, se formarán NETs en respuesta al MSU. De hecho, tanto niveles locales incrementados de ácido úrico como la presencia de NETs han sido documentados en la injuria pulmonar aguda (ALI). Esta patología se caracteriza por la acumulación de neutrófilos en el pulmón y se acompaña de edema intersticial y una respuesta inflamatoria intensa (Kuipers et al. 2012). Los neutrófilos infiltran rápidamente el parénquima pulmonar y se ha demostrado que su depleción reduce el edema pulmonar y la producción de citoquinas pro inflamatorias (Abraham et al. 2000). Se ha descrito que varios factores presentes en los pulmones durante el ALI tienen el potencial de inducir la NETosis (Zawrotniak & Rapala-Kozik 2013) (Figura 40). De hecho, en la patología inducida por transfusión, las NETs fueron detectadas en la microcirculación en secciones pulmonares de pacientes. Las NETs fueron también encontradas en modelos de ALI inducidos por infecciones por virus influenza, por bacterias, por LPS y por hongos (Cheng & Palaniyar 2013). En procesos infecciosos, la muerte celular también conduce a la liberación de ácido úrico (Crane & Mongiardo 2014) y a la formación de NETs (Crane et al. 2016). Es posible que las NETs producidas en respuesta a MSU estimulen tanto al epitelio pulmonar como a los macrófagos del tejido a secretar citoquinas que promoverán el desarrollo de inflamación, no sólo en

situaciones de daño estéril (ALI inducido por transfusión o por aspiración del contenido gástrico, por ejemplo) sino también en el ALI inducido por infecciones.

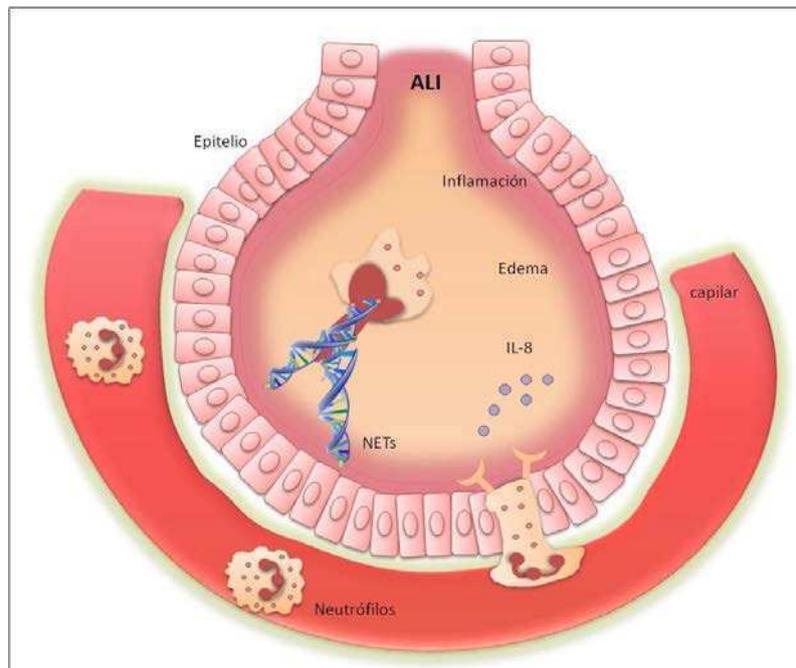


Figura 40. Injuria pulmonar aguda

En un modelo murino de injuria pulmonar inducida por ventilación mecánica (VILI, del acrónimo en inglés *ventilator-induced lung injury*) se detectaron niveles elevados de ácido úrico en los fluidos del lavado bronquioalveolar (Kuipers et al. 2012). También se hallaron incrementados los niveles de IL-1 β , IL-6 y KC en los homogenatos pulmonares. En otro modelo de VILI, Yildiz y colaboradores demostraron que la ventilación mecánica junto con instilación de LPS induce la formación de NETs (Yildiz et al. 2015), así como un incremento en los niveles de HMGB1, IL-1 β y un leve aumento de CCL-2 e IL-6. Los autores demostraron que la instilación endotraqueal de DNasa I redujo el contenido de ADN y Histona H3 citrulinada (marcadores de NETs), pero no tuvo un impacto significativo en distintas medidas de injuria pulmonar ni en el nivel de citoquinas en el fluido de lavado bronquioalveolar, concluyendo que las NETs no juegan un rol principal en la patogenia de este modelo (Yildiz et al. 2015). Sin

embargo, los resultados de nuestros estudios indicaron que el tratamiento de las NETs inducidas por MSU con MNasa, no reduce su capacidad estimuladora de citoquinas, sugiriendo que este parámetro no es suficiente para descartar un rol patogénico de las NETs. Asimismo nuestros hallazgos podrían explicar por qué las estrategias terapéuticas que emplean DNasas para reducir la inflamación pulmonar asociada a las NETs no resultan efectivas (Ratjen & Grasermann 2012).

De acuerdo con nuestros resultados, en cambio, el bloqueo de HMGB1 con un anticuerpo monoclonal específico atenúa la respuesta inflamatoria epitelial inducida por las NETs, sugiriendo que este componente es responsable, al menos en parte, del efecto observado. El hecho de que el tratamiento con MNasa no redujera la capacidad inductora de citoquinas de las NETs, sugiere que HMGB1 es activa aun cuando se disocie del ADN al que se encontraba unida. Sin embargo, no existen reportes que indiquen que HMGB1 sea liberada de los neutrófilos luego de la activación celular como ocurre en monocitos, macrófagos y células dendríticas. De modo que es de esperar que en un contexto inflamatorio, la HMGB1 liberada por neutrófilos se encuentre asociada a NETs y sólo sea liberada por acción de nucleasas extracelulares. Querini y colaboradores demostraron que a diferencia de lo que ocurre en células HELA muertas por necrosis, la proteína HMGB1 no es liberada por neutrófilos necróticos (Rovere-Querini et al. 2004). Los autores determinaron que los sobrenadantes de los neutrófilos muertos por necrosis no contienen HMGB1 debido a que luego de esta muerte la proteína queda asociada a una fracción insoluble. Estas observaciones permiten explicar las razones por las que en nuestros ensayos, los sobrenadantes de neutrófilos necróticos no estimularon la secreción de citoquinas por las células epiteliales como lo hicieron las NETs.

Se ha descrito que dependiendo de la isoforma de HMGB1 que es liberada, puede cumplir distintas funciones. En la apoptosis tardía o necrosis secundaria de distintos tipos celulares, se puede liberar una forma oxidada no inflamatoria. Durante la necrosis se libera una isoforma completamente reducida que es proinflamatoria. Sin embargo, se desconoce el estado de oxidación de la HMGB1 liberada en la NETosis (Magna & Pisetsky 2014). Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la isoforma liberada asociada a las NETs producidas en respuesta a MSU podría ser proinflamatoria, ya que al ser bloqueada con anticuerpos específicos se reduce la secreción de citoquinas proinflamatorias por las células epiteliales.

En estudios previos se observó que en las células epiteliales pulmonares la proteína HMGB1 asociada a ADN puede ser reconocida por el receptor RAGE (Sims et al. 2010). Este receptor se expresa tanto en epitelio bronquial como en células alveolares (Fehrenbach et al. 1998, Katsuoka et al. 1997) y su expresión se halló incrementada en patologías como la fibrosis pulmonar y el ALI (Englert et al. 2011). Es posible especular que la HMGB1 asociada a las NETs estimule a las células epiteliales a secretar citoquinas al interactuar con este receptor.

A su vez, en otros estudios se ha descrito que la proteína HMGB1 por sí misma es capaz de inducir NETosis. Tadie y colaboradores describieron, en un modelo de injuria pulmonar, que neutrófilos murinos aislados de lavados bronquioalveolares expuestos a HMGB1 y LPS liberaron mayor cantidad de NETs con relación a los expuestos únicamente a LPS. Además los ratones tratados con un anticuerpo bloqueante de HMGB1 presentaron menor cantidad de citoquinas pro-inflamatorias, y NETs en los lavados bronquioalveolares (Tadie et al. 2013). Estos hallazgos, en conjunto con nuestros resultados sugieren que la HMGB1 asociada a las

NETs no sólo podría ejercer una actividad proinflamatoria por sí misma, sino que también podría contribuir a exacerbar la inflamación estimulando la producción de nuevas NETs.

La fibrosis quística es una enfermedad hereditaria causada por una mutación del gen CFTR que provoca una distribución anormal de transportadores de Cl⁻ en células epiteliales de las vías aéreas causando deshidratación de la capa de líquido periciliar e impidiendo el drenaje de mucinas (Dwyer et al. 2014). Los pacientes con fibrosis quística exhiben en las vías aéreas elevados niveles de moco que obstruyen el flujo de aire. La acumulación de moco facilita la colonización del órgano por patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosas*. En este contexto, se ha detectado ADN en exceso en el moco de pacientes con esta patología, que se correlaciona con una concentración elevada de neutrófilos y con la presencia de NETs en los pulmones (Dwyer et al. 2014). De hecho, las NETs fueron identificadas en los fluidos aéreos de estos pacientes por microscopía confocal, de fuerza atómica y microscopía electrónica de scanning (Manzenreiter et al. 2012, Marcos et al. 2010). Sin embargo, este exceso de NETs no logra eliminar a los patógenos, sugiriendo que éstos poseen adaptaciones que les permiten evadirlas. Se ha descrito que *S. aureus* tiene la habilidad de degradar las NETs e incluso inhibir la actividad de proteasas específicas. De modo que, aun cuando las NETs evitan la diseminación de los patógenos, no son capaces de eliminarlos (Bosmann & Ward 2014). Por el contrario, nuestros resultados indicando que las NETs estimulan la secreción de citoquinas proinflamatorias por células epiteliales, sugieren que las NETs podrían contribuir a exacerbar la inflamación en los pulmones de pacientes con fibrosis quística. Por otra parte, en los lavados bronquioalveolares de pacientes con esta patología se han encontrado niveles elevados de HMGB1 (Entezari et al. 2012). Una estrategia terapéutica utilizada en pacientes con fibrosis quística moderada a severa, es la utilización de DNasa humana recombinante aerosolizada (rhDNasa) para la reducción de la mucosidad (Shak

et al. 1990). Se ha demostrado que la degradación de ADN como terapia, por medio de la administración de DNasas, resulta eficaz para reducir la viscosidad del esputo, mejorar la función pulmonar y reducir el número de exacerbaciones pulmonares. Sin embargo esto no resulta suficiente para resolver la patología, ya que no logra controlar la infiltración neutrofílica (Ratjen & Grasmann 2012). Bossman y colaboradores postularon que esto podría contribuir al daño pulmonar infringido por las diversas proteínas asociadas a las NETs, que podrían generar inflamación, aunque expresaron que aún no hay estudios suficientes que permitan aseverar estas hipótesis (Bosmann & Ward 2014). Esta hipótesis resulta consistente con nuestros resultados indicando que el tratamiento de las NETs con Mnsa no inhibe su capacidad de estimular la secreción de IL-6 o IL-8 por las células epiteliales. Nuestros hallazgos sugieren que otras estrategias terapéuticas que limiten la NETosis o bloqueen los efectos de HMGB1 podrían ser considerados para disminuir la injuria y la inflamación pulmonar en la fibrosis quística. De hecho, estudios previos han demostrado que en modelos murinos de esta patología, los niveles de HMGB1 en el lavado bronquioalveolar se hallan incrementados, y que la inhibición de esta proteína contribuye a la eliminación bacteriana y protege contra la neumonía por *Pseudomonas aeruginosa*. La administración de un anticuerpo específico neutralizante de HMGB1 en ratones infectados inhibió la inflamación neutrofílica y redujo la injuria pulmonar (Entezari et al. 2012). Nuestros resultados demostrando la capacidad proinflamatoria de la HMGB1 asociada a las NETs están en concordancia con estos hallazgos. Si bien las NETs poseen propiedades antimicrobianas ventajosas, su producción exacerbada o su inadecuada remoción pueden tener consecuencias patológicas (Ratjen & Grasmann 2012). Sin embargo, todavía no hay evidencia suficiente respecto al mecanismo de remoción de NETs en el contexto de esta enfermedad (Gray et al. 2015). Nuestros resultados también indicaron que las NETs producidas en respuesta a MSU ejercen efectos proinflamatorios sobre los

macrófagos al estimular la producción de IL-8. Estos efectos podrían contribuir al cuadro inflamatorio observado en esta patología.

Nuestros resultados indicaron además que el efecto proinflamatorio de las NETs inducidas por MSU es también ejercido sobre macrófagos pero no así sobre células dendríticas. Este último hallazgo es consistente con resultados reportados previamente con NETs inducidas por el ionóforo de calcio A23187 (Barrientos et al. 2014), en los que se describe que las NETs tampoco inducen la secreción de citoquinas por células dendríticas derivadas de monocitos. En este trabajo, al igual que lo observado en nuestro estudio con NETs inducidas por MSU, las NETs generadas en respuesta a A23187 no modularon por sí mismas la expresión de distintas moléculas de superficie como HLA-DR, CD40, o CD86, ni resultaron proapoptóticas o citotóxicas para las células dendríticas. Por otra parte, en el estudio de Barrientos et al. tampoco se observó que las NETs por sí mismas modularan la producción de citoquinas, pero se determinó que si fueron capaces de modular aquella inducida por LPS. Los autores describieron que las NETs en combinación con LPS produjeron menores niveles de IL-10, IL-6 e IL-8 respecto de los producidos en respuesta a LPS. En nuestros estudios, también observamos una disminución de la producción de IL-6 cuando las NETs fueron combinadas con LPS, sin embargo, esta disminución no fue diferente de la detectada cuando los sobrenadantes de neutrófilos no estimulados fueron combinados con LPS. Esta condición no fue analizada por Barrientos y colaboradores, por lo que no es posible descartar que los efectos que ellos reportaron sean debidos a otros componentes distintos a las NETs, liberados al medio por los neutrófilos.

Nuestros resultados indicaron que las NETs inducidas por MSU son capaces de estimular por sí mismas la secreción de citoquinas proinflamatorias por células epiteliales pulmonares y por

macrófagos derivados de monocitos. Es posible que las NETs inducidas por otros estímulos presentes en sitios de injuria pulmonar ejerzan efectos similares. Sin embargo, estudio previos demostraron diferencias en el potencial proinflamatorio de las NETs sobre macrófagos. Las NETs generadas en respuesta al patógeno *M. tuberculosis*, estimularon la producción de IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-10 por los macrófagos que las fagocitaron (Braian et al. 2013), mientras no ocurrió lo mismo cuando los macrófagos incorporaron NETs inducidas por PMA (Farrera & Fadeel 2013). De modo que es necesario realizar más investigaciones para determinar si las NETs de distinto origen difieren en su potencial proinflamatorio sobre células epiteliales.

Por todo lo expuesto anteriormente, la evidencia disponible sugiere que las NETs, podrían tener un rol relevante en numerosos escenarios patológicos como ALI, VILI y CF. Los resultados de este trabajo de tesis nos permiten hipotetizar que en todos estos escenarios patológicos, el MSU generado luego del daño tisular podría inducir el reclutamiento de neutrófilos, los cuáles podrían producir NETs en respuesta al MSU. Las mismas estimularían a células epiteliales pulmonares y a macrófagos intersticiales y alveolares, a producir IL-8 y CCL-2, quimiocinas que mediarían el reclutamiento de un mayor número de neutrófilos y monocitos al pulmón, exacerbando el cuadro inflamatorio. Asimismo la IL-6 liberada por el epitelio pulmonar en respuesta a las NETs contribuiría a incrementar la inflamación (Figura 41). Nuestros hallazgos también sugieren que tanto la inhibición de la NETosis como el bloqueo selectivo de HMGB1 podrían constituir herramientas para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para mitigar la inflamación que acompaña a estas patologías.

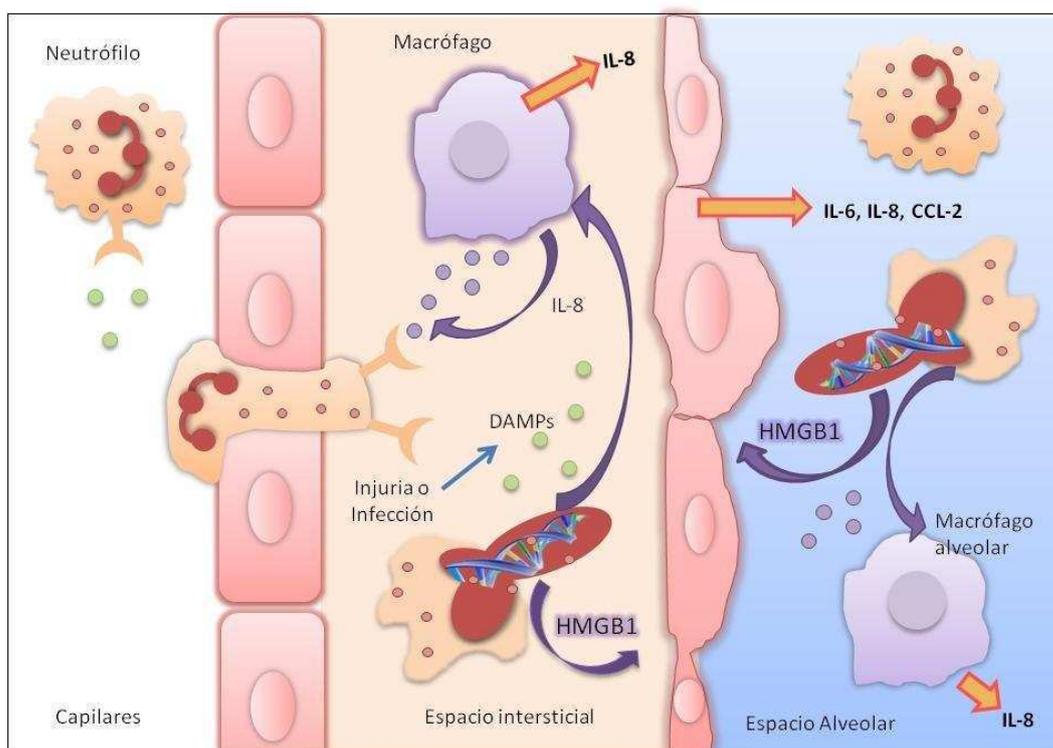


Figura 41. Modelo planteado para explicar el efecto inmunomodulador de las NETs inducidas por MSU sobre el epitelio pulmonar.

Conclusiones

En el presente trabajo se observó que:

- Las NETs inducidas por MSU incrementaron marcadamente la secreción de IL-6 e IL-8 por células epiteliales alveolares (A549) y bronquiales BEAS-2B respecto a su secreción basal. Las NETs también incrementaron la secreción de IL-8 hacia la cara apical por células epiteliales 16HBE14o⁻ polarizadas.
- El incremento en la secreción de citoquinas inducido por las NETs fue significativamente mayor al alcanzado por los sobrenadantes de neutrófilos no estimulados o a los sobrenadantes de neutrófilos necróticos.
- El efecto estimulador de las NETs sobre las células A549 fue dependiente de su concentración.
- Los cristales de MSU no estimularon por si mismos la secreción de citoquinas por células epiteliales A549.
- Los inhibidores de la NETosis DPI e IE revirtieron el efecto estimulador de citoquinas de sobrenadantes de neutrófilos estimulados con MSU a niveles similares a los observados con los sobrenadantes de neutrófilos no estimulados. Estos hallazgos indicaron que las NETs eran las responsables del efecto estimulador observado tanto en las células A549 como en las BEAS-2B.
- Las NETs presentaron una capacidad estimuladora similar a la exhibida por algunos agonistas de TLRs tanto respecto de la inducción de las citoquinas IL-6 e IL-8 así como de la quimiocina CCL-2. Además la estimulación conjunta de las células epiteliales con NETs y LPS ejerció un efecto aditivo sobre la secreción de IL-6 respecto a la inducida por ambos estímulos individualmente.

- Las NETs no afectaron la viabilidad ni la morfología de las células epiteliales A549 y BEAS-2B. Tampoco afectaron la viabilidad, ni afectaron la integridad de la monocapa de células epiteliales 16HBE14o⁻ polarizadas.
- El calentamiento de las NETs eliminó su capacidad estimuladora sobre células epiteliales A549.
- Ni el ADN de las NETs, ni sus histonas, ni la elastasa fueron los responsable del efecto estimulador ejercido sobre las células epiteliales.
- La proteína HMGB1 fue identificada en las NETs inducidas por MSU. El empleo de un anticuerpo bloqueante específico para esta proteína disminuyó el efecto estimulador sobre la secreción de IL-8 en las células A549, indicando que esta proteína es responsable, al menos en parte, del efecto observado.
- Las NETs estimularon la secreción de IL-8 por macrófagos humanos derivados de monocitos.
- Las NETs no indujeron por sí mismas la secreción de IL-6 ni de IL-8 ni de IL-10 por CD humanas pero modularon levemente aquella inducida por LPS, aunque dicha modulación no fue diferente de la ejercida por el sobrenadante de neutrófilos no estimulados. Las NETs tampoco indujeron la maduración de células dendríticas ni afectaron su viabilidad.

En conjunto, los resultados de esta tesis indican que las NETs inducidas por MSU ejercen efectos proinflamatorios en células epiteliales alveolares (A549), en células epiteliales bronquiales (BEAS-2B y 16HBE14o⁻) y en macrófagos humanos, pero no en CD. Estos efectos proinflamatorios ejercidos por las NETs podrían contribuir *in vivo* al reclutamiento de neutrófilos y a la perpetuación de la inflamación y al daño del tejido pulmonar.

Lic. Florencia Sabbione

Dra. Analía Trevani

Referencias

- A L Cozens, M J Yezzi, K Kunzelmann, T Ohrui, L Chin, K Eng, W E Finkbeiner, J H Widdicombe, and D.C.G., 1994. CFTR Expression and Chloride Secretion in Polarized Immortal Human Bronchial Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*, 10, pp.38–47.
- Abraham, E. et al., 2000. Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 279(6), pp.L1137–L1145.
- Akira, S. & Takeda, K., 2004. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology*, 4(7), pp.499–511.
- Amulic, B. et al., 2012. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu Rev Immunol*, 30, pp.459–89.
- Arai, Y. et al., 2014. Uric acid induces NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(2), pp.556–561.
- Banchereau, J. et al., 2000. Immunobiology of Dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 18, pp.767–811.
- Barrientos, L. et al., 2014. Neutrophil Extracellular Traps Downregulate Lipopolysaccharide-Induced Activation of Monocyte-Derived Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 193(11), pp.5689–5698.
- Bautista, M. V et al., 2009. IL-8 regulates mucin gene expression at the posttranscriptional level in lung epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(3), pp.2159–66.
- Bergin, D., Greene, C. & Sterchi, E., 2008. Activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) by a novel metalloprotease pathway. *Journal of Biological chemistry*. 283, 31736–31744.
- Boe, D.M. et al., 2015. Extracellular traps and macrophages: new roles for the versatile phagocyte. *Journal of Leukocyte Biology*, 97.
- Bosmann, M. & Ward, P. a, 2014. Protein-based therapies for acute lung injury: targeting neutrophil extracellular traps. *Expert opinion on therapeutic targets*, 18(6), pp.703–14.
- Braian, C., Hoge, V. & Stendahl, O., 2013. Mycobacterium tuberculosis- induced neutrophil extracellular traps activate human macrophages. *Journal of innate immunity*, 5(6), pp.591–602.
- Brill, a. et al., 2012. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10(1), pp.136–144.

- Bryan G Yipp, Björn Petri, Davide Salina, Craig N Jenne, Brittney N V Scott, Lori D Zbytniuk, Keir Pittman, Muhammad Asaduzzaman, Kaiyu Wu, H Christopher Meijndert, Stephen E Malawista, Anne de Boisfleury Chevance, Kunyan Zhang, J.C.& P.K., 2012. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature Medicine*, 18(9), pp.1386–1395.
- Cheng, Olivia Z and Palaniyar, N., 2013. NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases. *Frontiers in Immunology*, 4, pp.1–13.
- Cools-Lartigue, J. et al., 2013. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *The Journal of clinical investigation*, 123(8), pp.3446–3458.
- Crane, J.K., Broome, J.E. & Lis, A., 2016. Biological Activities of Uric Acid in Infection due to Enteropathogenic and Shiga-toxigenic Escherichia coli. *Infection and immunity*, pp.IAI.01389–15.
- Crane, J.K. & Mongiardo, K.M., 2014. Pro-inflammatory effects of uric acid in the gastrointestinal tract. *Immunological Investigations*.
- Dey, A., Allen, J. & Hankey-Giblin, P.A., 2014. Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: blood monocytes versus tissue macrophages. *Frontiers in immunology*, 5, p.683.
- Dwyer, M. et al., 2014. Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor. *Journal of innate immunity*, 6(6), pp.765–79.
- Englert, J.M. et al., 2011. Paradoxical function for the receptor for advanced glycation end products in mouse models of pulmonary fibrosis. *International journal of clinical and experimental pathology*, 4(3), pp.241–54.
- Entezari, M. et al., 2012. Inhibition of High-Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1) Enhances Bacterial Clearance and Protects against Pseudomonas Aeruginosa Pneumonia in Cystic Fibrosis. *Molecular Medicine*, pp.477–485.
- F. Pilszczek, D. Salina, K. Poon, C. Fahey, B.Yipp, C. Sibley, S. Robbins, F. Green, M. Surette, M. Sugai, M. Bowden, M. Hussain, K. Zhang, and P.K., 2010. A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus. *The Journal of Immunology*, 185, pp.7413–7425.
- Farrera, C. & Fadeel, B., 2013. Macrophage Clearance of Neutrophil Extracellular Traps Is a Silent Process. *The Journal of Immunology*, 191(5), pp.2647–2656.
- Fehrenbach, H. et al., 1998. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) exhibits highly differential cellular and subcellular localisation in rat and human lung. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 44(7), pp.1147–57.

- Fialkow, L., Wang, Y. & Downey, G.P., 2007. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(2), pp.153–164.
- Fuchs, T. a et al., 2010. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(36), pp.15880–15885.
- Fuchs, T. a. et al., 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, 176(2), pp.231–241.
- Gabelloni, M.L. et al., 2013. NADPH oxidase derived reactive oxygen species are involved in human neutrophil IL-1 β secretion but not in inflammasome activation. *European Journal of Immunology*, 43(12), pp.3324–3335.
- Gasse, P. et al., 2009. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 179(10), pp.903–13.
- Giard, D.J. et al., 1973. In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors. *J Natl Cancer Inst*, 51(5), pp.1417–1423.
- Gray, R., McCullagh, B. & McCray, P., 2015. NETs and CF Lung Disease: Current Status and Future Prospects. *Antibiotics*, 4(1), pp.62–75.
- Grommes, J. & Soehnlein, O., 2011. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 17(3-4), pp.293–307.
- Headland, S.E. & Norling, L. V., 2015. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Seminars in Immunology*.
- Hoeffel, G. et al., 2015. Anatomy of a Discovery: M1 and M2 Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 5(1), pp.1–10.
- Hoeffel, G. & Ginhoux, F., 2015. Ontogeny of tissue-resident macrophages. *Frontiers in Immunology*. 6, 1-13.
- Iwasaki, A. & Medzhitov, R., 2015. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, 16(4), pp.343–353.
- Jaillon, S. et al., 2007. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *The Journal of experimental medicine*, 204(4), pp.793–804.
- Kaplan, M.J. & Radic, M., 2012. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(6), pp.2689–95.

- Katsuoka, F. et al., 1997. Type II alveolar epithelial cells in lung express receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene. *Biochemical and biophysical research communications*, 238(2), pp.512–6.
- Ke, Y. et al., 1988. Human bronchial epithelial cells with integrated SV40 virus T antigen genes retain the ability to undergo squamous differentiation. *Differentiation*, 38(1), pp.60–66.
- Kono, H. et al., 2012. The IL-1-dependent sterile inflammatory response has a substantial caspase-1-independent component that requires cathepsin C. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(7), pp.3734–40.
- Kono, H. et al., 2010. Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice. *The Journal of clinical investigation*, 120(6), pp.1939–49.
- Kono, H., Onda, A. & Yanagida, T., 2014a. Molecular determinants of sterile inflammation. *Current Opinion in Immunology*, 26(1), pp.147–156.
- Kono, H., Onda, A. & Yanagida, T., 2014b. Molecular determinants of sterile inflammation. *Current opinion in immunology*, 26, pp.147–56.
- Kruger, P. et al., 2015. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLOS Pathogens*, 11(3), p.e1004651.
- Kuipers, M.T. et al., 2012. Pre-Treatment with Allopurinol or Uricase Attenuates Barrier Dysfunction but Not Inflammation during Murine Ventilator-Induced Lung Injury. *PLoS ONE*, 7(11).
- Kuipers, M.T. et al., 2012. Pre-treatment with allopurinol or uricase attenuates barrier dysfunction but not inflammation during murine ventilator-induced lung injury. *PLoS one*, 7(11), p.e50559.
- Lamkanfi, M. & Dixit, V.M., 2009. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunological reviews*, 227(1), pp.95–105.
- Lauber, K. et al., 2003. Apoptotic Cells Induce Migration of Phagocytes via Caspase-3-Mediated Release of a Lipid Attraction Signal. *Cell*, 113(6), pp.717–730.
- Lee, W.L., Harrison, R.E. & Grinstein, S., 2003. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection*, 5(14), pp.1299–1306.
- Leffler, J. et al., 2012. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188(7), pp.3522–31.
- León, B. & Ardavín, C., 2008. Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunology and cell biology*, 86(4), pp.320–324.

- Magna, M. & Pisetsky, D., 2014. The Role of HMGB1 in the Pathogenesis of Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Molecular Medicine*, 20(1), p.138:146.
- Manzenreiter, R. et al., 2012. Ultrastructural characterization of cystic fibrosis sputum using atomic force and scanning electron microscopy. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 11(2), pp.84–92.
- Marcos, V. et al., 2010. CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nature medicine*, 16(9), pp.1018–23.
- Martinon, F. et al., 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, 440(7081), pp.237–41.
- Matzinger, P., 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology*, 12, pp.991–1045.
- Mayer-Scholl, A., Averhoff, P. & Zychlinsky, A., 2004. How do neutrophils and pathogens interact? *Current opinion in microbiology*, 7(1), pp.62–6.
- Mayor, A. et al., 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the. *Letters to Nature*, 440(March), pp.237–241.
- Medzhitov, R., 2001. TOLL-LIKE RECEPTORS AND INNATE IMMUNITY. *Nature reviews. Immunology*, 1(November), p.135:145.
- Medzhitov, R. & Janeway, C.A., 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology*, 9(1), pp.4–9.
- Mills, C.D., 2015. Anatomy of a Discovery: M1 and M2 Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 6(May), pp.1–12.
- Mitroulis, I. et al., 2011. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 β and autophagy-related signaling in gout. *PloS one*, 6(12), p.e29318.
- Muir, A. et al., 2004. Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 30(6), pp.777–83.
- Papayannopoulos, V., Metzler, K.D., et al., 2010. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, 191(3), pp.677–691.
- Papayannopoulos, V., Metzler, K.D., et al., 2010. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology*, 191(3), pp.677–91.
- Parker, D. & Prince, A., 2011. Innate immunity in the respiratory epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 45(2), pp.189–201.

- Parker, H. et al., 2012. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *Journal of Leukocyte Biology*, 92(4), pp.841–849.
- Pinegin, B., Vorobjeva, N. & Pinegin, V., 2015. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*, 14(7), pp.633–40.
- Pittman, K. & Kubes, P., 2013. Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. *Journal of Innate Immunity*, 5(4), pp.315–323.
- Ratjen, F. & Grasemann, H., 2012. New Therapies in Cystic Fibrosis. *Current Pharmaceutical Design*. 18 (5), 614-627.
- Rock, K.L. et al., 2010. The sterile inflammatory response. *Annual review of immunology*, 28, pp.321–342.
- Rovere-Querini, P. et al., 2004. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO reports*, 5(8), pp.825–30.
- Saffarzadeh, M., Juenemann, C., Queisser, M. a., et al., 2012. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: A predominant role of histones. *PLoS ONE*, 7(2).
- Saffarzadeh, M., Juenemann, C., Queisser, M.A., et al., 2012. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS one*, 7(2), p.e32366.
- Sallusto, F. & Lanzavecchia, A., 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine*, 179(4), pp.1109–18.
- Schorn, C. et al., 2012. Bonding the foe - NETting neutrophils immobilize the pro-inflammatory monosodium urate crystals. *Frontiers in Immunology*, 3(DEC), pp.1–6.
- Segura, E. & Amigorena, S., 2013. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends in immunology*, 34(9), pp.440–5.
- Shak, S. et al., 1990. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(23), pp.9188–9192.
- Shi, Y., Evans, J.E. & Rock, K.L., 2003. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*, 425(6957), pp.516–21.
- Shi, Y., Mucsi, A.D. & Ng, G., 2010. Monosodium urate crystals in inflammation and immunity. *Immunological reviews*, 233(1), pp.203–17.

- Sims, G.P. et al., 2010. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annual review of immunology*, 28, pp.367–88.
- Steinman, R.M. & Idoyaga, J., 2010. Features of the dendritic cell lineage. *Immunological reviews*, 234(1), pp.5–17.
- Stephen R. Clark, Adrienne C., Samantha A. Tavener, Braedon McDonald, Zahra Goodarzi, Margaret M. Kelly, Kamala D. Patel, Subhadeep Chakrabarti, Erin McAvoy, Gary D. Sinclair, Elizabeth M Keys, Emma Allen-Vercoe, Rebekah DeVinney, Christopher J Doig, F.H.Y.G. & P.K., 2007. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature medicine*, 13(4), pp.463–469.
- Stout, R.D. & Suttles, J., 2004. Functional plasticity of macrophages : reversible adaptation to changing microenvironments. 76(September), pp.509–513.
- Summers, C. et al., 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in immunology*, 31(8), pp.318–24.
- Tadie, J.-M. et al., 2013. HMGB1 promotes neutrophil extracellular trap formation through interactions with Toll-like receptor 4. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 304(5), pp.L342–9.
- Takeuchi, O. & Akira, S., 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140(6), pp.805–820.
- Urban, C.F. et al., 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*, 5(10).
- Vorobjeva, N. V & Pinegin, B. V, 2014. Neutrophil Extracellular Traps : Mechanisms of Formation and Role in Health and Disease. *Biochemistry*, 79(12), pp.1286–1296.
- Walsh, D.E. et al., 2001. Interleukin-8 up-regulation by neutrophil elastase is mediated by MyD88/IRAK/TRAF-6 in human bronchial epithelium. *The Journal of biological chemistry*, 276(38), pp.35494–9.
- Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S. a., et al., 2009. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *Journal of Cell Biology*, 184(2), pp.205–213.
- Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S.A., et al., 2009. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *The Journal of cell biology*, 184(2), pp.205–13.
- Xiao, T.S. & Fitzgerald, K.A., 2013. The cGAS-STING pathway for DNA sensing. *Molecular cell*, 51(2), pp.135–9.

- Yildiz, C. et al., 2015. Mechanical ventilation induces neutrophil extracellular trap formation. *Anesthesiology*, 122(4), pp.864–75.
- Yipp, B.G. et al., 2012. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature Medicine*, 18(9), pp.1386–1393.
- Yipp, B.G. & Kubes, P., 2013. NETosis: how vital is it? *Blood*, 122(16), pp.2784–94.
- Zawrotniak, M. & Rapala-Kozik, M., 2013. Neutrophil extracellular traps (NETs) - Formation and implications. *Acta Biochimica Polonica*, 60(3), pp.277–284.
- Zhu, J. & Paul, W.E., 2010. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunological reviews*, 238(1), pp.247–62.

Los resultados de esta tesis forman parte de un manuscrito enviado para su publicación titulado *Neutrophil extracellular traps induced by monosodium urate crystals stimulate proinflammatory responses in human airway epithelial cells*. Florencia Sabbione, Irene A Keitelman, Leonardo J Iula, Mariana Ferrero, Mirta N Giordano, Pablo Baldi, Martín Rumbo, Carolina Jancic, Analia Trevani.