



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

**“Respuesta del polimorfonuclear neutrófilo  
frente a la viabilidad bacteriana y su relación  
con el ARN procariota”**

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

**Lic. Nahuel Emiliano Rodríguez Rodríguez**

Directora de Tesis: Dra. Gabriela C. Fernandez

Consejera de estudios: Dra. Laura Alché

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología de los Procesos Inflamatorios -  
Instituto de Medicina Experimental (IMEX) – CONICET. Academia Nacional  
de Medicina de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2019

Fecha de defensa: 11 de Septiembre de 2019

## **“Respuesta del polimorfonuclear neutrófilo frente a la viabilidad bacteriana y su relación con el ARN procariota”**

**Palabras clave:** viabilidad bacteriana - *Escherichia coli* - neutrófilo – ARN procariota - endotelio

### **Resumen**

Los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) son la primera línea celular de defensa antibacteriana del organismo. Son capaces de detectar patógenos a través del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns) por medio de receptores tales como los receptores de tipo Toll (TLR, Toll-like receptors). Algunos de estos TLRs y otros receptores reconocen moléculas asociadas a la viabilidad bacteriana (denominadas vita-PAMPs). En este sentido, el ARN mensajero procariota ha sido reportado como un vita-PAMP. El objetivo de este estudio fue investigar si los PMN son capaces de censar la viabilidad bacteriana y evaluar si la presencia de ARN procariota es necesaria y suficiente para inducir una activación de los PMN y una consiguiente respuesta bactericida. Para ello, se evaluaron diferentes parámetros funcionales en PMN humanos purificados usando *Escherichia coli* viva (Ec) y Ec muerta por calor (MC-Ec), observándose que la viabilidad bacteriana es indispensable para inducir la quimiotaxis, la activación (aumento de tamaño y de la molécula de superficie CD11b) y las funciones bactericidas (estallido respiratorio y formación de trampas extracelulares de PMN o NETosis) en PMN. Por otro lado, el ARN procariota total purificado de Ec (ARNp) provocó respuestas similares a las observadas con las bacterias vivas. Estos hallazgos se relacionaron a la ausencia de ARNp dentro de la bacteria muerta y su liberación al sobrenadante durante el proceso de muerte, explicando la falta de respuesta de los PMN frente a las MC-Ec.

Dada la relevancia que existe entre la interacción de los PMN y el endotelio en la resolución de infecciones, cuando evaluamos la capacidad del ARNp de activar directamente células endoteliales encontramos un

aumento en la expresión de la molécula CD54 (ICAM-1) y una importante secreción de IL-8. Estos efectos fueron asociados con un aumento en la quimiotaxis, adhesión y trans migración de los PMN en respuesta al endotelio tratado.

En conclusión, nuestros resultados indican que tanto el PMN como el endotelio son capaces de reconocer ARNp, una molécula asociada a la viabilidad bacteriana. Este reconocimiento dispara mecanismos de activación en ambos tipos celulares que modulan su inter-relación favoreciendo la adhesión de los PMN al endotelio, su trans migración, y gatillando luego mecanismos bactericidas que, en un contexto fisiológico, contribuirían a la resolución de un foco infeccioso.

## **“Neutrophil polymorphonuclear response to bacterial viability and its relationship with prokaryotic RNA”**

**Keywords:** bacterial viability - *Escherichia coli* - neutrophil – Prokaryotic RNA- endothelium

### **Abstract**

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) are the first cellular line of anti-bacterial host defense. They sense pathogens through recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by receptors, such as Toll-like receptors (TLRs). Some of these TLRs and other receptors recognize molecules associated with bacterial viability (called vita-PAMPs). Moreover, prokaryotic messenger RNA has been characterized as a vita-PAMP. Thus, the objective of this study was to investigate whether PMNs are capable of sensing bacterial viability and assess whether the presence of prokaryotic RNA is necessary and sufficient to induce PMN activation and a consequent bactericidal response. For this purpose, different functional parameters in isolated human PMN were evaluated using live *Escherichia coli* (Ec) and heat killed Ec (HK-Ec). We found that bacterial viability is indispensable to induce chemotaxis, activation (increase in cell size and CD11b up-regulation) and bactericidal functions (respiratory burst and neutrophil extracellular traps formation or NETosis) in PMN. Additionally, when total prokaryotic RNA of Ec (pRNA) was purified and used as a stimulus for PMN, we observed that pRNA caused similar responses to those observed with live bacteria. These findings were related to the absence of pRNA within dead bacteria and its release to the supernatant during the dying process, explaining the lack of response of PMN towards HK-Ec.

Moreover, given the relevance that exists between the interaction of PMN and the endothelium in the resolution of infections, we also evaluated whether pRNA was able to directly activate endothelial cells, and whether this results in the modulation of PMN-endothelial cell interaction. We found that pRNA was able to increase the expression of CD54 (ICAM-1) and

induced an important IL-8 secretion from endothelial cells. These effects were associated with an increase in chemotaxis, adhesion and transmigration of PMN in response to pRNA treated-endothelium.

In conclusion, our results indicate that both PMN and endothelial cells are able to recognize pRNA, a molecule associated with bacterial viability. This recognition triggers mechanisms of activation in both cell types that modulate their inter-relation favoring PMN-endothelium adhesion and transmigration, and triggering bactericidal mechanisms in PMN that, in a physiological context, would contribute to the resolution of an infectious focus.

## AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que me acompañaron durante este hermoso camino y no hay nada más gratificante para mí que dedicarles unas pocas líneas para expresar mis sentimientos hacia ellos.

En primer lugar, quiero agradecer a mi grupo y **equipo** de trabajo. A mi directora Gaby Fernandez (aunque es la única Gaby del laboratorio el diminutivo viene inexorablemente en compañía del apellido) por haber confiado en mí y darme confianza a mí mismo para encarar este proyecto, por su predisposición para enseñar, su confianza para darme libertad a la hora de tomar decisiones en la mesada y por ser la gran responsable de haber formado este grupo humano hermoso, que es sin dudas alguna, el mejor resultado que se gestó.

A Vero, por darme las herramientas e ideas para manejarme en la mesada con su altruismo que la caracteriza, pero por sobre todas las cosas por sacarme tantas risas y sonrisas en innumerables charlas y almuerzos que quedan para siempre en mis mejores recuerdos.

A Dai, Luis y Fede, por ayudarme inmensamente en cada experimento, por reírnos frente a cada fracaso y por todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.

Quiero agradecer también a Paula Barrionuevo, Ayelén, Pablo, Marina y Aldana. que con sus importantes aportes contribuyeron en parte a la producción de esta Tesis. Pero por sobre todo les quiero agradecer a todos ellos, junto con todo el grupo de Inmuno 1, por haber compartido el día a día durante mi paso por el laboratorio.

De todos ustedes me llevo el mejor de los recuerdos y un agradecimiento infinito.

A mi familia por haber estado siempre, en esta etapa y en todas. A mis amores: Sonia y Lupe.

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>BREVE INTRODUCCIÓN HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
1. Generalidades.....	5
2. El sistema vascular.....	5
3. Las células endoteliales (CE).....	6
3.1. Funciones homeostáticas e inflamatorias de las CE.....	7
4. Neutrófilos (PMN).....	10
4.1. Reclutamiento de PMN a un foco infeccioso: Interacción PMN-CE.....	11
4.2. Movilización de vesículas secretoras en los PMN.....	13
4.3. Reconocimiento del patógeno mediado por receptores celulares....	14
4.4. Mecanismos microbicidas del PMN.....	16
4.4.1. Mecanismos microbicidas dependientes del oxígeno.....	17
4.4.2. Mecanismos microbicidas independientes del oxígeno.....	17
4.4.2.1. Fagocitosis.....	17
4.4.2.2. Netosis.....	18
5. Vita-PAMPs: Importancia de la viabilidad bacteriana en la respuesta....	19
6. Composición y estructura del ARN bacteriano.....	19
7. Reconocimiento de ARN bacteriano por el sistema inmune innato.....	20
7.1 Receptores de ARN presentes en PMN.....	21
7.2 Receptores de ARN presentes en CE.....	21
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>23</b>
1. Aspectos éticos.....	23
2. Muestras de sangre.....	23
3. Obtención de células mononucleares.....	23
4. Aislamiento de neutrófilos polimorfonucleares (PMN).....	23
5. Cultivo de bacterias y tratamientos.....	24
6. Purificación de ARN.....	24
7. Electroforesis en gel de agarosa.....	25
8. Estudios de citometría de flujo.....	26
9. Quimiotaxis.....	26

10. Fagocitosis.....	26
11. Generación de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS).....	27
12. Formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs).....	27
13. Determinación de la actividad enzimática de la elastasa.....	28
14. Inhibición de la Endocitosis.....	28
15. Análisis en sangre entera.....	28
16. Cultivo de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC)...	29
17. Cultivo de células endoteliales HMEC-1.....	29
18. Diseño experimental con células endoteliales.....	29
18.1. Adhesión de PMN a células HUVEC.....	30
18.2. Sistema de Transwell.....	30
19. Análisis Estadísticos.....	31
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>32</b>
1. La viabilidad bacteriana es necesaria para desencadenar respuestas en PMN humanos.....	32
2. La respuesta de los PMN es independiente del crecimiento bacteriano y no es exclusiva para <i>E. coli</i> .....	38
3. La muerte de la bacteria conlleva a la pérdida del contenido de ARN...	41
4. El ARN procariota activa los PMN.....	45
5. Mecanismos implicados en la activación de PMN inducida por el ARNp	53
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>57</b>
1. El ARNp activa a las células endoteliales.....	57
2. Las células endoteliales tratadas con ARNp o sus medios condicionados son capaces de activar PMN.....	60
3. El ARNp es reconocido por las células HUVEC cuando se administra desde el lado basolateral y es capaz de activar PMN.....	63
4. La activación de HUVEC por el ARNp es mediada por NF- $\kappa$ B.....	65
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>67</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>76</b>



---

## ABREVIATURAS

PMN: polimorfonuclear neutrófilo

CE: célula endotelial

HMEC-1: línea de células endoteliales humanas de microvasculatura

HUVEC: cultivo primario de células endoteliales humanas de cordón umbilical

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

Vita-PAMPs: PAMPs asociados a viabilidad

TLR: Toll-like receptor

Ec: *Escherichia coli*

MC-Ec: EC muerta por calor

I-Ec: Ec irradiada

PFA-Ec: Ec fijada con paraformaldehído

Auc-Ec: Ec auxótrofa

Kp: *Klebsiella pneumoniae*

Ef: *Enterococcus faecalis*

UFC: unidades formadoras de colonias

ARNp: ARN procariota

ARNe: ARN eucariota

SN: sobrenadante

CM: medio condicionado

ROS: especies reactivas del oxígeno

DHR: dihidrorrodamina

NETs: trampas extracelulares de neutrófilos

PMX: polimixina B

FSC: *Forward scatter*

SSC: *Size scatter*

IMF: intensidad media de fluorescencia

vWF: factor de von Willebrand

IL-8: interleuquina-8

TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa

ES: error estándar

---

## BREVE INTRODUCCIÓN HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) representan el subconjunto de leucocitos mieloides predominantes en la mayoría de los mamíferos (Nauseef & Borregaard, 2014). Se cree que la vida de estos fagocitos es relativamente corta (6-12 horas) (Basu, Hodgson, Katz, & Dunn, 2002), y si bien valores de vida media mayores han sido reportados (hasta 4-5 días), estos datos son controvertidos (Scott & Min-Ho, 2010).

Frente a un proceso infeccioso en un tejido o frente al daño tisular, los primeros leucocitos en ser reclutados desde la circulación sanguínea son los PMN. En los sitios de inflamación, los PMN ruedan a lo largo del endotelio de las vénulas, recogen las señales inflamatorias, detienen y abandonan el torrente sanguíneo al nivel de las vénulas post-capilares (Marchesi & Florey, 1960). El primer contacto entre PMN y endotelio se conoce como captura o anclaje y está mediado por selectinas y sus contra-receptores (Kansas, 1996).

Los PMN son capaces de detectar a los patógenos a través del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Además de la detección de PAMP, el sistema inmune innato del huésped puede responder a patrones de patogénesis, señales que se derivan de las estrategias que utilizan los patógenos vivos para invadir, manipular, replicar o propagarse entre sus huéspedes (Vance, Isberg, & Portnoy, 2009).

El hecho de que las bacterias estimulen de manera diferente la respuesta inmune dependiendo de la viabilidad es posible, considerando que las vacunas con organismos vivos desencadenan respuestas inmunes más vigorosas que sus contrapartes con microorganismos muertos (Detmer & Glenting, 2006). Además, a menudo se puede conseguir una inmunización protectora con una única inyección de microorganismos vivos, pero no muertos o atenuados. Debido a que los componentes estructurales bacterianos están presentes tanto en los microorganismos vivos como

muertos, es posible que las bacterias muertas carezcan de ciertos componentes importantes para inducir una inmunidad protectora efectiva. En este sentido, se ha demostrado que las células dendríticas murinas derivadas de médula ósea y los macrófagos murinos pueden detectar directamente la viabilidad microbiana mediante la detección de ARNm procariota no poliadenilado presente únicamente en bacterias viables (Sander et al., 2012).

Aunque en PMN humanos se han descrito algunos receptores con la capacidad de reconocer ARN, lo que sugiere que pueden activarse en presencia de ARN, el estudio de la respuesta funcional de los PMN frente al ARN procariota total (ARNp) no ha sido abordado previamente.

En este sentido, de los receptores tipo Toll endosómicos (TLR) que se unen a ácidos nucleicos, los PMN humanos solo expresan TLR8 (Berger et al., 2012; Hayashi et al., 2003; Janke et al., 2009). Además, se ha demostrado que los PMN expresan también los receptores de ARN, RIG-I y MDA-5, tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico. (Tamassia et al., 2008).

Dado estos antecedentes y debido a que el ARN procariota (ARNp) ha sido reportado como un PAMP de viabilidad bacteriana, la **hipótesis** de este trabajo es que los PMN humanos tienen la capacidad de censar la viabilidad bacteriana en función de la presencia o ausencia de ARN procariota, y de esta manera activarse junto con el endotelio y desencadenar respuestas bactericidas.

Por lo tanto, el **objetivo central** de este proyecto es evaluar si la presencia de ARN procariota, es necesaria y suficiente para inducir una activación de los PMN y una consiguiente respuesta bactericida y, por otra parte, analizar el rol de este estímulo bacteriano sobre el endotelio a fin de determinar si favorece o no el reclutamiento y la adhesión de PMN.

A continuación, se definen los objetivos específicos:

### **1- Efecto de la viabilidad bacteriana y el ARN procariota (ARNp) en los neutrófilos (PMN)**

- Evaluar la activación y la generación de respuestas bactericidas de los PMN frente a estímulos bacterianos vivos y muertos.
- Analizar si el tipo de muerte bacteriana tiene incidencia en la respuesta de los PMN.
- Analizar si la replicación bacteriana es necesaria para desencadenar una respuesta en los PMN.
- Evaluar la presencia de ARNp en la bacteria viva y muerta y su liberación al medio extracelular.
- Evaluar el efecto del ARNp directamente sobre los PMN.
- Determinar la capacidad migratoria de los PMN en presencia de ARNp.
- Analizar las características necesarias que debe poseer el ARNp para generar activación en los PMN y para generar respuestas bactericidas.

### **2- Efecto del ARNp sobre un cultivo primario y una línea celular establecida de endotelio humano**

- Determinar la modulación de moléculas de adhesión endotelial por parte del ARNp.
- Determinar la liberación de IL-8, molécula quimioattractante de PMN.
- Evaluar la capacidad migratoria de los PMN frente al medio condicionado de células endoteliales estimuladas con ARNp.
- Analizar la activación de PMN con medio condicionado de células endoteliales estimuladas con ARNp.
- Evaluar la adhesión de PMN al endotelio en presencia de ARNp.

---

# INTRODUCCIÓN

## 1. Generalidades

Los organismos multicelulares se enfrentan al desafío constante de sobrevivir en un entorno que contiene patógenos unicelulares. Los fagocitos han evolucionado como células especializadas que engullen y matan patógenos invasores para proteger al huésped contra microorganismos. En este sentido, el sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa del organismo frente a una infección y, por lo tanto, desempeña un papel crucial en el reconocimiento temprano y en la generación de una respuesta inmune frente a patógenos invasores. El sistema inmune innato está constituido por distintos tipos celulares entre los que se incluyen diversos leucocitos (monocitos, polimorfonucleares neutrófilos y células dendríticas) y células que conforman tejidos que representan la línea de defensa más temprana como los epitelios corporales.

Por otro lado, muchos patógenos, luego de la invasión inicial, deben acceder al sistema vascular para su diseminación o para su transmisión. Las células endoteliales (CE) que recubren los vasos sanguíneos poseen funciones estructurales, pero además son participantes cruciales y activos en la respuesta a patógenos.

En el presente trabajo, nos focalizaremos en describir las principales características de dos células centrales en la respuesta a patógenos, que poseen una estrecha inter-relación, de la cual depende que la eliminación de los patógenos sea exitosa. Nos referimos a una célula central del sistema inmune innato, como son los polimorfonucleares neutrófilos (PMN), y las células principales del sistema vascular, las CE.

## 2. El sistema vascular

El sistema circulatorio en vertebrados consiste en una red de vasos que pueden ser divididos en vasos sanguíneos y linfáticos. El sistema vascular tiene un papel importante en la termorregulación, en el balance de fluidos y proporciona un conducto para el suministro de oxígeno y nutrientes,

y para la eliminación de productos de desecho y dióxido de carbono (Aird, 2007).

La función del sistema linfático es eliminar el líquido intersticial de los tejidos y proporcionar un conducto para el transporte de antígenos, y tráfico de células inmunes desde los tejidos periféricos a los órganos linfoides secundarios. Además, el sistema linfático representa la ruta primaria para la diseminación de los patógenos después de la ruptura inicial de las barreras de la piel o las mucosas. Para los patógenos transmitidos por vectores, el trauma y los anticoagulantes asociados con la alimentación de los insectos puede directamente proporcionar el acceso directo a la sangre (Amino et al., 2006). Por el contrario, para los patógenos que ingresan a sus hospedadores a través de las superficies mucosas en ausencia de un trauma evidente, la participación de los vasos linfáticos para su diseminación es más probable, aunque se ha demostrado que pequeñas rupturas en el intestino o sistemas activos de secreción del mismo patógeno podrían también proporcionar un acceso directo a la sangre en estos casos (Barnes et al., 2006; Spadoni et al., 2015).

### **3. Las células endoteliales (CE)**

Las CE proporcionan una barrera física entre la circulación y los tejidos. Existen aproximadamente 10-60 billones de CE en el cuerpo humano que cubren aproximadamente 4000 m<sup>2</sup> (Aird, 2007). Dado que se encuentran cubriendo los vasos sanguíneos y linfáticos, es probable que sean de las primeras células que interactúen y respondan a los patógenos.

El endotelio se puede clasificar en macrovasculatura, compuesta de arterias y venas, y microvasculatura, que incluye arteriolas, capilares y vénulas. El endotelio macrovascular no está fenestrado (es decir no tiene poros) y su permeabilidad vascular es limitada, mientras que la microvasculatura puede ser continua, fenestrada o discontinua, según el tipo de lecho capilar. El endotelio fenestrado permite el rápido intercambio, captación y secreción de fluidos, solutos y moléculas y está presente en los tejidos involucrados en la filtración y la secreción, como glándulas exocrinas

y endocrinas, glomérulos renales y la mucosa intestinal. El endotelio discontinuo se encuentra en lechos vasculares sinusoidales, como los del hígado y la médula ósea donde la capacidad de las células para entrar y salir fácilmente de la circulación es relevante.(Potente & Mäkinen, 2017)

Las CE de la barrera hematoencefálica (BHE) presenta características únicas, como la estrechez de las uniones intercelulares, la ausencia de fenestración y un nivel reducido de actividad pinocítica, entre otras. Estas características protegen al Sistema Nervioso Central de la entrada de patógenos, moléculas tóxicas y limita el acceso de anticuerpos y células inmunes (Macdonald et al., 2010).

### **3.1. Funciones homeostáticas e inflamatorias de las CE**

Si bien las CE son un componente estructural clave del sistema vascular, también tienen funciones que giran en torno al mantenimiento de la homeostasis inmunológica *versus* a la iniciación y amplificación de la respuesta inflamatoria frente a lesiones vasculares como infecciones o trauma. En condiciones normales las CE poseen mecanismos que actúan para prevenir la inflamación aberrante, como su capacidad para producir prostaglandina I<sub>2</sub> y la expresión constitutiva de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS), que antagonizan el aumento de las moléculas de adhesión mediada por citoquinas e inhiben la agregación plaquetaria (Jaiswal et al.,1992; Olbrych et al., 2002) (**Figura 1A**).

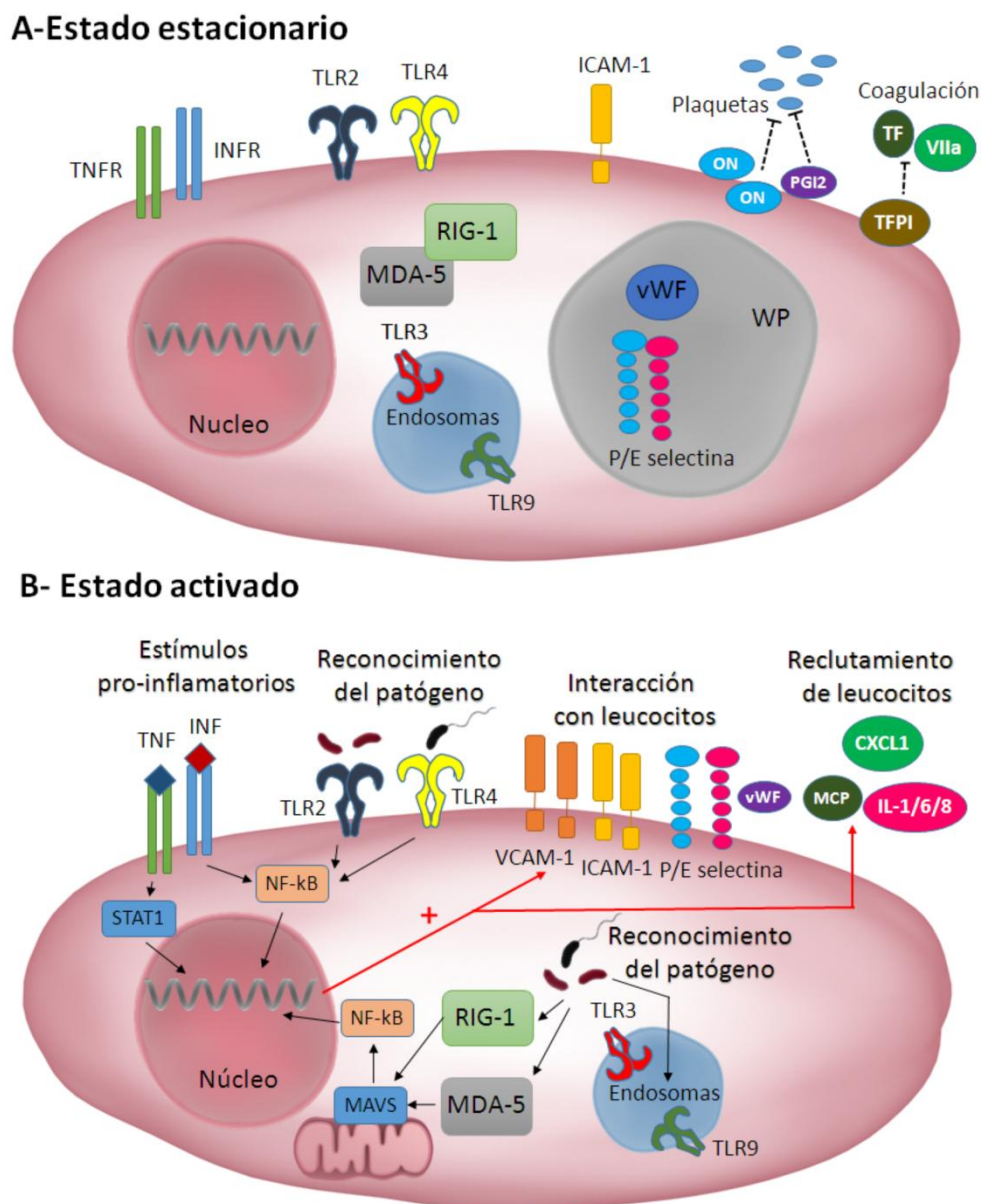
De manera similar, la expresión basal de inhibidores de la vía del factor tisular (TFPI) bloquea el inicio de la cascada de coagulación e inhibe la adhesión y agregación plaquetarias (Wood et al., 2013). Las CE sintetizan gránulos de Weibel-Palade (WP), que son vesículas de almacenamiento especializadas que contienen factor de von Willebrand (vWF), E y P-selectina y quimioquinas, entre otros, que pueden mediar una respuesta inmediata a señales inflamatorias (Aird, 2007). En estado estacionario, las CE expresan niveles basales de moléculas de adhesión, como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y, la E-selectina en CE de la piel y la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en CE de cerebro y médula

ósea. Sin embargo, todas las CE al ser activadas aumentan la expresión de las moléculas de adhesión. Las CE también pueden unir quimioquinas mediante la unión de las mismas a receptores de heparan sulfato presentes en su superficie (Hillyer & Male, 2005).

La activación de las CE en respuesta al daño, infección o estímulos inmunes (**Figura 1B**) tiene profundas consecuencias fisiológicas que incluyen un aumento del flujo sanguíneo, la formación de brechas entre las CE que permiten la filtración de proteínas plasmáticas, el aumento de la expresión de moléculas de adhesión, la liberación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y la secreción de IL-1 $\beta$ , IL-8 y RANTES (Pober & Sessa, 2007), eventos que promueven el acceso de las células inmunitarias a los tejidos injuriados.

Además, las CE expresan receptores para interferón (IFN)- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 que les permite detectar señales inflamatorias derivadas de otras células del sistema vascular o de los tejidos inflamados (Pober & Sessa, 2007). Las respuestas de las CE a estas señales se caracterizan por la up-regulación de ICAM-1, VCAM-1, E- y P-selectina y la secreción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias que promueven el *rolling* de leucocitos y su adhesión a la pared vascular. Estos eventos se asocian típicamente con la extravasación de los leucocitos en tejidos inflamados con el fin de controlar la infección (Carman & Martinelli, 2015).





**Figura 1. Esquema de las funciones de la CE asociadas al estado de homeostasis y de activación frente a una infección.** A- En estado estacionario las CE presentan baja expresión de moléculas de adhesión en superficie y generan sustancias que inhiben la agregación plaquetaria, como óxido nítrico (ON) y prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) y previenen la unión de factores de coagulación, como el factor tisular (TF) y el factor VIIa. Poseen gránulos de Weibel-Palade (WP) donde se encuentran moléculas de adhesión, factor de von Willebrand (vWF) y otros factores que se movilizarán rápidamente tras la activación de la CE. Además las CE presentan receptores para reconocimiento de patógenos (TLRs, RIG-1 y MDA-5), y de señales inflamatorias (receptores para TNF e INF, TNFR e INFR). B- El reconocimiento de estímulos inflamatorios o infecciosos, llevará a la activación de la CE, a la movilización de los gránulos de WP y a la up-regulación en su superficie de moléculas de adhesión como P y E-selectinas. Por otro lado, la transducción de la señal en respuesta al reconocimiento de los estímulos mencionados activará distintos factores de transcripción llevando a la síntesis de moléculas de adhesión y su up-regulación en la membrana y a la síntesis y liberación de citoquinas y quimioquinas. Estos mecanismos en su conjunto promoverán el reclutamiento e interacción con leucocitos. MAVS: Mitochondrial antiviral-signaling protein.

#### 4. Neutrófilos (PMN)

Los PMN pertenecen a la familia de los leucocitos polimorfonucleares, son células de origen hematopoyético que comparten las características de poseer un núcleo multilobulado y gránulos intracitoplásmicos altamente desarrollados (de ahí el término alternativo de granulocitos con el que se conoce a este grupo de células).

Sobre la base de las propiedades de tinción histocitoquímica de sus respectivos gránulos, se han identificado tres clases de leucocitos polimorfonucleares: neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Estas clases difieren no solo en apariencia sino también en su bioquímica y función.

Los leucocitos polimorfonucleares constituyen una parte importante del sistema de inmunidad innata del organismo; sus respuestas a patógenos, antígenos o ambos están pre-programados y no dependen de la exposición previa.

Dentro de los leucocitos polimorfonucleares, los PMN son los más abundantes en el torrente sanguíneo. Son continuamente generados a partir de precursores mieloides en la médula ósea a una tasa de  $10^{11}$  células por día, lo que constituye aproximadamente del 50 al 70% de todos los leucocitos en circulación (Edwards, 1994). Durante una infección bacteriana, el porcentaje de PMN puede aumentar a 80% o más. En contraste, las concentraciones tisulares de PMN durante los períodos de homeostasis son bastante bajas, aunque pueden aumentar rápidamente en respuesta a la infección u otros factores desencadenantes (Nauseef & Borregaard, 2014).

Los PMN se diferencian terminalmente y tienen una vida relativamente corta. Las estimaciones tradicionales basadas en la supervivencia *ex vivo* en cultivo o en la vida media después de la transferencia adoptiva sugirieron que estas células sobreviven un período de hasta 8 a 12 h en circulación y hasta 1 a 2 días en los tejidos (Dancey et al., 1976). Sin embargo, trabajos de marcación *in vivo* en humanos con el uso de  $^2\text{H}_2\text{O}$  evidencian una vida media en circulación de 5,4 días (Pillay et al., 2010).

#### 4.1. Reclutamiento de PMN a un foco infeccioso: Interacción PMN-CE.

Luego de la generación en la médula ósea, los PMN maduros arriban a los sitios de inflamación o infección a través de la vasculatura. La salida de PMN de circulación, se da principalmente a través de vénulas post-capilares y a través de un proceso bien definido de interacción secuencial de los receptores presentes en los PMN con ligandos inducidos en la superficie del endotelio (Ley et al., 2007).

Como se observa en la **Figura 2** la migración intravascular se refiere a todos los procesos que ocurren dentro de los vasos sanguíneos, incluidos el rodamiento o *rolling*, la adhesión, el arrastre y la adhesión firme de los PMN a la capa de CE.

Los leucocitos utilizan L-selectina para interactuar con el endotelio y la E-selectina atrae a los leucocitos hacia la capa de CE cercana al área lesionada (Ley, 2003). A continuación, las quimioquinas activan integrinas tales como VLA-4 (CD49d/CD29), LFA-1 (CD11a/CD18) y Mac-1 (CD11b/CD18), a través de receptores acoplados a proteínas G. El VLA-4 regula el *rolling* y la detención de los PMN, mientras que el LFA-1 y Mac-1 permiten una adhesión firme a la superficie de las CE (Evans et al., 2009). Además, la adhesión firme de los PMN al endotelio une las moléculas de adhesión de las CE y sus ligandos, incluidos ICAM-1, VCAM-1, E-selectina y P-selectina (DiStasi & Ley, 2009). Estas moléculas de adhesión están reguladas espacial y temporalmente durante cada paso de la migración.

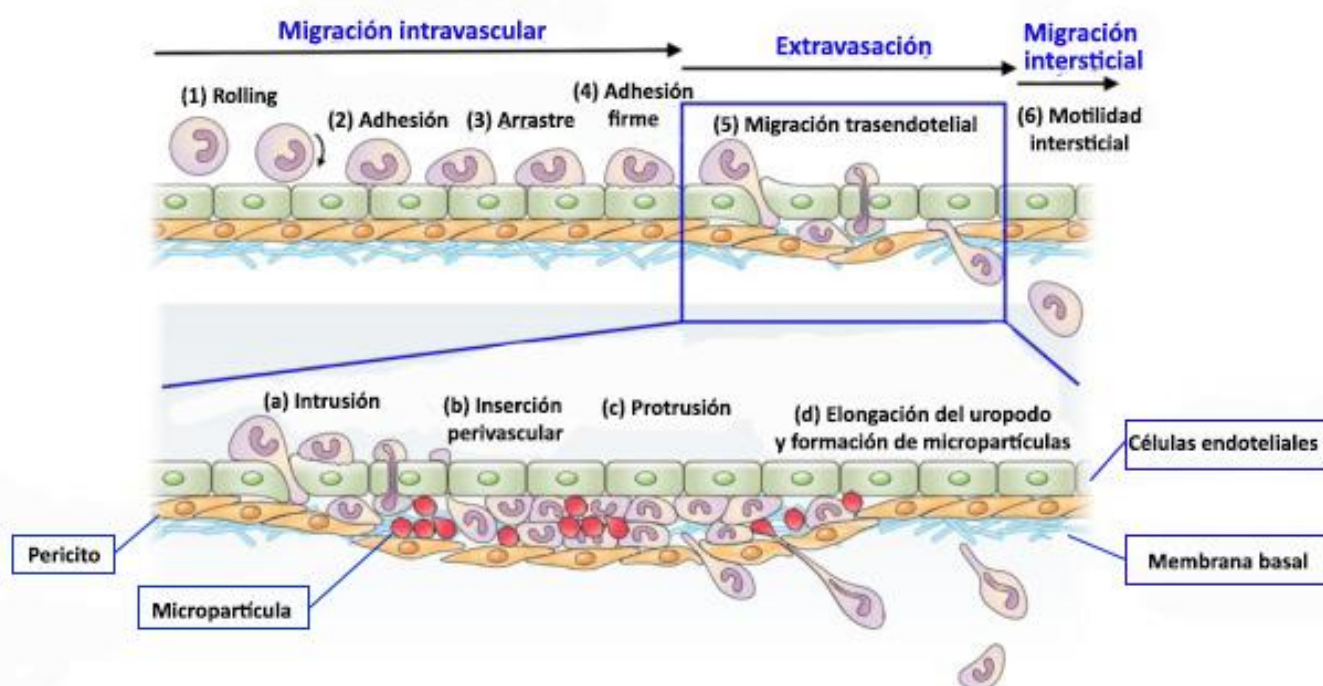
Tras la migración intravascular, los PMN deben penetrar en la pared de los vasos sanguíneos. En este proceso de migración transendotelial, se involucran múltiples interacciones. Después de una adhesión firme, los PMN pueden atravesar la barrera del vaso sanguíneo, la cual está compuesta por la capa de CE, la membrana basal endotelial y los pericitos, células que están involucradas en el control de la permeabilidad capilar (Sá-Pereira et al., 2012). La membrana basal endotelial está compuesta por lamininas y colágeno IV, que sirven como ligandos para las moléculas de adhesión en los leucocitos migratorios (Hyun et al., 2012; Lerman et al., 2014).

Durante la transmigración el PMN sufre modificaciones en el tamaño y la morfología celular con el fin de poder penetrar con movimientos

ameboideos entre los bordes de las CE. La extravasación se compone de varios subpasos: intrusión, inserción perivascular, protrusión, elongación del urópodo y, finalmente, desprendimiento de la cola junto con la formación de micropartículas de la membrana basal endotelial (Park & Hyun, 2016).

Los PMN pueden experimentar migración transendotelial de dos maneras diferentes. La más frecuente es la ruta paracelular que pasa entre las uniones de las células endoteliales, mientras que también existe, aunque en menor frecuencia, la ruta transcelular, donde el PMN se abre camino directamente a través del cuerpo de la célula endotelial (Voisin & Nourshargh, 2013).

Cuando el alargamiento del urópodo de los PMN finaliza, los PMN pueden acercarse al foco infeccioso, lo que se denomina etapa de migración intersticial, donde desarrollarán sus funciones bactericidas una vez alcanzado el foco infeccioso.



**Figura 2. Esquema de extravasación de PMN.** En el proceso de migración intravascular, los PMN se adhieren a las CE mediante (1) *rolling*, (2) adhesión y (3) arrastre. A continuación, los PMN (4) están firmemente adheridos a la superficie luminal del vaso. Después de acercarse al sitio adecuado de extravasación, (5) los PMN transmigran a través de las CE. En este proceso de extravasación, los PMN experimentan (a) intrusión, (b) inserción perivascular y arrastre, (c) protrusión y, finalmente, (d) elongación del urópodo y formación de micropartículas. Cuando termina la extravasación, (6) los leucocitos inician la migración intersticial. Adaptado de (Park & Hyun, 2016).

Numerosos factores solubles derivados de los PMN también inducen cambios en el citoesqueleto de actina de las CE generando disrupciones en la barrera endotelial. La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por los PMN también afecta de manera directa la integridad de las CE, reduciendo la función de barrera (Boueiz & Hassoun, 2009).

Muchas de estas interacciones inducen la producción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias por parte de las CE, que favorecen el reclutamiento y la activación de los PMN, estableciendo así un ciclo de retroalimentación positiva. Por ejemplo, la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) durante una lesión tisular actúa directamente sobre las CE y los PMN exacerbando la permeabilidad vascular (Sun et al., 2013).

#### **4.2. Movilización de vesículas secretoras en los PMN.**

La exocitosis de gránulos y vesículas secretoras desempeña un papel fundamental en la mayoría de las funciones de los PMN, desde la activación temprana hasta la destrucción de microorganismos fagocitados. Los gránulos de PMN contienen una multitud de sustancias antimicrobianas y potencialmente citotóxicas que se vierten al fagosoma o al exterior de la célula después de la degranulación.

Aunque la heterogeneidad estructural de los gránulos de los PMN puede entenderse como una consecuencia de las diferencias en la expresión de proteínas granulares durante la maduración de las células mieloides en la médula ósea, es menos evidente cómo se establece la jerarquía para la movilización de dichos gránulos en los PMN.

Las vesículas secretoras se movilizan por varios estímulos que son relevantes en la interacción de los PMN con el endotelio activado, como la señalización por selectinas y sus proteínas afines, y por quimioquinas, tales como IL-8 y fMLP. De esta forma, las vesículas secretoras pueden movilizar a la membrana celular receptores y otras proteínas funcionales, tales como integrinas, para usar en la trans migración sin liberar proteínas granulares potencialmente dañinas (Borregaard et al., 1993).

En comparación con las vesículas secretoras, los demás gránulos como los de gelatinasa, los gránulos específicos y los gránulos azurófilos

requieren un umbral más alto de estimulación para su movilización dentro del PMN (Borregaard et al., 1993; Faurschou et al., 2002).

#### **4.3. Reconocimiento del patógeno mediado por receptores celulares**

La invasión por agentes infecciosos desencadena una batería de respuestas inmunes, a través de interacciones entre una diversidad de factores de virulencia presentes en el patógeno y los mecanismos de vigilancia inmunitaria del huésped. Dichas interacciones generalmente se inician a través del reconocimiento por parte del huésped de estructuras moleculares conservadas de los patógenos, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*), y que son esenciales para su ciclo de vida (Janeway & Medzhitov, 2002).

Estos PAMPs, que están ausentes o compartimentados dentro de las células del huésped, son detectados a través de un número limitado de receptores de reconocimiento de patrones (PRR, *pattern recognition receptors*), entre los que se encuentran principalmente la familia de receptores de tipo Toll (TLR, *Toll-like receptors*) que se expresan en células inmunes innatas como células dendríticas, macrófagos y PMN (Kawai & Akira, 2010; Medzhitov, 2007; Takeuchi & Akira, 2010), células endoteliales y células epiteliales. Incluidos también como PRR se encuentran los receptores de tipo NOD (NLR), receptores de tipo RIG-I (RLR) y receptores de lectina tipo C (CLR).

Este sistema de receptores incluye receptores unidos a la membrana que escanean el medio extracelular y el compartimento endosomal (por ejemplo los TLR y CLR) y receptores citoplasmático (RLR y NLR). Este elegante sistema de receptores permite que la respuesta inmune resultante esté exquisitamente adaptada no sólo a la clase de patógeno (Bacterias Gram positivas y negativas, protozoos, virus y hongos), sino también al nivel de amenaza que ejerce el patógeno, según su ubicación con respecto de la célula (dentro del citoplasma, en compartimentos internos, o fuera de la célula).

En particular, y como ya se mencionó, la expresión de los TLR se limita principalmente a células inmunes, células endoteliales y epiteliales, y

cada tipo celular expresa un repertorio diferente de TLRs (Iwasaki & Medzhitov, 2004). Los clásicos TLRs pueden ser divididos en dos grupos: aquellos presentes en la superficie celular y los endosomales. Los TLR de la superficie celular, como el TLR1, 2, 4, 5 y 6, generalmente se unen a moléculas encontradas en el exterior de los patógenos, como por ejemplo componentes de la pared celular bacteriana. Los TLR endosomales, tales como TLR3, 7, 8, 9, y los TLR específicos de ratón 11, 12, y 13, generalmente se unen estructuras que sólo son accesibles tras la captación y destrucción de los patógenos. Estas estructuras incluyen los ácidos nucleicos, siendo en términos generales aceptado que el TLR3 reconoce ARN doble cadena, el TLR7, TLR8 humano y TLR13 de ratón detectan ARN simple cadena y el TLR9 ADN simple cadena rico en CpG (Alexopoulou et al., 2001; Bauer et al., 2001; Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004; Hidmark et al., 2012).

Además, los TLR7 y 8 pueden ser activados por pequeños compuestos como el R848 que mimetizan nucleósidos o nucleobases (Jurk et al., 2002). La unión del ligando a su TLR dispara una cascada de señalización dependiente de MyD88 (para TLR7, 8, 9, 11, 12, 13) o de TRIF para el caso de TLR3, que eventualmente resulta en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias.

Los RLRs fueron en un principio caracterizados en el contexto de infecciones virales ya que reconocen ARN doble cadena largos. Actualmente, se acepta que RIG-I reconoce ARN de dobles cadena cortos (<300 pb), con extremos romos, o con un extremo 5' trifosfato (5-ppp), mientras que MDA-5 une fragmentos largos (>1000 pb) de ARN doble cadena sin especificidad en cuanto a sus extremos (Reikine et al., 2014).

Sin embargo, para el caso de RIG-I también se describió que puede reconocer ARN virales de simple cadena con extremo 5' trifosfato e incluso ARN bacteriano en infecciones con bacterias intracelulares (Kell & Gale, 2015; Kumar et al., 2013; Pichlmair et al., 2006)

Los ligandos de los CLR son moléculas de carbohidratos y los de los NLR son variados, incluyendo componentes estructurales de los patógenos como ARNm para el caso de NLRP3 (Sander et al., 2011) y otros que todavía no se conocen.

La detección efectiva de PAMPs mediante cualquiera de estos receptores, induce rápidamente una respuesta inmune a través de la activación de vías de señalización complejas que culminan en la generación de un ambiente inflamatorio mediado por diversas citoquinas y quimioquinas, que posteriormente facilitan la eliminación del patógeno (Hoebe et al., 2004).

#### 4.4. Mecanismos microbicidas del PMN

Los PMN poseen casi todos los PRR señalados en la sección anterior (**Figura 3**) y la unión de los PAMPs a estos receptores dispara en los PMN la activación de sus diversos mecanismos microbicidas (Thomas & Schroder, 2013). En este sentido los PMN 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 (ROS) (Amulic et al., 2012).

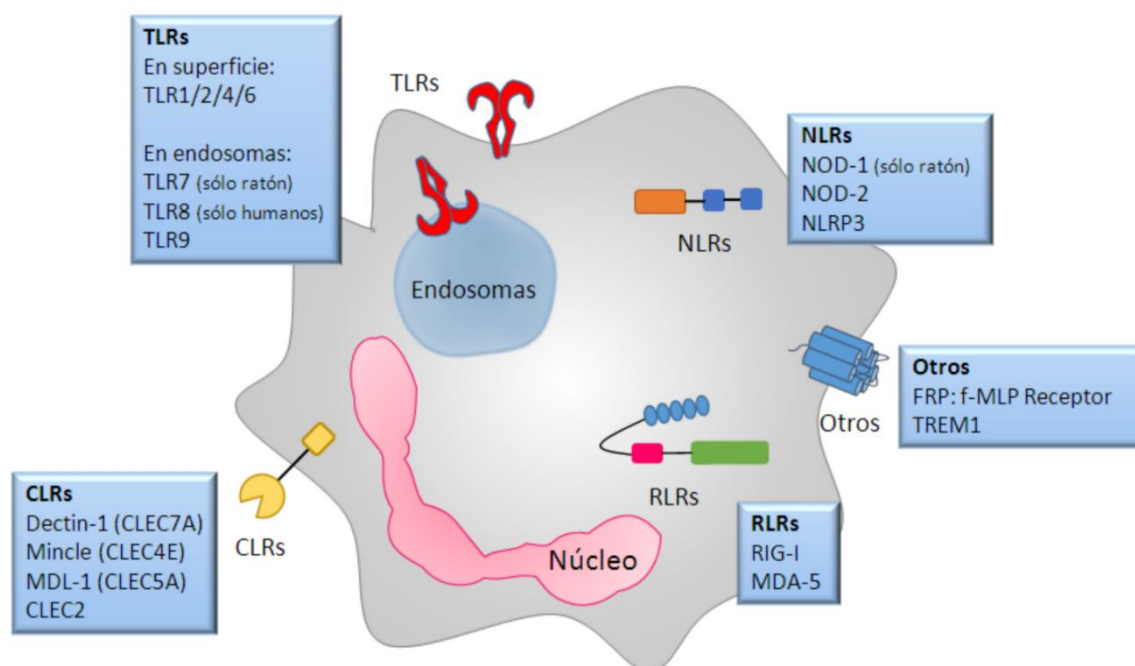


Figura 3. Receptores de reconocimiento de patrones presentes en PMN.



#### **4.4.1. Mecanismos microbicidas dependientes del oxígeno**

Los PMN poseen un complejo enzimático denominado NADPH oxidasa que comprende componentes citosólicos y componentes asociados a la membrana. La separación física de sus componentes garantiza la inactividad de la enzima en condiciones en las que el PMN se encuentra en reposo. Cuando la célula es estimulada por agonistas pro-inflamatorios, los componentes citosólicos se traslocan a la membrana plasmática y a la membrana del endosoma naciente y se asocian a los componentes de membrana generando una oxidasa activa que media un proceso conocido como estallido respiratorio. Al activarse la NADPH oxidasa se generan grandes cantidades de ROS, entre ellos, anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radicales de hidroxilo (-OH) y ácido hipocloroso (HOCl) (Fialkow et al., 2007; Lambeth, 2004). Estas especies reactivas del oxígeno son liberadas en los fagosomas, donde oxidan componentes críticos de lípidos y proteínas microbianas. También 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 ROS 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).

#### **4.4.2. Mecanismos microbicidas independientes del oxígeno**

Los mecanismos microbicidas independientes del oxígeno presentes en los PMN abarcan aquellos ejercidos por las proteínas presentes en sus gránulos, en los cuales reside parte de la actividad citotóxica ejercida por los PMN. Estos contienen distintas proteínas y enzimas hidrolíticas para destruir a los microorganismos invasores, tales como péptidos catiónicos, elastasa, lactoferrina y mieloperoxidasa (Mayer-Scholl et al., 2004).

##### **4.4.2.1. Fagocitosis**

Los PMN poseen la capacidad de capturar y degradar intracelularmente a los microorganismos, lo que los convierte en fagocitos profesionales. 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 fagocitadas (Lee et al., 2003).

Luego de la unión del microorganismo, la membrana del PMN sufre una invaginación que permite conducir al microorganismo a un fagosoma. Este proceso es regulado por cascadas de señalización intracelulares y rearreglos 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 otros ROS. En conjunto, con las enzimas aportadas por los gránulos y los ROS mediarán la muerte del microorganismo fagocitado (Kruger et al., 2015).

#### **4.4.2.2. Netosis**

Además de la fagocitosis, los PMN pueden mediar la muerte extracelular de microorganismos a través de la liberación de trampas extracelulares conocidas como NETs (*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 (Brinkmann et al., 2004; Fuchs et al., 2007). En la netosis, la envoltura nuclear se desintegra, mezclándose el contenido nuclear con el citoplasmático, las membranas internas se pierden y las organelas citoplasmáticas desaparecen por completo. 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, e histonas, entre otras (Jaillon et al., 2007; Mitroulis et al., 2011; Urban et al., 2009).

## **5. Vita-PAMPs: Importancia de la viabilidad bacteriana en la respuesta inmune**

El hecho de que las bacterias estimulen de manera diferente la respuesta inmune dependiendo de la viabilidad es plausible, considerando que las vacunas con microorganismos vivos desencadenan respuestas inmunes más vigorosas que sus contrapartes con organismos muertos (Detmer & Glenting, 2006). Además, a menudo se puede conseguir una inmunización protectora con una única inyección de microorganismos vivos, pero no con el mismo microorganismo muerto o atenuado. Debido a que los componentes estructurales bacterianos están presentes tanto en vacunas desarrolladas a partir de microorganismos vivos como muertos, es posible que las bacterias muertas carezcan de ciertos componentes importantes para inducir una inmunidad protectora efectiva.

En este sentido, el sistema inmune innato no sólo es capaz de discernir “lo propio de lo ajeno”, sino que también puede discriminar entre microorganismos vivos y muertos a través de un conjunto distinto de PAMPs, llamados vita-PAMPs, asociados al reconocimiento de componentes presentes solamente en los microorganismos vivos (Blander & Sander, 2012; Sander et al., 2011). Si bien los vita-PAMPs se detectan en combinación con los PAMPs clásicos, como el lipopolisacárido (LPS) y el ADN, que son compartidos entre microorganismos vivos y muertos, la detección de un vita-PAMP podría producir respuestas inmunes más intensas (Blander & Sander, 2012; Sander et al., 2012).

Hasta el momento se han identificado dos vita-PAMPs, el ARN mensajero bacteriano (ARNm) en el contexto de una respuesta a bacterias Gram-negativas vivas (Sander et al., 2011), y el di-adenosin monofosfato cíclico (c-di-AMP) en el contexto de una respuesta a bacterias Gram-positivas vivas (Moretti et al., 2017).

## **6. Composición y estructura del ARN bacteriano**

El ARN es un polímero monocatenario, generalmente no ramificado formado por monómeros llamados ribonucleótidos. Cada uno de estos ribonucleótidos está formado por una base nitrogenada unida

covalentemente a una ribosa y ésta a su vez a un grupo fosfato. Existen cuatro tipos principales de bases nitrogenadas: dos pirimidinas, citosina (C) y uracilo (U), y dos purinas, adenina (A) y guanosina (G). La unión entre los ribonucleótidos en el ARN es mediada por un enlace 3'-5' fosfodiéster. Además, existen otras bases minoritarias que derivan de las bases principales y están presentes en posiciones muy precisas del ARN, particularmente en el ARN de transferencia (ARNt) y ARN ribosomal (ARNr), donde las modificaciones químicas de estas bases juegan un papel importante en la función de estas moléculas.

A pesar de que el ARN no posee la estructura regular en doble hélice característica del ADN, posee la capacidad para formar regiones de doble hélice. Estas regiones en doble hélice pueden formarse entre dos segmentos de la misma cadena plegándose sobre sí misma. Estas cortas regiones de una misma cadena implicadas en la formación de la doble cadena suelen estar conectadas por segmentos de cadena sencilla extendidos, que adoptan una forma globular, denominada lazo o bucle. En la mayoría de las especies de ARN, la estructura secundaria predominante es la de tipo tallo-lazo.

En bacterias el ARNr es la clase de ARN más abundante, particularmente en *E. coli* éste supone el 80% del ARN total; existiendo tres tipos de ARNr: 5S, 16S y 23S (Ginsburg & Steitz, 1975).

## **7. Reconocimiento de ARN bacteriano por el sistema inmune innato**

El reconocimiento innato de ARN bacteriano varía según las especies y las células estudiadas. Los monocitos humanos detectan ARN bacteriano a través del TLR8 endosomal mientras que las células dendríticas plasmocitoides murinas y humanas lo hacen a través del TLR7. (Cervantes et al., 2013; Eigenbrod & Dalpke, 2015; Eigenbrod et al., 2015)

Los monocitos humanos responden al ARN de *E. coli* a través de TLR8 y MyD88. Cuando son desafiados con bacterias vivas producen niveles mayores de IL-12 y TNF- $\alpha$  en comparación con el desafío frente a bacterias muertas. Esta vía de reconocimiento no ocurre en células murinas

donde el TLR8 no responde a los estímulos típicos utilizados para este TLR (Liu et al., 2010).

En ratones y humanos, la detección de bacterias Gram negativas vivas, pero no de bacterias muertas, provoca la secreción de IL-1 $\beta$ . En macrófagos marinos y células dendríticas esto es dependiente de la detección de ARNm bacteriano y la activación del componente del inflammasoma NLRP3 (Sander et al., 2012).

Esta característica es exclusiva de las bacterias Gram negativas (no ocurre con Gram positivas), y es probable que dependa de la detección citosólica concomitante de LPS, más que de posibles diferencias intrínsecas entre el ARN de ambos tipos de bacterias (Eigenbrod & Dalpke, 2015).

### **7.1 Receptores de ARN presentes en PMN**

Como ya se mencionó, los PMN censan patógenos a través del reconocimiento de PAMPs a través de los PRR. Aunque han sido descritos algunos receptores con la habilidad de reconocer ARN en PMN humanos, sugiriendo que ellos podrían ser activados por la presencia de estas moléculas, la respuesta funcional de los PMN al ARN procariota total (ARNp) no ha sido previamente investigada.

En este sentido, se ha descrito que de los TLR endosomales que unen ácidos nucleicos, los PMN humanos sólo expresan TLR8 (Berger et al., 2012; Hayashi et al., 2003; Janke et al., 2009). Este TLR se expresa y es funcional en los PMN, disparando respuestas efectoras frente a la estimulación con moléculas pequeñas sintéticas, como el R848 (Janke et al., 2009). Además, ha sido demostrado que los PMN expresan los receptores de ARN, RIG-I y MDA-5, tanto a nivel de ARN mensajero como a nivel proteico (Berger et al., 2012; Tamassia et al., 2008).

### **7.2 Receptores de ARN presentes en CE**

Además de reconocer las señales inflamatorias del entorno, las CE expresan diversos PRR, convirtiendo a esas células en centinelas ideales, capaces de censar directamente y responder a patógenos o moléculas derivadas de ellos activando la vía del NF- $\kappa$ B, llevando, como ya se

mencionó anteriormente, a la up-regulación de moléculas de adhesión y secreción de citoquinas y quimioquinas, promoviendo, de esta forma, la inflamación (Konradt & Hunter, 2018).

De los TLRs conocidos relacionados con la respuesta a ácidos nucleicos, las CE expresan, en estado estacionario, TLR3 y 9, mientras que la expresión de TLR7 y 8 está ausente. Además expresan PRR citosólicos como RIG-I y MDA-5, que les permite responder a productos virales como el ARN genómico (Harcourt et al., 2002). En las CE el ARN de doble cadena induce la regulación positiva del IFN tipo I, los genes MHC-I y otros genes antivirales, así como de citoquinas y moléculas de adhesión, que en conjunto restringen el replicación viral (Dalrymple & Mackow, 2012; Huang et al., 2000).

La relevancia de estos receptores no se limita a los productos virales, y las CE estimuladas con LPS pueden utilizar RIG-1 y MDA-5 para inducir moléculas de adhesión y citoquinas, fenómenos mediados por NF- $\kappa$ B (Moser et al., 2016). En general, estos ejemplos resaltan la existencia de respuestas conservadas de la CE a la infección que forman la base para la idea de que la CE no es solamente un sustrato para reclutar células inflamatorias en sitios de infección, sino además es una célula central tanto en la detección como en la lucha contra las infecciones.

**Por todo lo descrito anteriormente, tanto los PMN como las CE tendrían el potencial de censar una infección a través del reconocimiento del ARN bacteriano, y en este sentido nuestra hipótesis es que el ARN procariota podría ser un modulador positivo de la interacción de los PMN con el endotelio, disparando mecanismos, en ambas células, que irían en línea con la eliminación del patógeno.**

---

## MATERIALES Y METODOS

### **1. Aspectos éticos**

Todas las muestras humanas utilizadas en este estudio fueron obtenidas de donadores voluntarios sanos según las pautas institucionales (Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina). Dicho estudio recibió la aprobación de los correspondientes Comités de Ética institucionales y el consentimiento informado fue proporcionado por escrito por todos los donadores.

### **2. Muestras de sangre**

Las muestras de sangre fueron obtenidas de donadores voluntarios sanos los cuales declararon no haber tomado ninguna medicación en los últimos 10 días previos al día de la toma de la muestra. La sangre se obtuvo por punción venosa de la vena del antebrazo y se extrajo directamente en tubos de plástico con citrato como anticoagulante.

### **3. Obtención de células mononucleares**

Las células mononucleares fueron obtenidas por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque (Ficoll Pharmacia, Uppsala; Hypaque, Winthrop Products, Buenos Aires, Argentina). Las células presentes en la interfase (halo) fueron colectadas, lavadas dos veces con solución fisiológica y resuspendidas en medio RPMI 1640. El recuento de las células se realizó en cámara de Neubauer con solución de Turk (0.01% de violeta de genciana en 2% ácido acético).

### **4. Aislamiento de neutrófilos polimorfonucleares (PMN)**

Los neutrófilos fueron aislados por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque (Ficoll Pharmacia, Uppsala; Hypaque, Winthrop Products, Buenos Aires, Argentina) y sedimentación en dextran, como ha sido descrito previamente (Boyum 1968).

Los eritrocitos contaminantes fueron removidos por lisis hipotónica. Luego del lavado, las células (96% neutrófilos, según visualización microscópica con tinción de May Grünwald/Giemsa) fueron suspendidas en RPMI 1640 suplementado con 1% de suero fetal bovino (SFB). El recuento de las células se realizó en cámara de Neubauer con solución de Turk (0.01% de violeta de genciana en 2% ácido acético).

## 5. Cultivo de bacterias y tratamientos

Los experimentos fueron realizados usando la bacteria Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC® 25922™). En algunos experimentos se incluyó otra bacteria Gram-negativa, como *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 700603™), y una bacteria Gram-positiva, *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212™). Todas las especies bacterianas fueron expandidas en caldo tripteína soya (Laboratorios Britania, Buenos Aires). Luego el cultivo se centrifugó a 10.000 rpm por 15 min y las células se resuspendieron en buffer fosfato salino (PBS) 1X. Diferentes funciones de los PMN fueron evaluadas frente a estímulos con bacterias vivas y muertas. La muerte fue inducida por calor (MC: 60 °C por 60 minutos), irradiación (I: 50 KGy) o por fijación (PFA: paraformaldehído al 4% por 15 minutos), y fue corroborada por ausencia de crecimiento bacteriano en placas de agar MacConkey para bacterias Gram-negativas o placas de agar tripteína soya para Gram-positivas (Laboratorios Britania, Buenos Aires). Después del tratamiento correspondiente, la suspensión de bacterias se lavó por centrifugación a 10.000 rpm por 15 min, recolectándose el sobrenadante para ser usado en algunos experimentos, y el pellet de células se resuspendió en PBS 1X.

En otro conjunto de experimentos, para determinar si el crecimiento bacteriano que ocurre durante el tiempo de los experimentos influye sobre la respuesta de los PMN, los experimentos fueron realizados usando una cepa auxotrófa *E. coli* (ZIP2286B) en PBS y en ausencia de SFB.

## 6. Purificación de ARN

Los pellets de *E. coli* ( $1 \times 10^8$  CFU) o de células mononucleares ( $1 \times 10^7$ ) fueron homogenizadas en RNazol-RT (MRC Gene, Cincinnati, OH,



USA) con el fin de obtener ARN procariota (ARNp) o ARN eucariota (ARNe), respectivamente. El ARN fue aislado a partir del sobrenadante resultante por precipitación mediante alcohol isopropílico, seguida de lavado y finalmente solubilización en agua libre de RNasas. Con el objetivo de determinar si las trazas de fenol y tiocinato de guanidina, que pudieran permanecer luego de la extracción de ARN tienen algún efecto en la funcionalidad de los PMN se realizó una extracción control sin ninguna muestra biológica.

La concentración de ARNp o ARNe fue determinada mediante espectrofotometría (DeNovix DS-11, DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA). Todas las muestras tuvieron una relación 260/280 entre 1.8 y 2.1, y la relación 260/230 entre 1.8 y 2.3, que representa un ARN altamente purificado sin contaminación por fenol. En algunos experimentos, el ARNp fue tratado o no con Ribonucleasa A (RNasa A) (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Para su degradación total se usó una concentración final de 5 µg/ml, y las muestras fueron incubadas a 37 °C por 20 min. Luego de la incubación con RNasa A, se controló la degradación total del ARNp por electroforesis en gel de agarosa.

Para excluir la contribución de posibles contaminaciones por LPS y ADN en las extracciones de ARNp, se utilizó Polimixina B (7 µg/ml; Sigma-Aldrich, MO, USA) y DNasa I (1 U/µg of RNA; Promega, Madison, WI, USA). En este último caso las preparaciones de ARNp fueron incubadas en un buffer conteniendo 400 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM MgSO<sub>4</sub> y 10 mM CaCl<sub>2</sub> por 30 min a 37 °C y la reacción fue detenida mediante la adición de 20 mM de EGTA y posterior incubación por 10 min a 65 °C.

## **7. Electroforesis en gel de agarosa**

Los fragmentos de ARN fueron separados a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% con la adición de 10 mg/ml de bromuro de etidio para visualizar las muestras. Las electroforesis se realizaron a 100 V por 15 minutos. El ARN fue detectado usando un transiluminador de luz UV y el tamaño del ARN fue determinado usando un marcador de peso molecular de 100 bp (Plus DNA ladder -TransGen Biotech Co., Ltd, Beijing, China).

## 8. Estudios de citometría de flujo

Los PMN ( $2.5 \times 10^5$  células) fueron incubados con el anticuerpo anti-CD11b humano de ratón conjugado con ficoeritrina (Dako, Santa Clara, CA, USA). Para el caso de las células endoteliales, tanto para la línea celular HMEC-1 como para el cultivo celular primario HUVEC,  $1 \times 10^5$  células fueron incubadas con el anticuerpo anti-CD54 humano (ICAM-1) de ratón conjugado con ficoeritrina (BD bioscience).

Para todos los análisis, las poblaciones celulares fueron seleccionadas según su FSC-SSC (*Forward vs. Side Scatter*), y el incremento de FSC, CD11b o CD54 fue analizado sobre la selección de células viables. La intensidad media de fluorescencia fue determinada a partir de 50.000 eventos.

## 9. Quimiotaxis

La quimiotaxis se cuantificó utilizando una cámara de Boyden (Betsuyaku, Liu et al. 1999). La suspensión celular ( $50 \mu\text{l}$ ) conteniendo  $2 \times 10^6$  células/ml en RPMI con 2% SFB, se colocó en los pocillos superiores de una cámara de micro-quimiotaxis de 48 pocillos. Una membrana de policarbonato con poros de  $3 \mu\text{m}$  de diámetro (Neuro Probe Inc. Gaithersburg MD, USA), se utilizó para separar las células de los pocillos inferiores que contenían RPMI o el estímulo (bacterias, ARNp o medio condicionado). La cámara se incubó por 30 min a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera húmeda de 5 %  $\text{CO}_2$ . Luego de la incubación, el filtro fue teñido con un kit de tinción comercial (TINCION-15, Biopur SRL, Rosario, Argentina). El número de células migradas y retenidas en la superficie inferior de la membrana fue determinado analizando cinco campos aleatorios en un microscopio en campo claro ( $\times 1000$ ). Cada tratamiento fue realizado por triplicado dentro de cada experimento.

## 10. Fagocitosis

Las bacterias *E. coli* fueron conjugadas con Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC, 2 mg/ml) en buffer carbonato, pH 9.5 a 1 M por 4 horas a temperatura ambiente. La viabilidad bacteriana luego de la conjugación con FITC fue confirmada observándose unidades formadoras de colonias en

agar MacConkey.  $2,5 \times 10^5$  PMN fueron incubados por 60 min a  $37^\circ\text{C}$  y una atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$  con bacterias vivas o muertas por calor conjugadas con FITC. Inmediatamente después, las células fueron tratadas con tripsina 1% en PBS por 5 minutos con el fin de remover las bacterias adheridas a la superficie celular de los PMN. Finalmente, las células se fijaron con PFA al 0,5% y mediante citometría de flujo se analizó la intensidad de FITC en la población de PMN.

### **11. Generación de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS)**

La producción de ROS fue determinada por citometría de flujo utilizando Rhodamina 123 (DHR-123) según el protocolo descrito por Leech *et al.* (Leech, Hutchinson, Holdsworth, & Morand, 1998). Brevemente,  $2,5 \times 10^5$  PMN fueron pre-incubados por 15 min a  $37^\circ\text{C}$  con  $1 \mu\text{M}$  de DHR-123. Luego las células fueron incubadas en presencia o ausencia del estímulo (bacteria o ARNp) por 30 min a  $37^\circ\text{C}$  y una atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$ . Inmediatamente después la fluorescencia fue determinada mediante citometría de flujo.

### **12. Formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs)**

$2,5 \times 10^5$  PMN fueron colocados suavemente sobre un cubreobjeto de 13 mm de diámetro previamente tratado con 0,001% de poly-L-lisina en una placa de 48-well. Las células fueron incubadas con bacterias (relación PMN:bacteria de 1:20) o ARNp ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) por 3 horas a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$ . Luego, se retiró el sobrenadante suavemente y las células adheridas al cubreobjeto fueron fijadas con PFA al 4% por 15 min. Posteriormente de realizarse un lavado con PBS, el ADN fue marcado utilizando Vectashield con yoduro de propidio (Vector Laboratories, United Kingdom) y para la marcación de la enzima elastasa se utilizó el anticuerpo específico anti-elastasa (Merk Millipore, Darmstadt, Germany).

Las imágenes de la formación de NETs fueron adquiridas en el microscopio confocal FluoView FV1000 (Olympus, Tokyo, Japan). Al menos 5 campos elegidos al azar fueron evaluados para cada condición experimental ( $\times 200$ ). El área de las NETs fue determinada de manera manual utilizando el software FIJI (Schindelin *et al.*, 2012). Las unidades de

medida del área resultante provienen directamente de la información almacenada en la imagen que brinda el microscopio.

### **13. Determinación de la actividad enzimática de la elastasa**

Los PMN ( $1 \times 10^6$ ) fueron incubados por 3 horas a 37°C y una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> en presencia de bacteria (relación 1:20) o ARNp (10 µg/ml) en medio de cultivo RPMI sin rojo fenol. Luego de estimular la formación de NETs, los PMN fueron tratados con Nucleasa (MNasa 1 U/ml) en presencia de 1 mM CaCl<sub>2</sub> por 30 minutos at 37 °C con el objetivo de cortar y liberar el ADN, junto con la enzima elastasa asociada en la NET, del cuerpo celular del PMN. Para detener la actividad MNase se añadió EDTA (5 mM). La actividad de la elastasa en el sobrenadante libre de células fue medida a las 4 horas utilizando el sustrato específico *N-methoxysuccinyl-alanine-alanine-pro-val* (1 mM, Sigma-Aldrich, MO, USA) y determinada por espectrofotometría a 405 nm sustrayendo la absorbancia a 550 nm. Como control positivo se utilizó una suspensión de  $1 \times 10^6$  tratados con 0,5% de Tritón X-100.

### **14. Inhibición de la Endocitosis**

Con el objetivo de inhibir la endocitosis del ARN, los PMN fueron tratados durante 30 minutos (previos al estímulo del ARN) con Nistatina (30 µg/ml, Denver Farma S.A, Argentina) según el protocolo de Rotheberg *et al.* (Rothberg *et al.*, 1992).

### **15. Análisis en sangre entera**

La respuesta de los PMN al ARNp fue evaluada en sangre entera en presencia o ausencia de una estimulación previa de 15 minutos con TNF-α (100 ng/ml). Después de 30 minutos con estimulación con ARNp, la sangre fue tratada con una solución de lisis fijadora comercial (BD, FACS Lysing Solution, San Jose, CA, USA) y el incremento de la expresión de CD11b y la generación de ROS fueron evaluados por citometría de flujo como se ha descrito previamente.

## **16. Cultivo de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC)**

Las células del endotelio vascular humano (HUVEC) fueron obtenidas a partir de muestras de cordón umbilical por digestión con colagenasa según el protocolo de Jaffe *et al.* (Jaffe, Nachman, Becker, & Minick, 1973). Las células fueron sembradas hasta alcanzar confluencia en frascos de 25 cm<sup>2</sup> previamente tratados con gelatina al 1% para favorecer la adhesión celular. Los cultivos fueron mantenidos en medio RPMI 1640 (HyClone) suplementado con 10% de SFB (Gibco), heparina (100 µg/ml), factor de crecimiento endotelial (50 mg/ml), piruvato sódico (2 mM), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 µg/ml) (Sigma Chemical) y fueron incubadas a 37 °C en atmósfera húmeda con de 5 % CO<sub>2</sub>. Para todos los experimentos se utilizaron HUVEC con bajo número de divisiones (pasaje 1 a 3).

## **17. Cultivo de células endoteliales HMEC-1**

Para determinados experimentos se utilizó de manera complementaria la línea celular establecida a partir de microvasculatura endotelial humana (HMEC-1). Los cultivos fueron mantenidos en medio MCDB 131 (Gibco) suplementado con 10% de SFB (Gibco), factor de crecimiento epitelial (50 mg/ml), hidrocortisona (1g/ml)), L-glutamina (10 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 µg/ml) (Sigma Chemical) y fueron incubadas 37 °C en atmósfera húmeda con de 5 % CO<sub>2</sub>.

## **18. Diseño experimental con células endoteliales**

Las células HUVEC o HMEC-1 fueron sembradas en placas de 24 pocillos hasta alcanzar una confluencia cercana al 90%. Luego, las células fueron tratadas por 2 horas con ARNp (1 µg/ml) y los respectivos controles. A continuación, las HUVEC o HMEC-1 fueron lavadas 3 veces con PBS para eliminar cualquier posible rastro de ARNp, y se le adicionó medio fresco el cual fue dejado por un periodo adicional de 18 horas. Luego el medio fue recolectado (CM, medio condicionado) y utilizado inmediatamente como estímulo quimiotáctico o de activación para PMN, o guardado a -20°C para la determinación de IL-8 o Factor de von Willebrand (vWF) mediante ELISA. Las células fueron despegadas por tratamiento con tripsina, lavadas y

utilizadas para la evaluación de la expresión de CD54 por citometría de flujo (como se describió previamente).

Para suprimir la activación de NF- $\kappa$ B, se utilizó el inhibidor (*E*)-3-[4-*methyl phenyl sulfonyl*] -2-propenenitril (BAY 11-7082; Biomol), mediante la adición de 40  $\mu$ M a los cultivos 30 minutos previos al tratamiento y posterior lavado.

### **18.1. Adhesión de PMN a células HUVEC**

PMN purificados fueron sembrados sobre células HUVEC luego de ser tratadas en una relación PMN:HUVEC de 20 a 1 y co-cultivadas por un lapso de 1,5 horas. Los PMN que no se adhirieron, fueron removidos realizando 3 lavados con PBS. Para determinar la adhesión de los PMN a las células endoteliales se utilizó el ensayo de fosfatasa alcalina (PA) midiendo la conversión del sustrato p-nitrofenilfosfato a nitrofenol (Santini et al., 1987). Brevemente, las células adheridas son incubadas por 1 hora a 37 °C con 100  $\mu$ l de 1% p-nitrofenilfosfato (2 mg/ml, Sigma) en AMP buffer (0.1 M, pH=10) con 0.2 % SDS y 1 mM  $Cl_2Mg$ . Luego se añaden 50  $\mu$ l de solución de stop (2 N NaOH) y la densidad óptica es medida a 405 nm. 1 Unidad de fosfatasa alcalina se define como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu$ mol de nitrofenol/min.

### **18.2. Sistema de *Transwell***

Para aquellos experimentos donde se utilizó un sistema de *transwell*, se cubrió con colágeno el inserto del *transwell* (Corning Inc., tamaño de poro de 3  $\mu$ m) y se dejó a 37 °C por 12 horas.  $2 \times 10^5$  HUVEC fueron sembradas en los insertos recubiertos de colágeno y se dejaron hasta alcanzar el 90% de confluencia. El ARNp se colocó en el compartimiento inferior de la placa de *transwell* y se dejó durante 1,5 h. Luego, se removió el contenido del compartimiento inferior conteniendo el ARNp, las células se lavaron suavemente, se colocaron en medio fresco y se dejaron durante 18 h. Después del período de incubación, se recogió el sobrenadante y se procesaron las células para la determinación de ICAM-1. Para los ensayos de trans migración de PMN, luego del período de incubación,  $1 \times 10^6$  PMN fueron colocados en el compartimiento superior del *transwell* e incubados

por 2 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Luego, las células fueron recolectadas del compartimento inferior del *transwell* y el recuento de las células migradas fue realizado usando una cámara de Neubauer.

### **19. Análisis Estadísticos**

Los datos se analizaron mediante el software GraphPad Prism. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  ES. Los análisis estadísticos de los datos fueron realizados utilizando el Test de Mann-Whitney, una prueba no paramétrica aplicada a dos muestras independientes.

Las comparaciones entre múltiples grupos se analizaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba de Tukey. Valores de *P* menores a 0.05 fueron considerados significativos.

## CAPÍTULO I

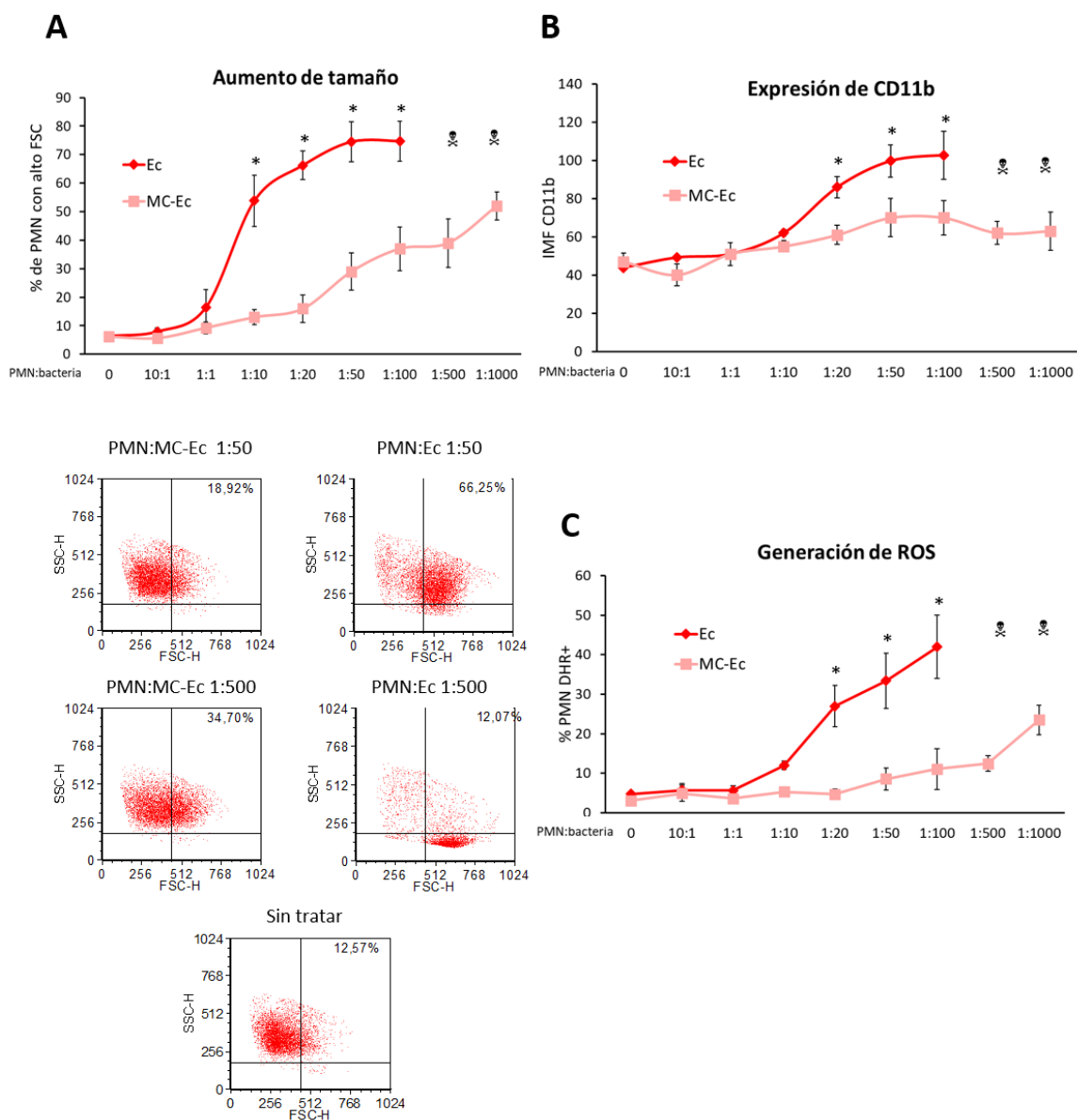
### 1. La viabilidad bacteriana es necesaria para desencadenar respuestas en PMN humanos

Nuestro primer objetivo ha sido determinar si la viabilidad bacteriana es determinante para la activación y la generación de respuestas bactericidas en los PMN. Para ello, PMN fueron purificados a partir de sangre periférica de dadores sanos como se detalla en materiales y métodos, mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque, seguida por una sedimentación en Dextran, y los eritrocitos fueron eliminados mediante lisis hipotónica. Una vez obtenidos los PMN (95% de pureza, mediante observación microscópica), éstos fueron desafiados con *Escherichia coli* viva (Ec) y muerta por calor (MC-Ec: calentada a 60°C durante 60 minutos, lavada y resuspendida en PBS 1X) en distintas relaciones PMN:bacteria durante 30 minutos. Como parámetros de activación asociados con los pasos iniciales de activación de los PMN medimos el aumento del tamaño celular en los PMN, determinado por citometría de flujo como el incremento en la dispersión de la luz de forma frontal (Forward Scatter o FSC), y el aumento en la expresión de la integrina CD11b (Cole, Garlick, Galvin, Hawkey, & Robins, 1995) (Kuijpers et al., 1991). Además, como indicador de la capacidad bactericida del PMN, determinamos la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), también mediante citometría de flujo.

Como se observa en la **Figura I.1**, la bacteria viva (Ec) induce mayor respuesta a medida que se coloca más bacteria por PMN. En cambio, para el grupo MC-Ec se evidencia una débil estimulación de los PMN incluso en relaciones 1:100. El parámetro de activación más sensible resultó ser el aumento en el FSC, en el cual se observa una gran respuesta a partir de la relación 1:10, que resulta ser estadísticamente significativa cuando se comparan los grupos Ec con MC-Ec. Por otro lado, las diferencias entre



ambos grupos para el aumento del CD11b y la generación de ROS se observan a partir de la relación 1:20. De esta forma, en los sucesivos ensayos se escogió la relación 1:20, que resulta ser la menor cantidad de bacteria por PMN en la cual se evidencian diferencias significativas entre los dos grupos experimentales.



**Figura 1.1: Curvas de dosis respuesta utilizando PMN desafiados con diferentes relaciones de bacterias vivas (Ec) y muertas por calor (MC-Ec). A) Porcentaje de PMN con alto FSC. Panel inferior: Dot plots representativos que demuestran efectos tóxicos a altas dosis de Ec. B) Intensidad media de fluorescencia de la integrina CD11b. C) Porcentaje de PMN DHR+. Todos los datos fueron generados mediante citometría de flujo, los resultados se expresaron como la media  $\pm$  ES, \* $p < 0.05$  vs MC-Ec,  $n = 4$ .**

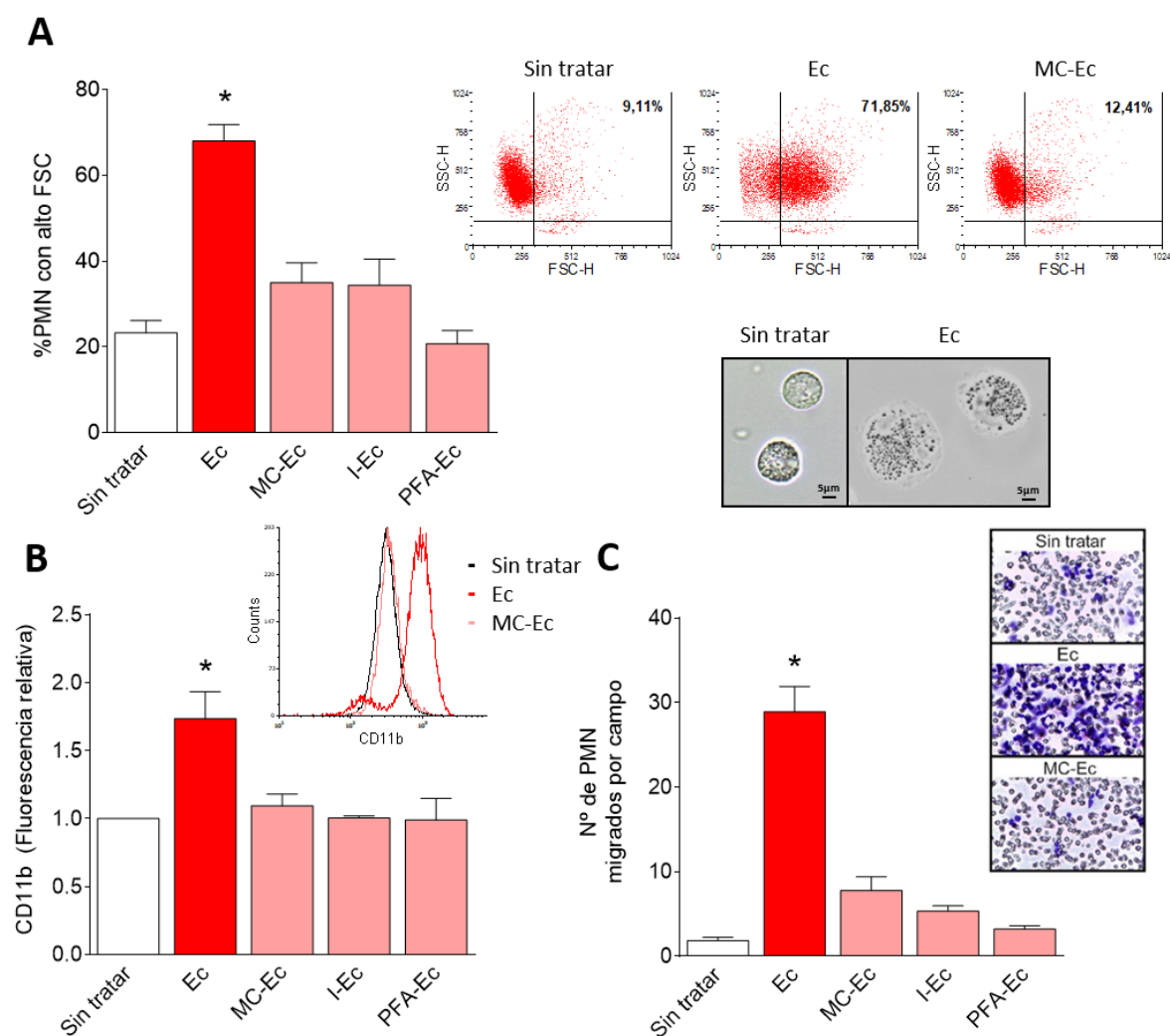
☠ Efectos tóxicos.

Cabe destacar que cuando los PMN fueron desafiados con concentraciones altas de bacterias, si bien las MC-Ec mostraron algunos efectos estimulatorios sobre los PMN, los niveles equivalentes de bacterias vivas indujeron efectos tóxicos, los cuales se pueden evidenciar al observar en los gráficos de citometría de flujo la pérdida de la población de PMN dentro de la región correspondiente.

A continuación, nos preguntamos si, al igual que lo sucedido en el caso de la bacteria muerta por calor, otros tipos de muerte bacteriana inducirían una pobre activación de los PMN en comparación con bacterias vivas.

Para ello, se utilizaron otros dos procesos: muerte por irradiación (I-Ec: 50 KGy) y muerte por fijación (PFA-Ec: 15 minutos en presencia de paraformaldehído al 4%). En todos los casos, luego de cada tratamiento, las bacterias se lavaron, el sobrenadante se recogió y las células se resuspendieron en PBS 1X. Para determinar la eficacia de cada método, se sembró un inóculo bacteriano después de cada tratamiento en placas de agar MacConkey, donde no se observó crecimiento alguno.

Como se muestra en la **Figura I.2**, únicamente las bacterias vivas fueron capaces de activar a los PMN, produciendo un incremento en el tamaño celular de los mismos (**Figura I.2 A**) así como también un aumento en la expresión en superficie del marcador CD11b medido por citometría de flujo (**Figura I.2 B**). En ninguno de los casos, la bacteria muerta indujo una respuesta en los PMN, sin importar el método utilizado para inducir su muerte. Considerando el hecho de que el incremento en el tamaño celular tiene una correlación directa con la quimiotaxis en PMN (Cole et al., 1995), utilizamos un ensayo de migración a través de una membrana en cámara de Boyden como se detalla en materiales y métodos para determinar la capacidad de las Ec o de los diferentes tipos de bacteria muerta para funcionar como un estímulo quimiotáctico. La **Figura I.2 C** muestra que sólo las bacterias vivas fueron capaces de inducir la migración de PMN en contraste con las bacterias muertas, independientemente del método empleado para su muerte.



**Figura 1.2: La bacteria viva desencadena los primeros pasos de la activación de PMN.**

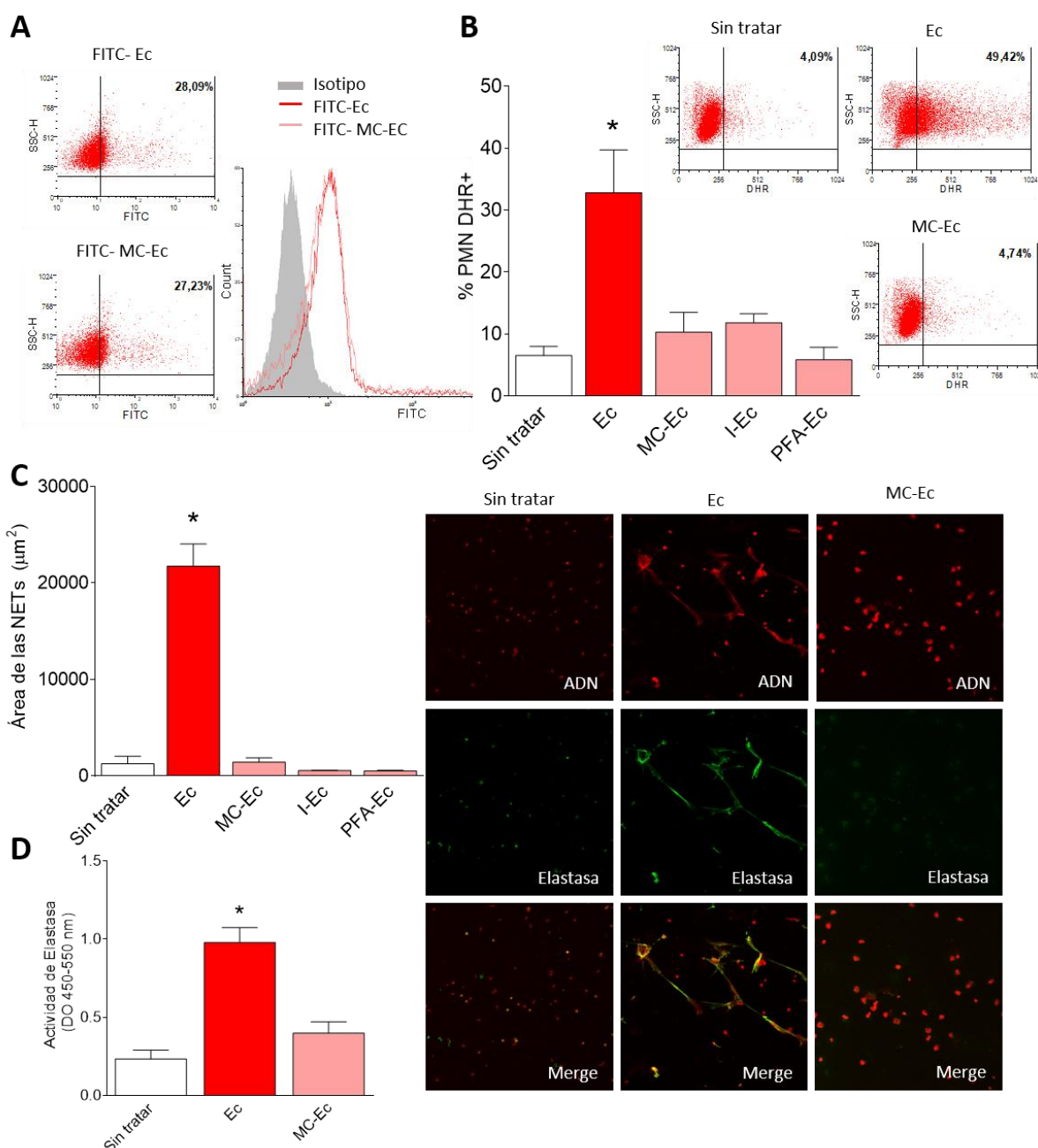
Los PMN se mantuvieron sin estimular, se trataron con bacterias vivas (Ec) o bacterias muertas por diferentes métodos: Ec muerta por calor (MC-Ec), Ec irradiada (I-Ec), Ec fijada (PFA-Ec). En todos los casos se utilizó una relación PMN:bacteria de 1:20 y el período de incubación fue de 30 minutos. **A)** Porcentaje de PMN con alto FSC determinado por citometría de flujo. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  ES,  $n=14$ . *Panel derecho superior:* Diagramas de densidad representativos. *Panel derecho inferior:* microfotografías representativas de PMN sin tratar y PMN estimulado con Ec ( $\times 1000$ ). **B)** Expresión de CD11b: intensidad media de fluorescencia determinada mediante citometría de flujo y expresada como fluorescencia relativa con respecto del sin tratar. Los resultados se expresaron como la media de la fluorescencia relativa  $\pm$  ES,  $n=8$ . *Panel superior:* histograma representativo de la expresión de CD11b. **C)** Número de PMN migrados a través de una membrana con poros de  $3 \mu\text{m}$  utilizando una cámara de Boyden. *Panel derecho:* Microfotografías representativas que muestran núcleos teñidos (en violeta) de los PMN que migraron a través de la membrana ( $\times 1000$ ). Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  ES,  $n=8$ . En todos los casos \*  $p < 0.05$  vs. todos los otros grupos.

Teniendo en cuenta estos resultados, y dado que la falta de estimulación por parte de la bacteria muerta con respecto a la viva podría deberse a una diferencia en su fagocitosis, se utilizaron bacterias Ec y MC-Ec conjugadas con FITC y la fagocitosis fue evaluada mediante citometría de

flujo. Como se muestra en la **Figura I.3 A**, tanto el porcentaje como la cantidad de bacterias internalizadas por célula (como medida de la IMF) fueron similares para Ec y MC-Ec.

Luego examinamos dos funciones de los PMN asociadas directamente con su capacidad bactericida: la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) (Segal, 2008)(Brinkmann et al., 2004), desafiando los PMN con bacterias vivas o muertas por diferentes métodos en una relación 1:20 durante 30 minutos y 3 horas, respectivamente.

Como se muestra en las **Figuras I.3 B, I.3 C y I.3 D** tanto la generación de ROS como la formación de NETs (medida como el área en  $\mu\text{m}^2$  utilizando el software Fiji a partir de imágenes obtenidas por microscopia confocal, o como la actividad de la enzima elastasa mediante el empleo del sustrato específico) sólo se observaron cuando los PMN fueron desafiados con Ec. Sin embargo, estas funciones no fueron inducidas por las bacterias muertas, independientemente del tipo de método utilizado para inducir su muerte.



**Figura 1.3: Las bacterias vivas son fundamentales para desencadenar respuestas bactericidas en PMN.** **A)** La fagocitosis de FITC-Ec o FITC-MC-Ec se determinó después de 60 minutos mediante citometría de flujo. Diagramas de densidad y un histograma representativo de la IMF de PMN FITC+ **B)** Generación de ROS. Los PMN aislados se incubaron con DHR durante 15 min y luego se trataron con Ec, MC-Ec, I-Ec o PFA-Ec durante 30 min. El % de PMN DHR+ se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  ES, n=8. *Panel derecho:* diagramas de densidad representativos mostrando el porcentaje PMN DHR+ **C)** Formación de NETs. Los PMN se incubaron con los diferentes estímulos durante 3 hs, se tiñeron con Ioduro de propidio para revelar el ADN y con un anticuerpo específico para la detección de elastasa y se visualizó por microscopía confocal. El área de NETs se determinó utilizando el software FIJI. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  ES, n=10. *Panel derecho:* Microfotografías representativas de imágenes confocales que muestran los PMN de los grupos sin tratar, Ec y MC-Ec (x 200). **D)** Actividad de la enzima elastasa determinada utilizando un sustrato específico y medida por la absorbancia a 450-550 nm del producto resultante para PMN sin tratar y PMN tratados con Ec o MC-Ec. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  ES, n=4. En todos los casos \* p<0.05 vs. todos los otros grupos.

En conjunto, estos resultados revelan que la bacteria muerta es pobremente estimuladora de la activación del PMN, independientemente del método utilizado para inducir su muerte, y esto no se debería a diferencias en la fagocitosis de la bacteria muerta con respecto de la viva.

## **2. La respuesta de los PMN es independiente del crecimiento bacteriano y no es exclusiva para *E. coli***

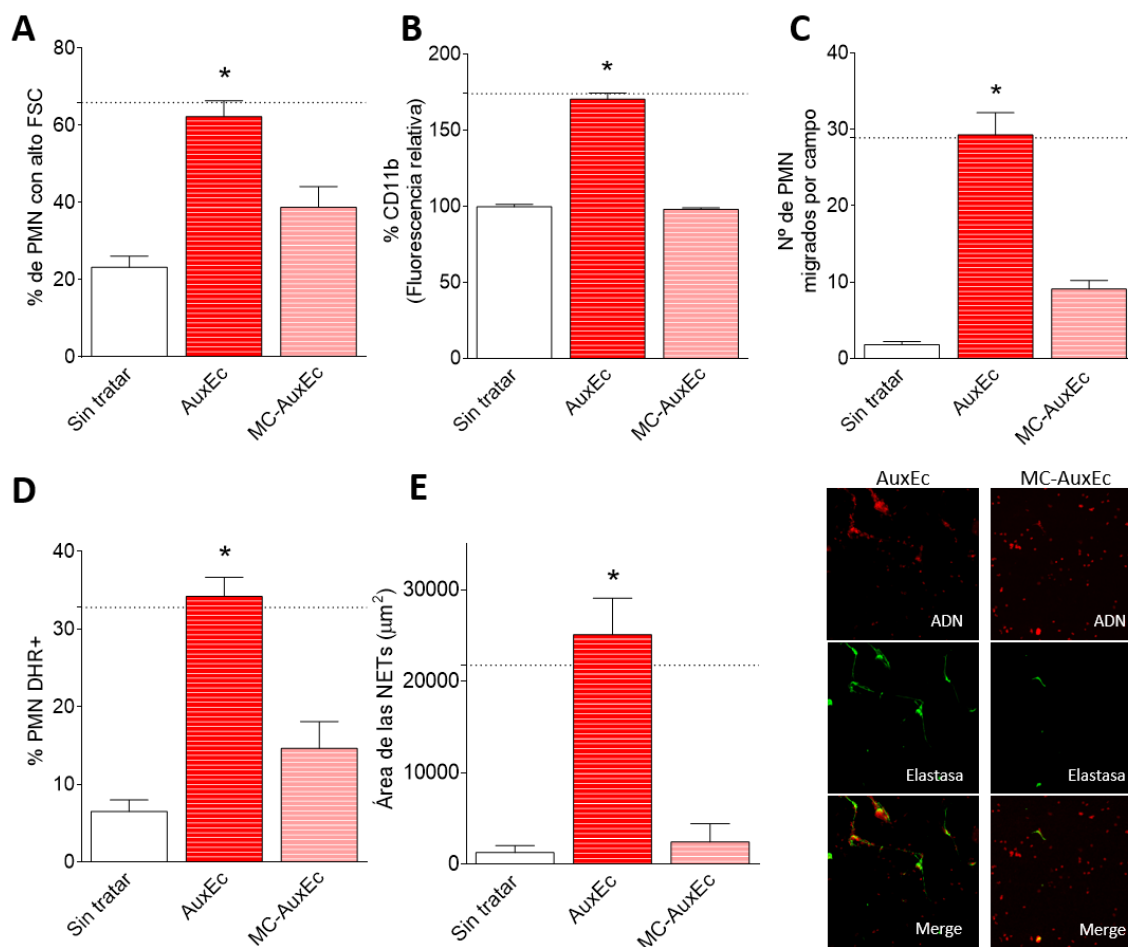
Teniendo en cuenta que la tasa de división de *E. coli* es de aproximadamente 20 minutos (Cooper & Helmstetter, 1968) y debido a la posibilidad de que las diferencias observadas en la respuesta frente a bacterias vivas o muertas pudieran atribuirse al crecimiento bacteriano, utilizamos una cepa de *E. coli* auxótrofa para triptófano: ZIP2286B (AuxEc). Cabe destacar la importancia de este ensayo especialmente durante la netosis donde el periodo de incubación con las bacterias es de 3 horas.

Considerando que la cepa auxótrofa necesita un medio con presencia de triptófano para poder dividirse, se repitieron todos los experimentos en PBS 1X y en ausencia total de suero fetal bovino. Bajo estas condiciones, se chequeó que efectivamente la AuxEc no fuera capaz de dividirse durante el lapso de 30 minutos y 3 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> midiendo el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de agar McConkey (UFC totales: Tiempo inicial =  $5.2 \times 10^6$ , 30 min =  $4.8 \times 10^6$ , 3 h =  $5.5 \times 10^6$ ). Por lo tanto, el uso de la cepa auxótrofa asegura que la cantidad de bacteria al final del ensayo sea igual para la bacteria viva y muerta y las diferencias observadas no se deban a un aumento de la carga bacteriana a lo largo del tiempo.

Como se demuestra en la **Figura I.4** las diferencias entre las bacterias auxótrofas vivas (AuxEc) y las muertas por calor (MC-AuxEc) fueron estadísticamente significativas para todos los parámetros anteriormente analizados.

Sumado a esto, los valores alcanzados en cada uno de los ensayos por el grupo AuxEc fueron similares a los observados previamente cuando

se utilizó Ec, lo cual se denota con la línea punteada en cada uno de los parámetros estudiados.

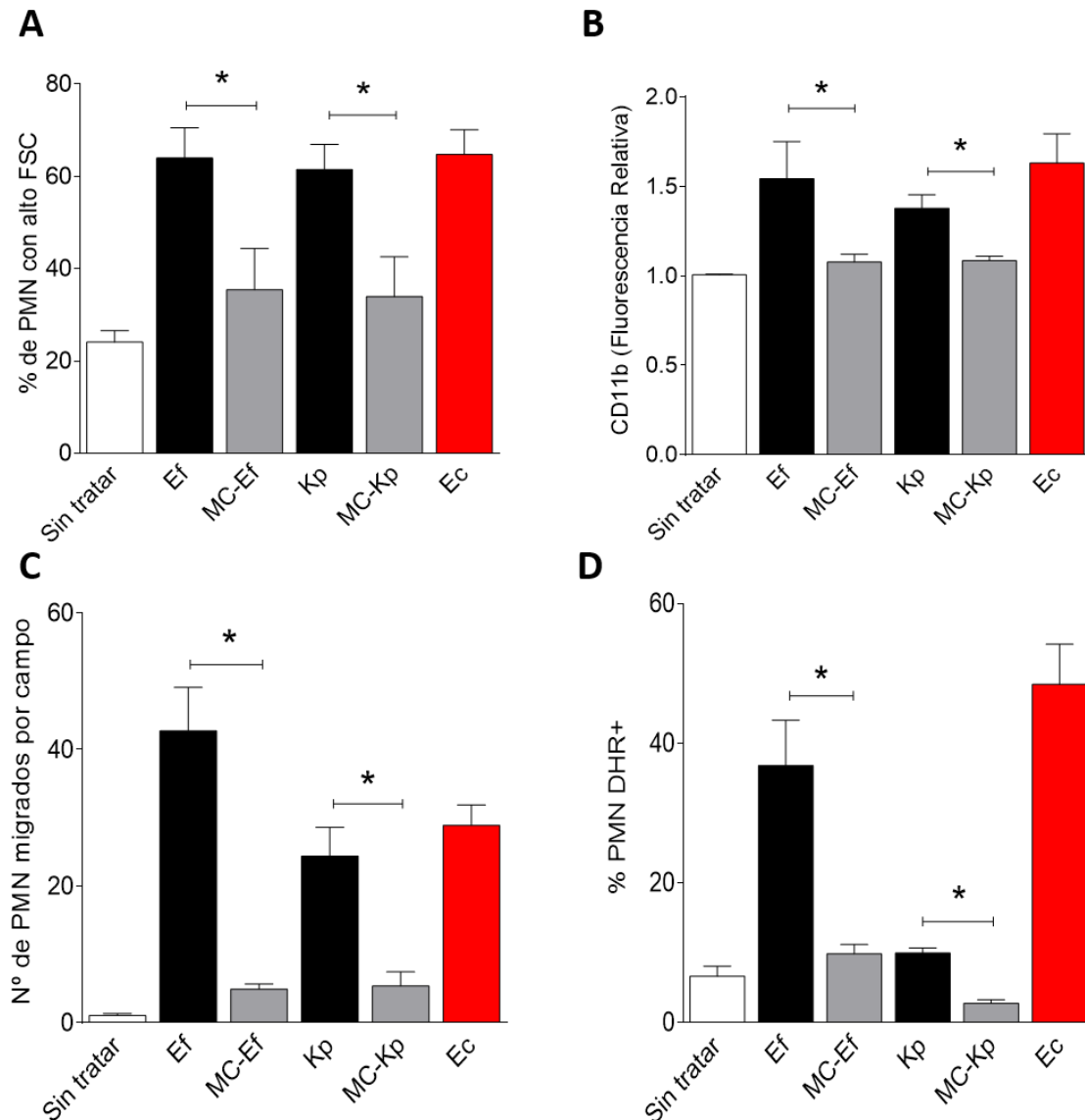


**Figura I.4: La activación de los PMN no depende del crecimiento bacteriano.** Los PMN fueron desafiados con Ec auxótrofa. (AuxEc) o Ec auxótrofa muerta por calor (MC-AuxEc). Para todos los parámetros analizados la línea puntuada denota los valores alcanzados por la bacteria viva no auxótrofa (Ec). **A)** Porcentaje de PMN con alto FSC. **B)** Expresión de CD11b. **C)** PMN migrados a través de una membrana con poros de 3 µm utilizando una cámara de Boyden. **D)** Generación de ROS. **E)** Formación de NETs. *Panel derecho:* Microfotografías representativas de imágenes confocales que muestran los PMN de los grupos AuxEc y MC-AuxEc (x 200). Los resultados se expresaron como la media ± ES, n=5, \*p<0.05 vs los demás grupos.

Para determinar si la capacidad de los PMN de censar la viabilidad bacteriana es exclusiva para *E coli*, utilizamos otra especie de bacteria Gram negativa: *Klebsiella pneumoniae* (Kp) y una bacteria Gram positiva: *Enterococcus faecalis* (Ef).

Como se observa en la **Figura I.5**, evaluando el aumento del tamaño celular, la expresión de CD11b, quimiotaxis y generación de ROS, demostramos que el fenómeno de reconocimiento de la viabilidad bacteriana

por parte del PMN podría extenderse a otras especies bacterianas, dado que en todos los casos se observan diferencias estadísticamente significativas entre bacterias vivas y muertas tanto con Kp como con Ef.



**Figura 1.5: Diferencias en la respuesta de los PMN frente a desafíos con bacterias vivas y muertas de diferentes especies.** Los PMN fueron incubados en una relación 1:20 con *Klebsiella pneumoniae* viva y muerta por calor (Kp y MC-Kp) y con *Enterococcus faecalis* viva y muerta por calor (Ef y MC-Ef). **A)** Porcentaje de PMN con alto FSC. **B)** Expresión de CD11b. **C)** PMN migrados a través de una membrana con poros de 3  $\mu$ m utilizando una cámara de Boyden. **D)** Generación de ROS. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  ES, n=6, \*p<0.05.



En conjunto, estos resultados demuestran que únicamente las bacterias vivas son capaces de inducir una fuerte respuesta de los PMN, lo que sugiere la existencia de ciertos determinantes asociados con la viabilidad bacteriana, los cuales son necesarios para desencadenar la activación de los PMN.

### **3. La muerte de la bacteria conlleva a la pérdida del contenido de ARN**

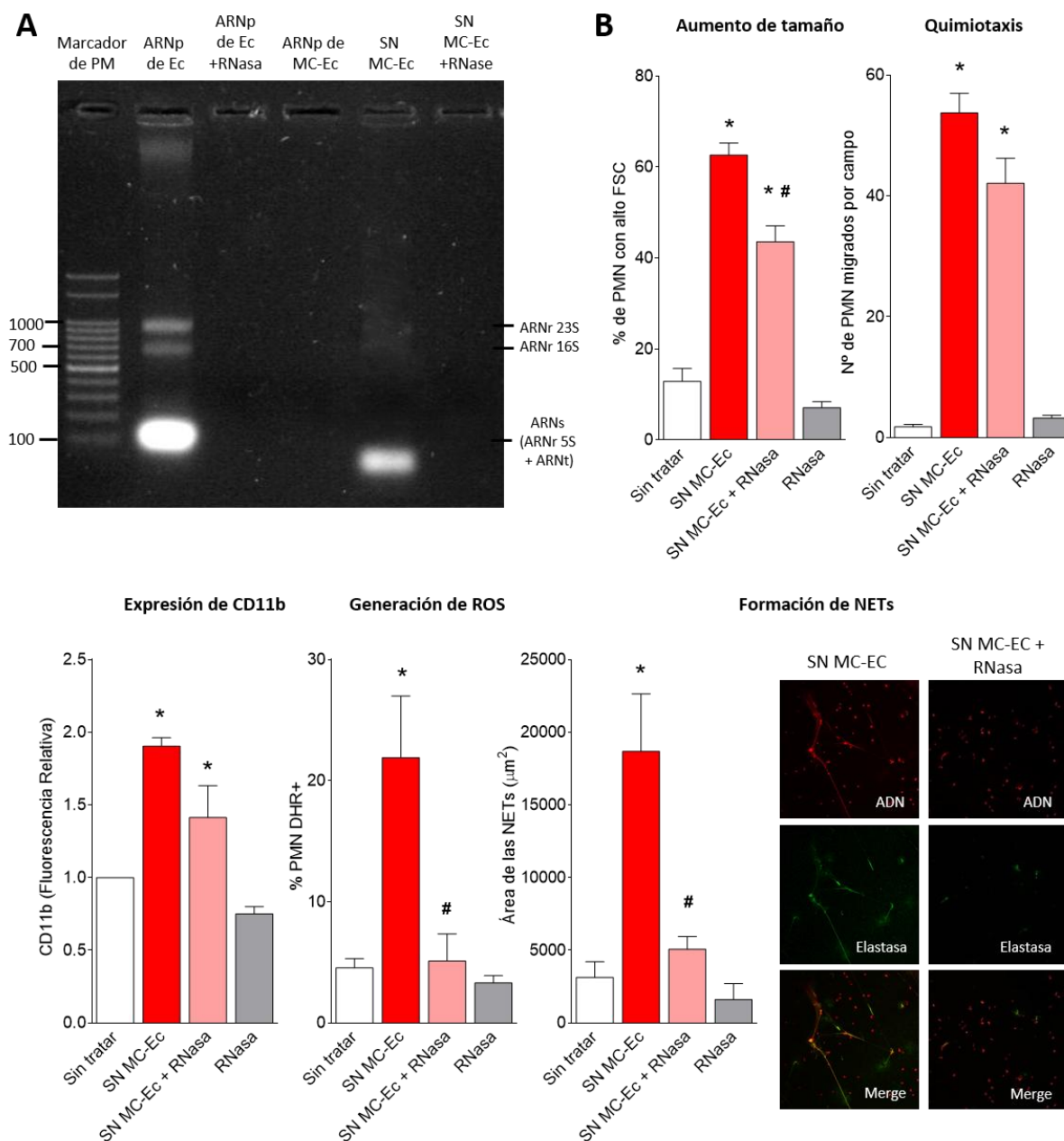
Teniendo en cuenta que el ARN procariota (ARNp) ha sido reportado como un PAMP asociado a la viabilidad bacteriana que puede ser reconocido por macrófagos (Sander et al., 2012), nos propusimos estudiar si las diferencias observadas en la respuesta de los PMN frente a bacterias vivas y muertas se debían a diferencias en su contenido de ARN.

Para este propósito, extrajimos ARN total de Ec y de MC-Ec utilizando RNazol. Como muestra la **Figura I.6 A**, las extracciones de ARN realizadas a Ec viva (ARNp de Ec) mostraron el patrón de bandas típico para ARN total bacteriano observado en una electroforesis en gel de agarosa: tres bandas, dos correspondientes a ARN ribosomal de 23S y 16S y una banda intensa de ARNs pequeños donde encontramos ARNs de transferencia y ribosomal de 5S. Como control para verificar la correcta extracción del ARN se utilizó un tratamiento con RNasa, encontrándose que todas las bandas desaparecieron luego del tratamiento con RNasa (ARNp de Ec + RNasa). Sorprendentemente, el ARN no pudo ser aislado cuando el protocolo de extracción se realizó sobre las bacterias muertas por calor MC-Ec (ARNp de MC-Ec). Recordemos que luego del tratamiento térmico las bacterias fueron lavadas. Esto se verificó tanto por electroforesis en gel de agarosa, como por medición a 260 nm en espectrofotómetro, obteniéndose valores cercanos a cero. Por otro lado, el sobrenadante de MC-Ec (SN MC-Ec) muestra una banda de menor peso molecular que se perdió por completo cuando fue tratada con RNasa (SN MC-Ec + RNasa).

Esto demuestra que la muerte bacteriana por el tratamiento térmico induce la liberación de ARNp al medio extracelular, lo que sugiere que la activación de PMN dependiente de la viabilidad bacteriana podría estar asociada con la presencia de ARN en las bacterias vivas.

En concordancia con lo observado en la electroforesis en gel de agarosa, cuando utilizamos los sobrenadantes provenientes de las bacterias muertas (SN MC-Ec) para estimular los PMN, encontramos que los mismos fueron capaces de inducir un aumento en el tamaño celular, un incremento en la expresión del CD11b, aumento de la quimiotaxis y de la generación de ROS y NETs (**Figura I.6 B**). El tratamiento de estos sobrenadantes con RNasa fue capaz de abolir completamente los efectos observados en la generación de ROS y NETs, disminuir parcialmente el aumento de tamaño celular, pero no tuvo ninguna influencia sobre la quimiotaxis o el aumento en la expresión del CD11b.

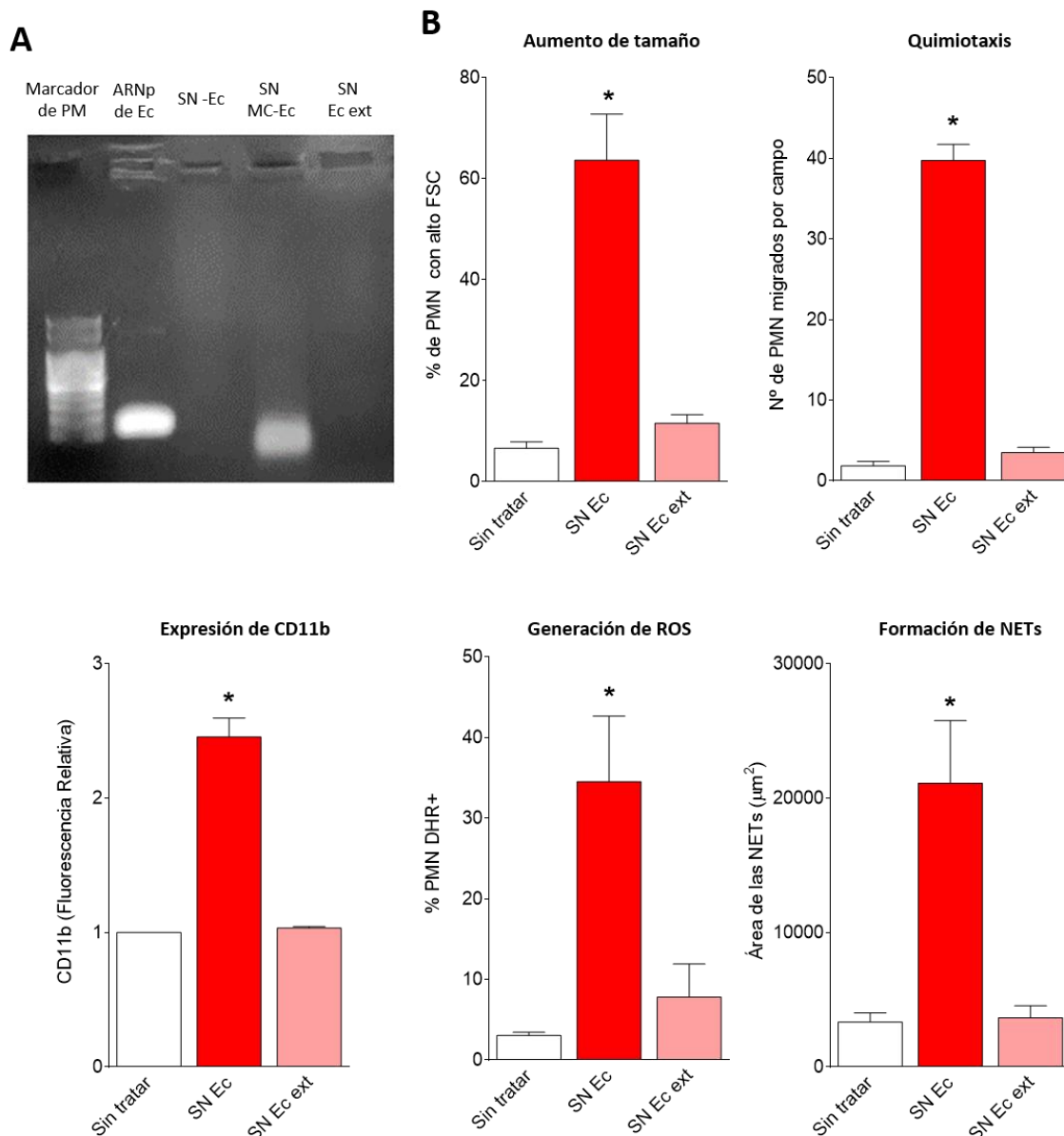
Estos resultados indican que el ARNp liberado al medio extracelular luego de la muerte bacteriana es crucial para desencadenar las respuestas bactericidas observada en los PMN. Además, como el aumento en parámetros que están más relacionados con procesos iniciales de la activación de los PMN se observa aún luego de la digestión con RNasa, es posible que otros factores liberados en el sobrenadante o incluso los productos de degradación del ARN pudieran estar mediando estos efectos.



**Figura I.6: La muerte de la bacteria causa liberación del ARN.** **A)** Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular: 100 bp Plus DNA ladder. **B)** La activación de los PMN fue determinada midiendo diferentes funciones: aumento del tamaño celular, quimiotaxis, incremento de la expresión de CD11b, generación de ROS y formación de NETs y utilizando como estímulo sobrenadante libre de bacterias de MC-Ec (SN MC-Ec) o tratados con RNasa (SN MC-Ec + RNasa) y RNasa sola como control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES n=5. \* $p < 0.05$  vs. PMN sin tratar, # $p < 0.05$  vs. SN MC-Ec.

Asimismo, se analizó qué sucedía con los sobrenadantes, pero esta vez obtenidos a partir de la bacteria viva Ec (SN Ec). Como se observa en la **Figura I.7**, estos sobrenadantes también produjeron activación de los PMN y desencadenaron respuestas bactericidas. Sin embargo, no se pudo detectar

ARNp en estos sobrenadantes mediante electroforesis en gel de agarosa ni por medición en espectrofotómetro a 260 nm (**Figura I.7 A**). Asimismo, tampoco se pudo detectar ARNp en estos sobrenadantes (SN Ec ext) después de un protocolo de extracción de ARN, y estas preparaciones no fueron capaces de desencadenar ninguna respuesta en los PMN (**Figura I.7 B**).

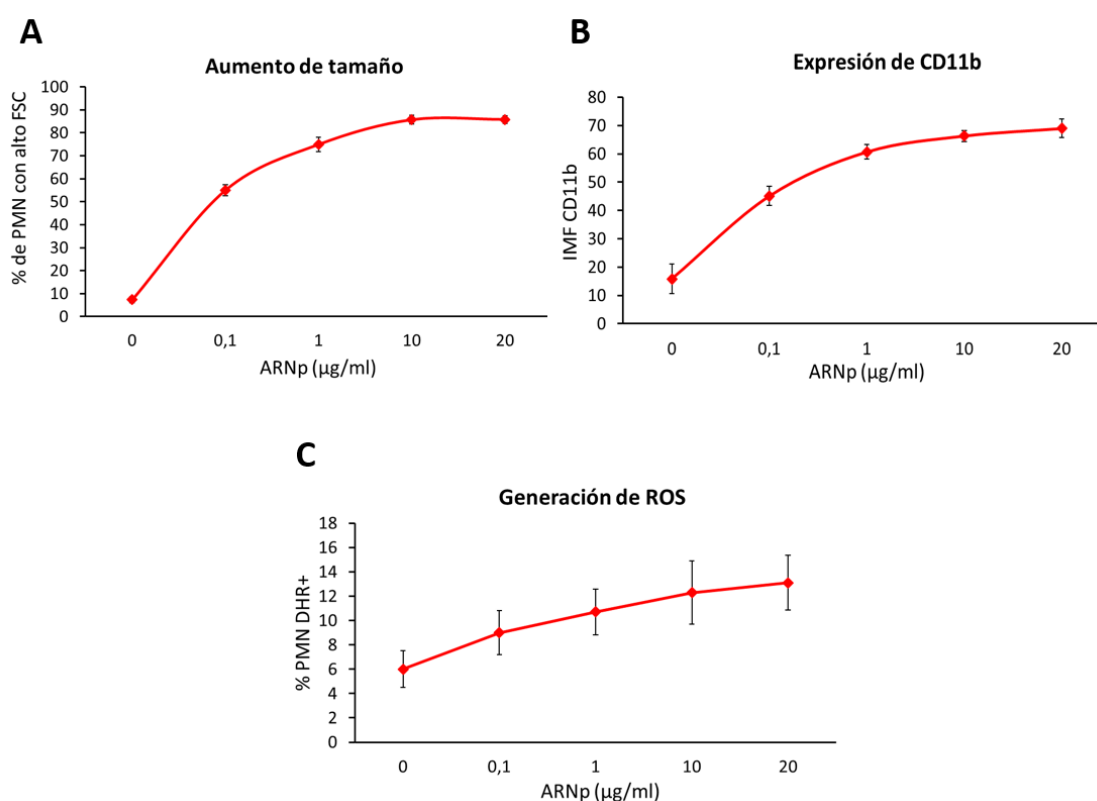


**Figura I.7: Moléculas presentes en el sobrenadante de las bacterias vivas también inducen activación de los PMN.** Los sobrenadantes de Ec (SN Ec) y las extracciones de ARN realizadas a partir de estos sobrenadantes (SN Ec ext) fueron usados como estímulos. **A)** Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular: 100 bp Plus DNA ladder. **B)** La activación de los PMN fue determinada midiendo diferentes funciones: aumento del tamaño celular, quimiotaxis, incremento de la expresión de CD11b, generación de ROS y formación de NETs. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES n=3. \* $p < 0.05$  vs. PMN sin tratar y vs. SN Ec ext.

Estos resultados indican que las bacterias vivas también pueden liberar mediadores, diferentes al ARN, que producen activación de los PMN. Sin embargo, estos mediadores no se co-purifican en el proceso de extracción del ARN.

#### **4. El ARN procariota activa los PMN**

De acuerdo a los resultados arriba mencionados y con el fin de estudiar los efectos directos del ARNp sobre los PMN, realizamos extracciones de ARN total de *Ec*, las cuales se utilizaron como estímulo frente a los PMN. En una primera instancia, diferentes cantidades de ARNp fueron utilizadas para determinar si la activación de los PMN mediada por el ARNp se comporta de manera dosis dependiente. Analizamos el cambio en el tamaño celular, la expresión de CD11b y la generación de ROS en los PMN frente a diferentes dosis de ARNp. Como se observa en la **Figura I.8**, el ARNp induce un aumento de todos los parámetros evaluados de forma dosis dependiente. Utilizando estos resultados elegimos una dosis de 10 µg/ml para realizar los futuros experimentos considerando que es la mínima dosis con la que se logra un aumento importante en todos los parámetros evaluados.



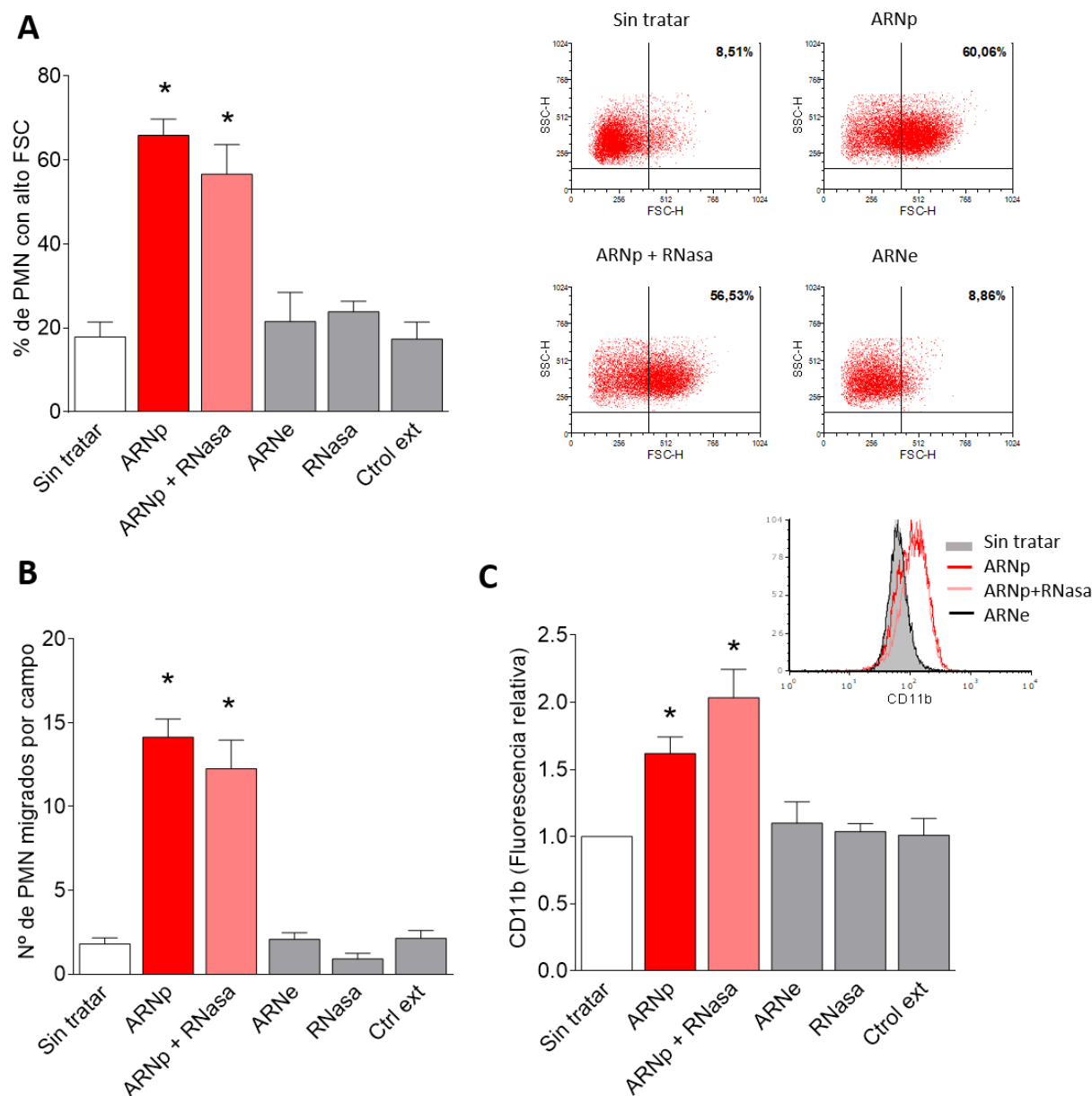
**Figura I.8: Curvas dosis-respuesta utilizando PMN desafiados con diferentes concentraciones de ARNp. A)** Porcentaje de PMN con FSC alto. **B)** Intensidad media de fluorescencia de la integrina CD11b. **C)** Porcentaje de PMN DHR+. Todos los datos fueron generados mediante citometría de flujo, los resultados se expresaron como la media  $\pm$  ES, \* $p < 0.05$  vs MC-Ec,  $n = 3$ .

De manera similar a lo descrito con la bacteria viva Ec, evaluamos el efecto del ARNp sobre distintos parámetros de activación del PMN, y comparamos los resultados con un control de extracción (Ctrol Ext), para descartar posibles efectos residuales de los reactivos químicos presentes en el reactivo utilizado en la extracción (fenol y tiocianato de guanidina). Para realizar este control se llevó a cabo el mismo protocolo de extracción, pero partiendo de una solución libre de bacterias. Observamos que el ARNp induce un incremento en el tamaño celular, en la quimiotaxis, en la expresión de CD11b, en la generación de ROS y en la formación de NETs (**Figura I.9** y **Figura I.10**), y en ninguno de los casos el Ctrol Ext indujo una respuesta del PMN. Este resultado indica que, de existir alguna mínima contaminación con los químicos utilizados en la extracción, la misma sería despreciable en cuanto al efecto causado sobre los PMN.

Para una mayor caracterización de los efectos inducidos por el ARNp, primero nos preguntamos si el fenómeno observado era exclusivo para ARN de origen procariota. En este sentido, utilizamos ARN eucariota (ARNe) extraído a partir de mononucleares humanos de sangre periférica, el cual fue incapaz de generar una activación en los PMN.

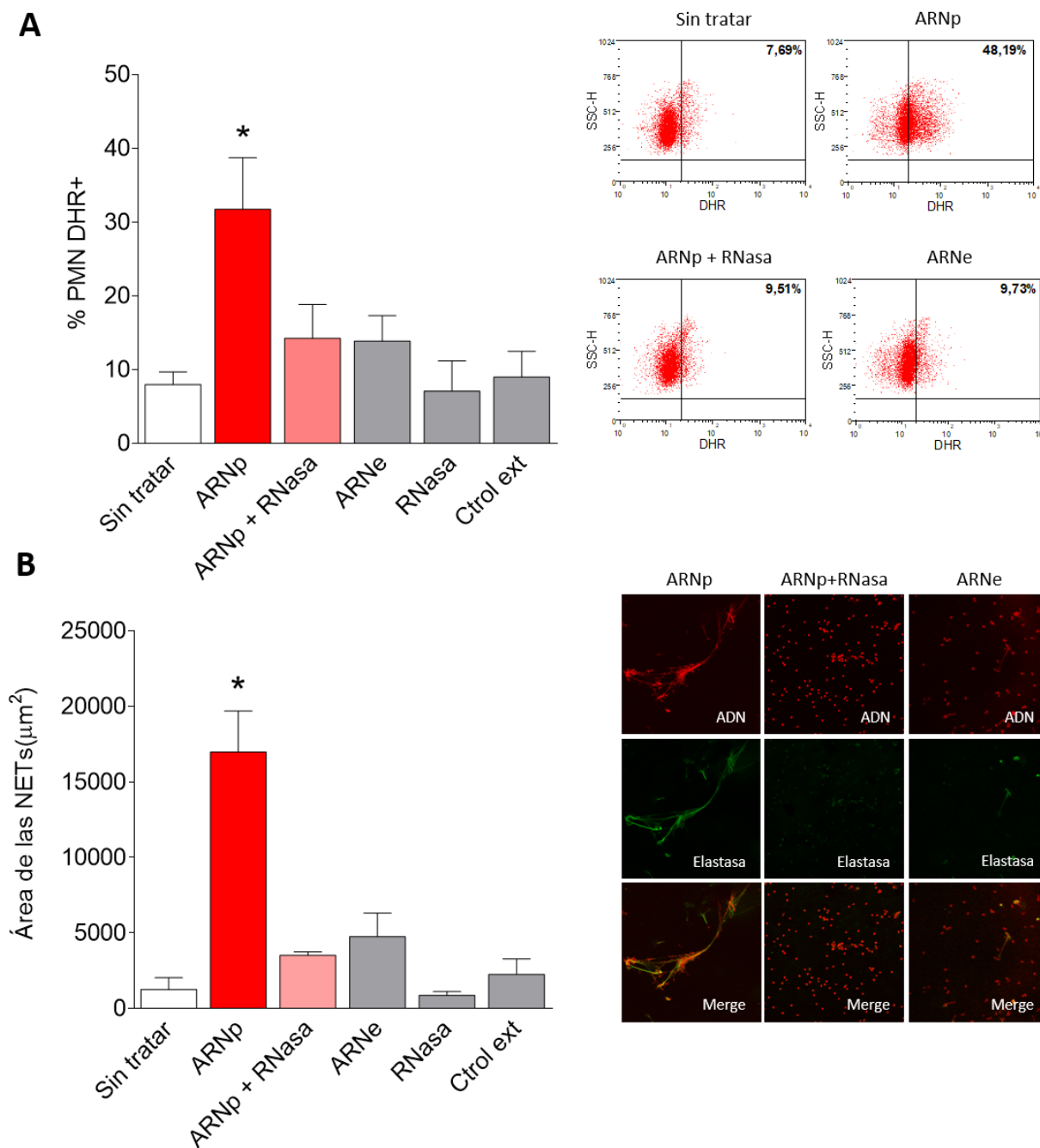
Al mismo tiempo, y en concordancia con lo observado cuando utilizamos el sobrenadante de MC-Ec, la degradación del ARNp por medio de RNasa suprimió los efectos de generación de ROS y formación de NETs (**Figura I.10**), aunque el ARN degradado todavía fue capaz de inducir un aumento en el tamaño de los PMN, aumento en la expresión de CD11b y quimiotaxis (**Figura I.9**). La correcta degradación del ARNp fue corroborada en cada experimento mediante visualización en gel de agarosa (como se mostró en la **Figura I.6 A**) y el control de RNasa no tuvo ningún efecto en la respuesta de los PMN.

Estos resultados en conjunto indican que el ARNp, pero no el ARNe, es un estímulo capaz de activar de manera directa a los PMN. Además, el ARNp, incluso cuando está degradado, puede estimular las funciones de los PMN implicadas en el movimiento y la degranulación (cambio de forma, aumento del CD11b y quimiotaxis), mientras que otras funciones implicadas en mecanismos bactericidas (ROS y NETs) necesitan moléculas de ARNp más conservadas.



**Figura I.9: El ARN procariota (ARNp) activa directamente los PMN.** Los PMN aislados fueron tratados con ARNp, ARN eucariota (ARNe) o ARNp tratado con RNasa (ARNp+RNasa). También se incluyeron controles de RNasa sola o un control de extracción (Ctról ext), utilizando agua en lugar de bacterias. **A)** Porcentaje de PMN con alto FSC. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  ES,  $n=15$ . *Panel derecho:* diagramas de densidad representativos de SSC vs. FSC. **B)** Ensayo de quimiotaxis. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  ES,  $n=7$ . **C)** Expresión de CD11b. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  ES de la fluorescencia relativa de los diferentes tratamientos con respecto al PMN sin tratar.  $n=15$ . *Panel derecho:* histograma representativo de la expresión de CD11b. En todos los casos \*  $p < 0.05$  vs. sin tratar, ARNe, RNasa y Ctról ext.

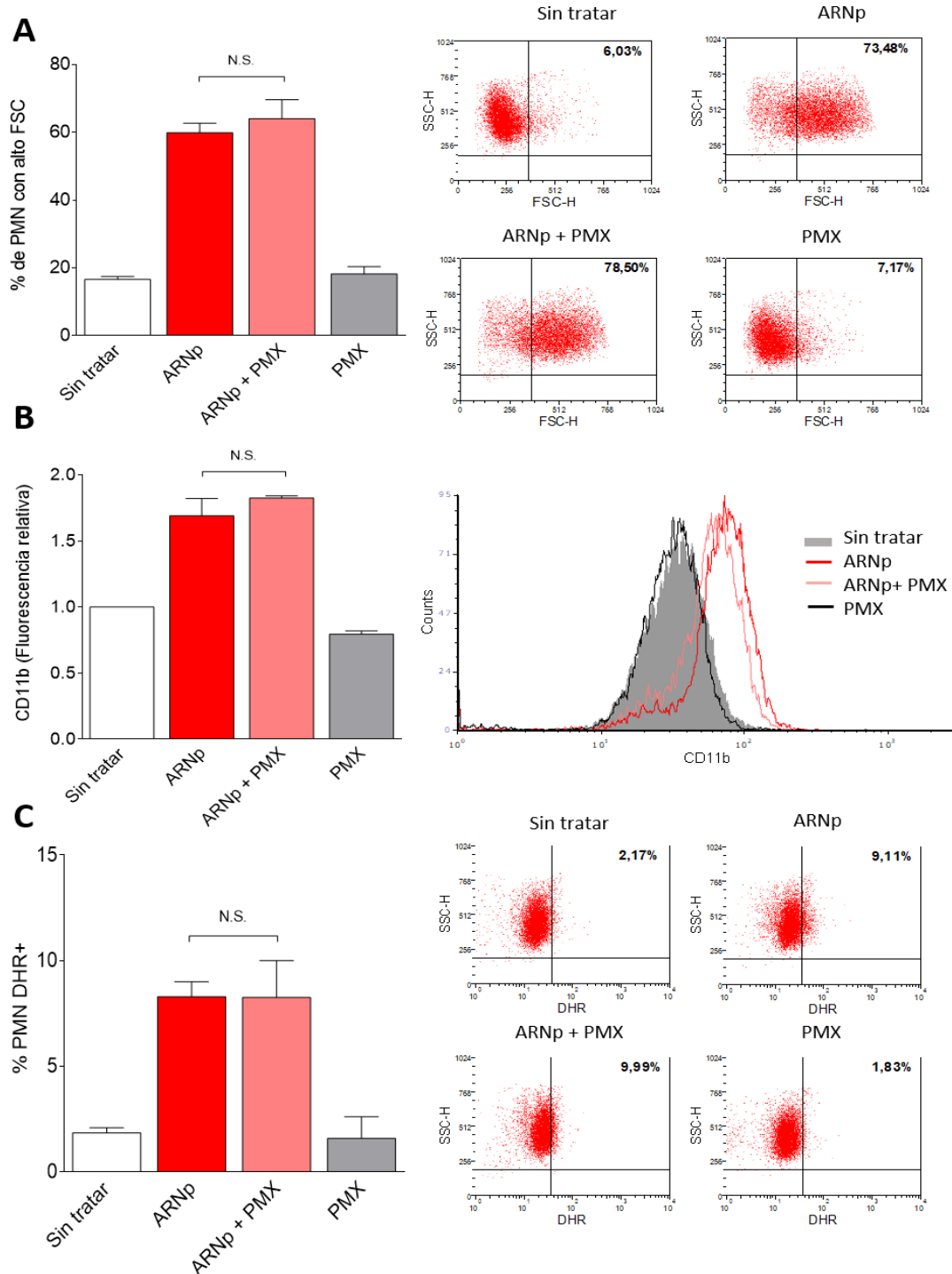




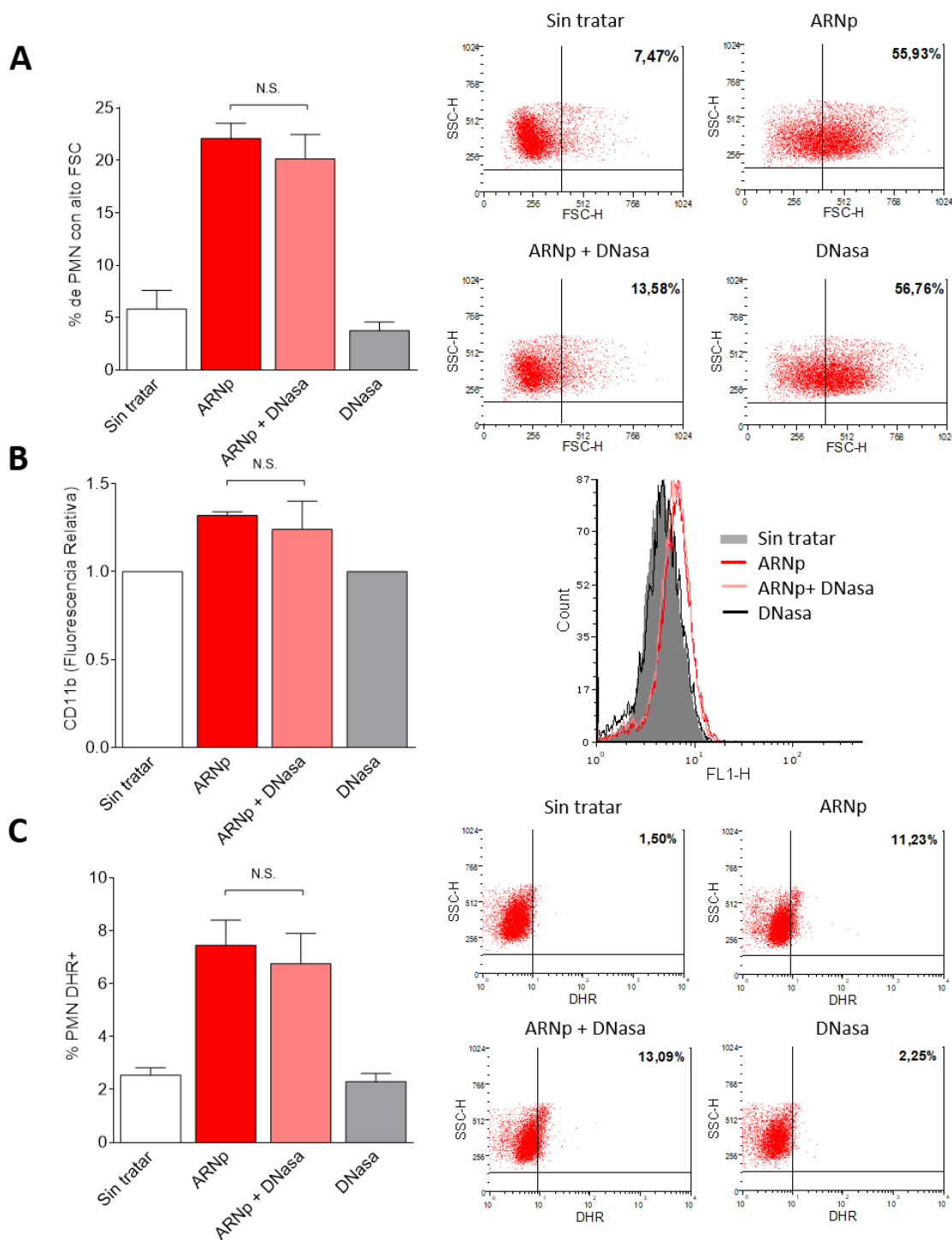
**Figura I.10: El ARNp genera respuestas bactericidas en los PMN.** Los PMN aislados fueron tratados con ARNp, ARN eucariota (ARNe) o ARNp tratado con RNasa (ARNp+RNasa). También se incluyeron controles de RNasa sola o un control de extracción (Ctrol ext), utilizando agua en lugar de bacterias. **A)** Producción de ROS. Porcentaje de PMN DHR+. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  ES,  $n=8$ . *Panel derecho:* diagramas de densidad representativos de SSC vs. DHR. **B)** Formación de NETs. Los valores de área de las NETs obtenidos a partir de imágenes de microscopía confocal se expresaron como la media  $\pm$  ES,  $n=7$ . *Panel derecho:* Microfotografías confocales representativas, el ADN se marcó con ioduro de propidio y la elastasa con un anticuerpo específico. En todos los casos \*  $p<0.05$  vs. todos los otros grupos.

Para descartar la posibilidad de que los resultados obtenidos en las Figuras I.9 y I.10 fueran producto de posibles contaminantes del ARNp, como el LPS o el ADN, y que éstos hubieran permanecido incluso después del protocolo de extracción de ARNp, la activación de los PMN fue analizada en respuesta a los tratamientos con ARNp, ARNp+polimixina B (PMX, inhibidor del LPS) o ARNp+DNasa (degradación del ADN) como se muestra en las **Figuras I.11** y **Figura I.12**, respectivamente.

La presencia de polimixina B o el tratamiento con ADN no modificaron los incrementos observados en el tamaño celular, la expresión de CD11b o la producción de ROS inducidos por el ARNp, descartando así la posibilidad de que una contaminación con LPS o ADN presente en nuestras preparaciones de ARNp, estuvieran mediando la activación observada en los PMN.



**Figura I.11: El tratamiento con Polimixina B (PMX, 7  $\mu$ g/ml) no afecta la respuesta de los PMN desencadenada por el ARNp. A) Porcentaje de PMN con FSC alto. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  ES. *Panel derecho:* diagramas de densidad representativos de SSC vs. FSC. B) Intensidad media de fluorescencia de CD11b. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  ES. Valores de la IMF de los diferentes tratamientos con respecto al PMN sin tratar. *Panel derecho:* histograma representativo de la expresión de CD11b. C) Producción de ROS. Porcentaje de PMN DHR+. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  ES. *Panel derecho:* diagramas de densidad representativos de SSC vs. DHR. Todos los datos fueron generados mediante citometría de flujo, n=3.**

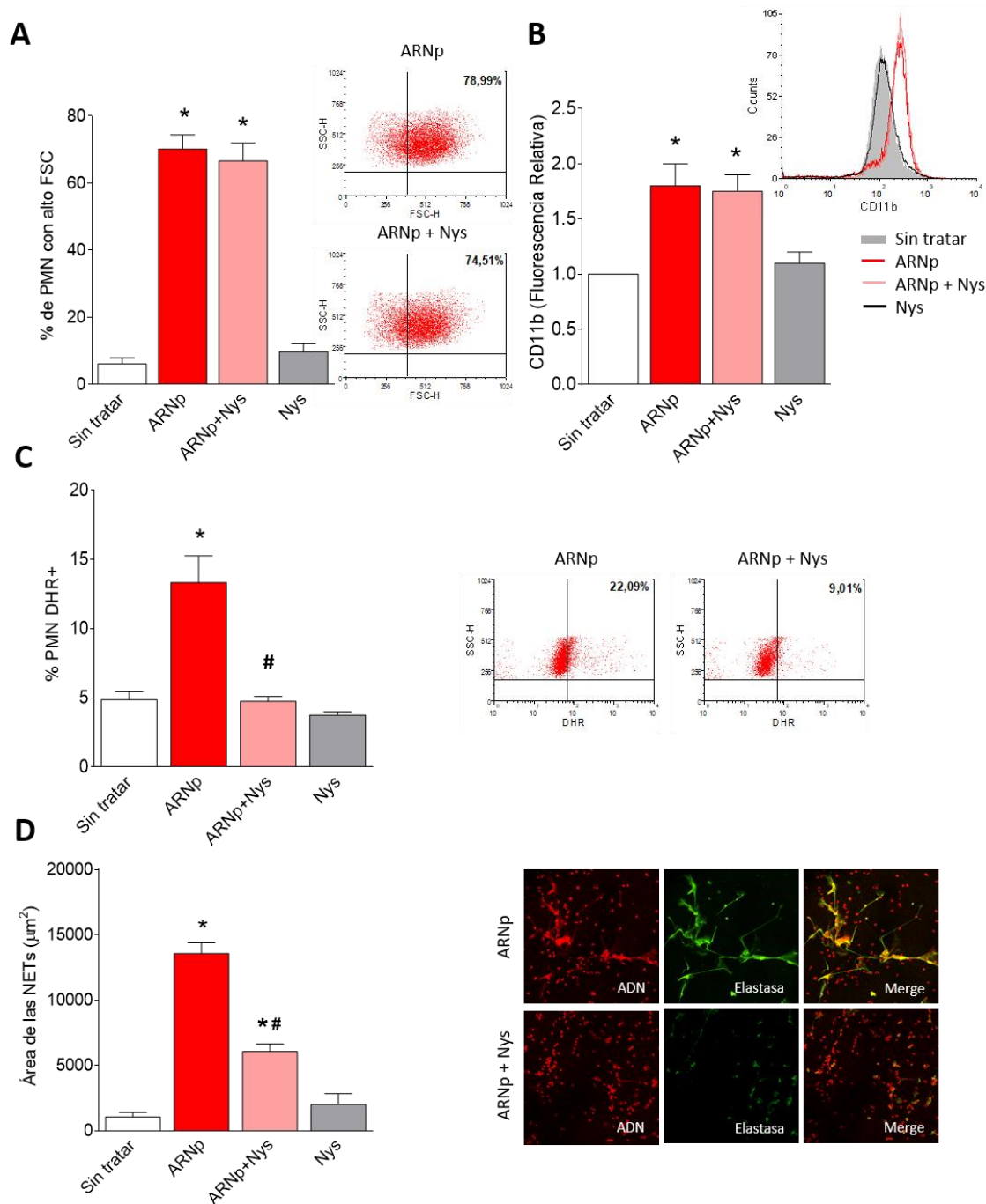


**Figura I.12: El tratamiento con DNasa no afecta la respuesta de los PMN desencadenada por el ARNp.** **A)** Porcentaje de PMN con FSC alto. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  ES. *Panel derecho:* diagramas de densidad representativos de SSC vs. FSC. **B)** Intensidad media de fluorescencia de CD11b. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  ES. Valores de la IMF de los diferentes tratamientos con respecto al PMN sin tratar. *Panel derecho:* histograma representativo de la expresión de CD11b. **C)** Producción de ROS. Porcentaje de PMN DHR+. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  ES. *Panel derecho:* diagramas de densidad representativos de SSC vs. DHR. Todos los datos fueron generados mediante citometría de flujo,  $n=3$ .

## 5. Mecanismos implicados en la activación de PMN inducida por el ARNp

Como los receptores implicados en el reconocimiento de ARN son mayoritariamente de ubicación intracelular (Akira & Hemmi, 2003), nos preguntamos si la internalización del ARNp por parte de los PMN es un paso necesario para desencadenar la activación de los mismos.

Para este propósito, repetimos los experimentos con ARNp en presencia de Nistatina, un agente anti-fúngico, que inhibe la endocitosis mediada por caveolas (Anderson, Chen, & Norkin, 1996; Rothberg et al., 1992). Los PMN fueron pre-tratados con Nistatina (Nys) durante un periodo de 15 minutos y luego incubados con ARNp (ARNp+Nys). Como se muestra en la **Figura I.13**, el tratamiento con Nistatina no afectó el cambio en el tamaño celular ni la expresión del CD11b. Sin embargo, cuando la endocitosis fue bloqueada se inhibió por completo la generación de las respuestas bactericidas inducidas por el ARNp, como son la producción de ROS y la formación de NETs.

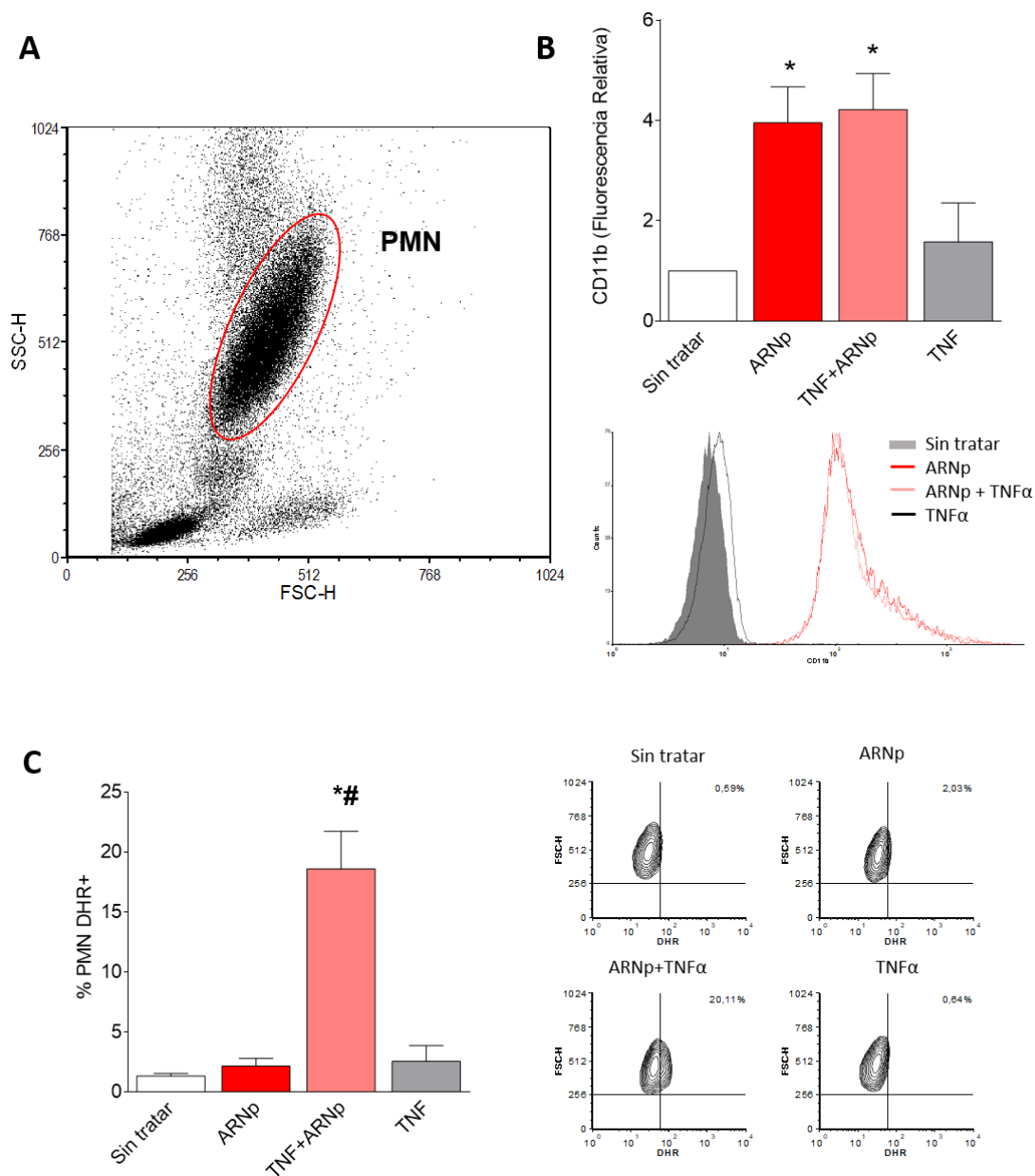


**Figura 1.13: La endocitosis del ARNp es necesaria para desencadenar respuestas bactericidas.** PMN purificados fueron incubados con ARNp en presencia o no del inhibidor de la endocitosis Nistatina (Nys). **A**) Porcentaje de PMN con alto FSC. *Panel derecho:* Diagramas de densidad representativos mostrando SSC vs. FSC de PMN incubados con ARNp o ARNp+Nys. **B**) Expresión de CD11b, expresado como la fluorescencia relativa de la IMF de los diferentes tratamientos con respecto al control sin tratar. *Panel derecho:* Histograma representativo de la expresión de CD11b en los diferentes tratamientos. **C**) Generación de ROS. *Panel derecho:* Diagrama de densidad representativos mostrando el porcentaje de PMN DHR+ en los diferentes tratamientos. **D**) Formación de NETs. *Panel derecho:* Microfotografías representativas de imágenes de microscopía confocal (x 200). Los resultados se expresaron como las medias  $\pm$  ES, n=5. En todos los casos \* p<0.05 vs. sin tratar y # p<0.05 vs. ARNp.

Debido a que el proceso de purificación a partir de sangre periférica puede llevar a los PMN a un estado de pre-activación basal (Watson, Robinson, & Edwards, 1992) y con el fin de investigar si los efectos de ARNp se producen tanto en PMN en estado de reposo o requieren un mecanismo de *priming* previo, analizamos las respuestas de los PMN frente al ARNp en sangre entera en presencia o no de TNF- $\alpha$  como molécula pre-estimuladora.

Desafortunadamente, por razones metodológicas, no todos los ensayos realizados a partir de PMN purificados se pueden llevar a cabo en sangre entera. Sin embargo, como se muestra en la **Figura I.14** hemos podido medir la expresión de CD11b y la producción de ROS. El aumento en la expresión de CD11b fue inducido por el ARNp en sangre entera sin la necesidad de una pre-activación con TNF- $\alpha$ . Sin embargo, para que el ARNp induzca generación de ROS se requirió una activación previa del PMN con TNF- $\alpha$ .

Estos resultados indican que tanto la endocitosis del ARNp como el *priming* de los PMN son necesarios para desencadenar respuestas bactericidas, pero no lo son para generar aquellas respuestas relacionadas con la activación y movilización de los PMN.



**Figura I.14: La inducción de ROS por parte del ARNp requiere de un *priming* previo. A)** Histograma de densidad representativo mostrando las diferentes poblaciones celulares en sangre entera luego de la lisis de los eritrocitos, la elipse muestra la población perteneciente a los PMN. **B)** La sangre entera fue incubada con el ARNp y/o el estímulo de *priming*, TNF- $\alpha$ , por 30 min y la expresión de CD11b fue determinada por citometría de flujo en la región de PMN. *Panel inferior:* Histograma representativo. **C)** La sangre entera fue incubada con DHR 15 min y con los diferentes estímulos por otros 30 min. El porcentaje de PMN DHR+ fue determinado por citometría de flujo en la región de PMN. *Panel derecho:* histogramas de densidad representativos. Los resultados se expresaron como las medias  $\pm$  ES, n=3. En todos los casos \*p<0.05 vs. sin tratar y TNF, #p<0.05 vs. ARNp.



## CAPÍTULO II

Las células endoteliales proporcionan una barrera física entre la circulación y los tejidos. Estas células no sólo tienen funciones especializadas en el mantenimiento de la homeostasis dentro de la circulación y en los tejidos, sino que también tienen un rol inmunológico importante. En estado basal las células endoteliales expresan bajos niveles de moléculas de adhesión, como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), la cual se une a integrinas de tipo CD11a/CD18 o CD11b/CD18, y también sintetiza cuerpos de Weibel-Palade, que son vesículas de almacenamiento especializadas que contienen factor de von Willebrand (vWF).

Sin embargo, las células endoteliales, reaccionan activamente en respuesta al daño físico, una infección o frente a estímulos inmunes promoviendo la liberación de citoquinas y quimioquinas, como IL-8 (van den Berg et al., 1998) y vWF (Kawecki et al., 2017).

Como demostramos en el primer capítulo de esta tesis, las bacterias al morir, liberan ARN al medio extracelular. En este sentido, el ARN<sub>p</sub> aislado fue capaz de inducir varias funciones relacionadas con la activación de PMN. En este capítulo, nos proponemos abordar qué efecto posee el ARN<sub>p</sub> en células endoteliales, y cómo su presencia puede ser capaz de modificar las interacciones que se producen entre ellas y los PMN.

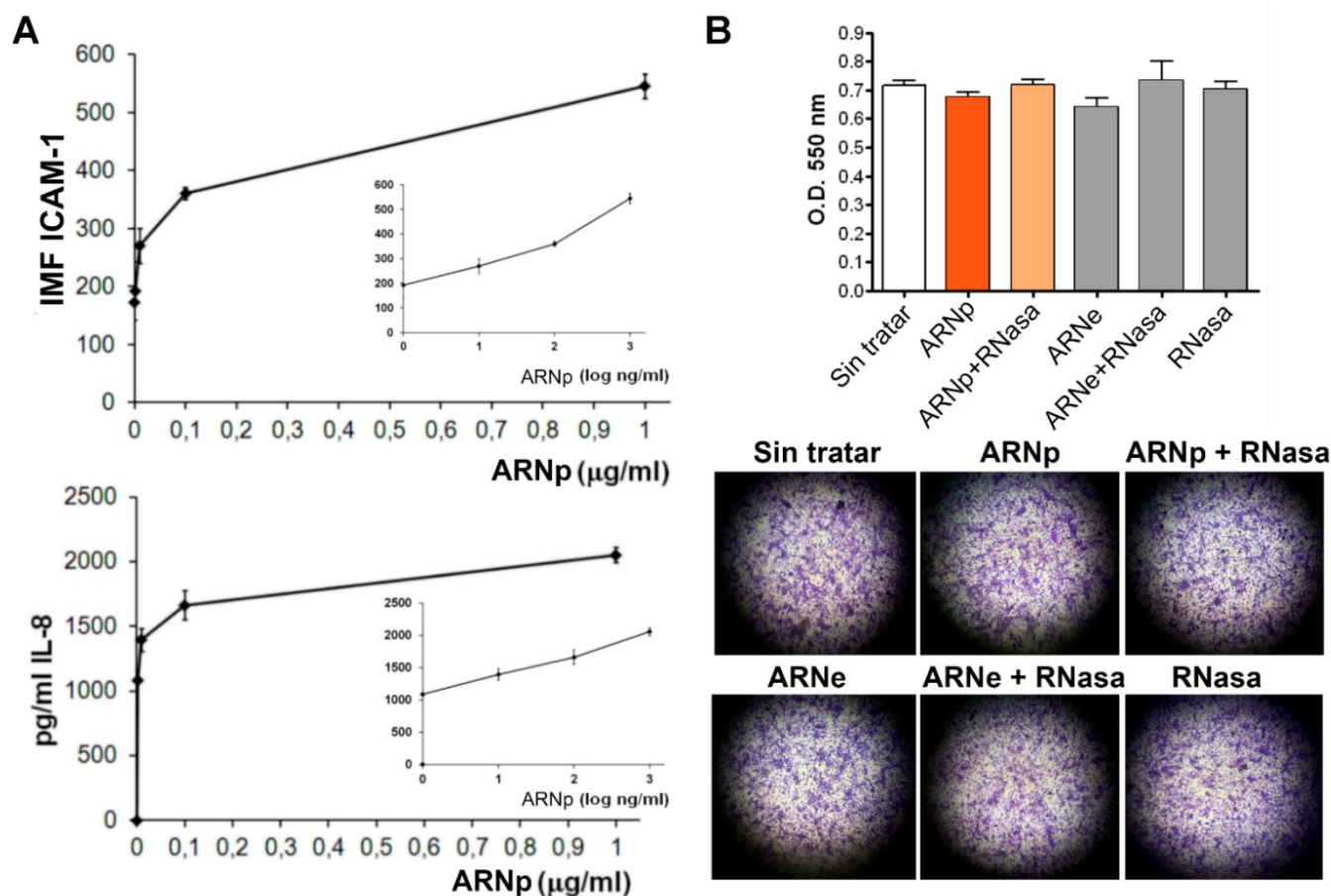
### **1. El ARN<sub>p</sub> activa a las células endoteliales**

Para esta serie de experimentos, se utilizaron células del endotelio vascular humano (HUVEC) obtenidas a partir de muestras de cordón umbilical, como se describe en materiales y métodos. En determinados experimentos se utilizó de manera complementaria la línea celular establecida a partir de microvasculatura endotelial humana (HMEC-1).

En todos los casos, las células endoteliales fueron incubadas con los diferentes estímulos por un periodo de 1,5 horas. Luego las células fueron lavadas y se les añadió medio fresco sin ningún estímulo y se dejó durante un período adicional de 18 h. Luego del tratamiento, se recogió el sobrenadante (medio acondicionado, CM) y se usó inmediatamente para experimentos de estimulación con PMN, o se almacenó para la determinación de IL-8 o vWF mediante ELISA, y las células se utilizaron para la medición de ICAM-1 mediante citometría de flujo.

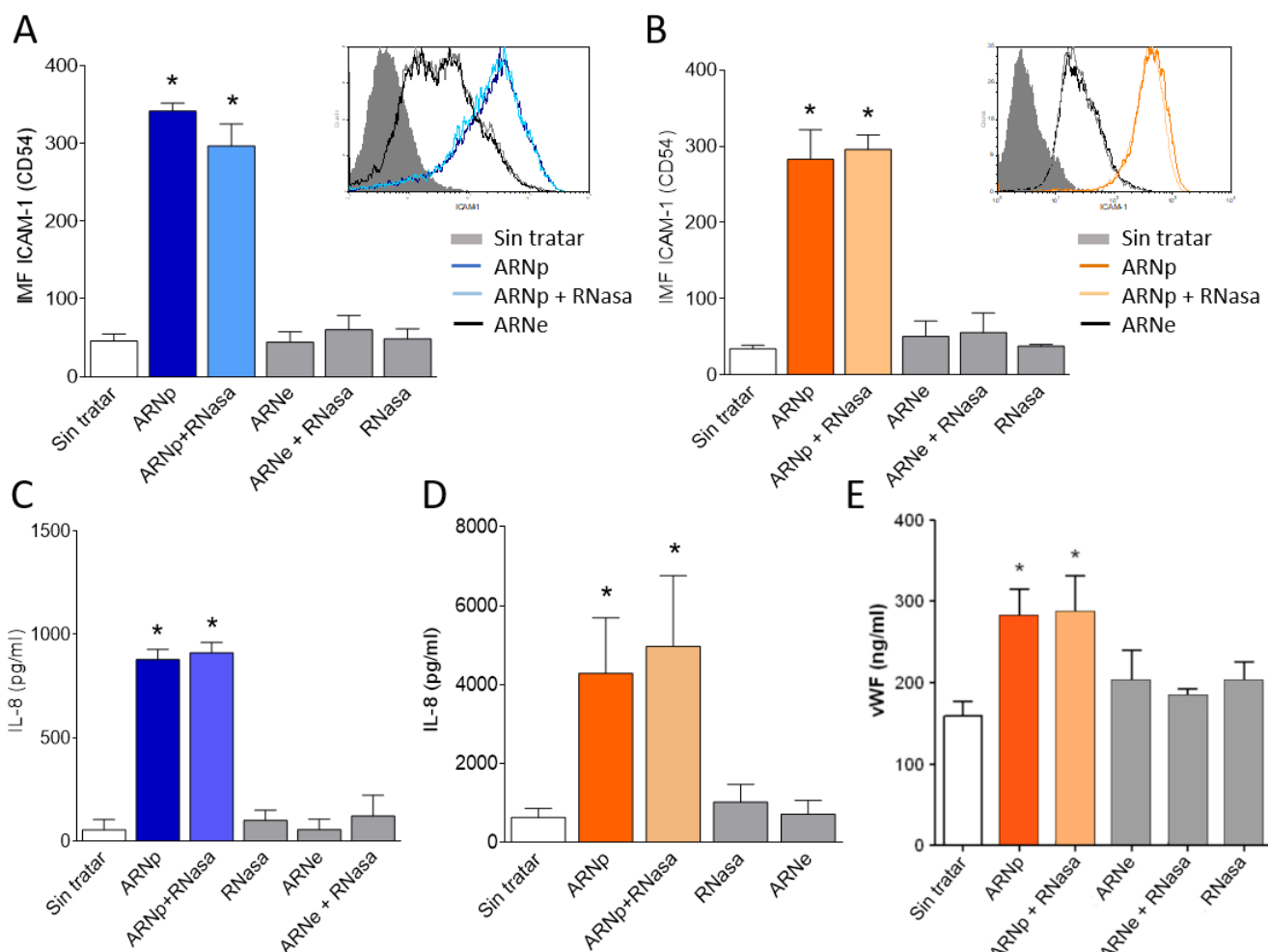
Como primera medida, y como se observa en la **Figura II.1**, se comprobó que en presencia de ARNp las HUVEC incrementaron la expresión de ICAM-1, medida por citometría de flujo, y la liberación de IL-8 de manera dosis dependiente. Es destacable que ninguno de los tratamientos realizados produjo citotoxicidad o el desprendimiento de HUVEC. Sumado a esto, ni el ARNp ni el ARNp+RNasa causaron la liberación de TNF- $\alpha$  a las 2 h o 24 h, u óxido nítrico a las 24 o 48 h post-tratamiento, medido por ELISA y la reacción de Griess, respectivamente (datos no mostrados).

Como se observa en la **Figura II.2 A y B**, el ARNp causó un aumento estadísticamente significativo en la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 (CD54) en la línea celular establecida HMEC-1 y en el cultivo primario de HUVEC después del período de incubación en comparación con las células no tratadas. El ARN eucariota purificado (ARNe) no tuvo efecto alguno en ambos tipos celulares. Al igual que con lo descripto previamente para algunas funciones de los PMN, la degradación del ARNp utilizando RNasa (ARNp+RNasa), mantuvo los efectos observados por el ARNp. Tanto el ARNe degradado (ARNe+RNasa) o un control de RNasa sola no indujeron incremento en la expresión de ICAM-1.



**Figura II.1: Curvas de dosis respuesta de células HUVEC desafiadas con diferentes concentraciones de ARNp.** A) *Superior:* Intensidad Media de fluorescencia de ICAM-1 medida por citometría de flujo. *Inferior:* Liberación de IL-8, medida mediante ELISA en sobrenadante libre de células. B) Ausencia de citotoxicidad frente a los tratamientos medida por densidad óptica (O.D.) luego de la tinción con cristal violeta. *Inferior:* Microfotografías representativas de HUVEC teñidas con cristal violeta. Los resultados se expresaron como las medias  $\pm$  ES, n=3.

La secreción de IL-8, un factor quimiotáctico de PMN, se midió en el sobrenadante de HMEC-1 y HUVEC luego del tratamiento (**Figura II.2 C y D**). Tanto ARNp como ARNp+RNasa indujeron un aumento similar en la secreción de IL-8, mientras que ARNe, ARNe+RNasa o RNasa sola no causaron ningún efecto. La activación de HUVEC también se midió mediante la secreción de vWF (**Figura II.2 E**). Al igual que lo que ocurrió al medir ICAM-1 e IL-8, únicamente el ARNp o el ARNp degradado fueron capaces de aumentar la secreción de vWF, evidenciando la activación de las células endoteliales por estos estímulos.



**Figura II.2: Activación de células endoteliales luego del tratamiento con ARNp. A y B)** Intensidad media de fluorescencia de ICAM-1 medida por citometría de flujo en la línea inmortalizada HMEC-1 y en cultivo primario HUVEC, respectivamente. **C y D)** Liberación de IL-8, medida mediante ELISA en sobrenadante libre de células en HMEC-1 y HUVEC respectivamente. **E)** Secreción de von Willebrand Factor (vWF) mediante ELISA en HUVEC. Los resultados se expresaron como las medias  $\pm$  ES,  $n=5$ . En todos los casos  $*p<0.05$  para ARNp y ARNp+RNasa vs. todos los demás grupos.

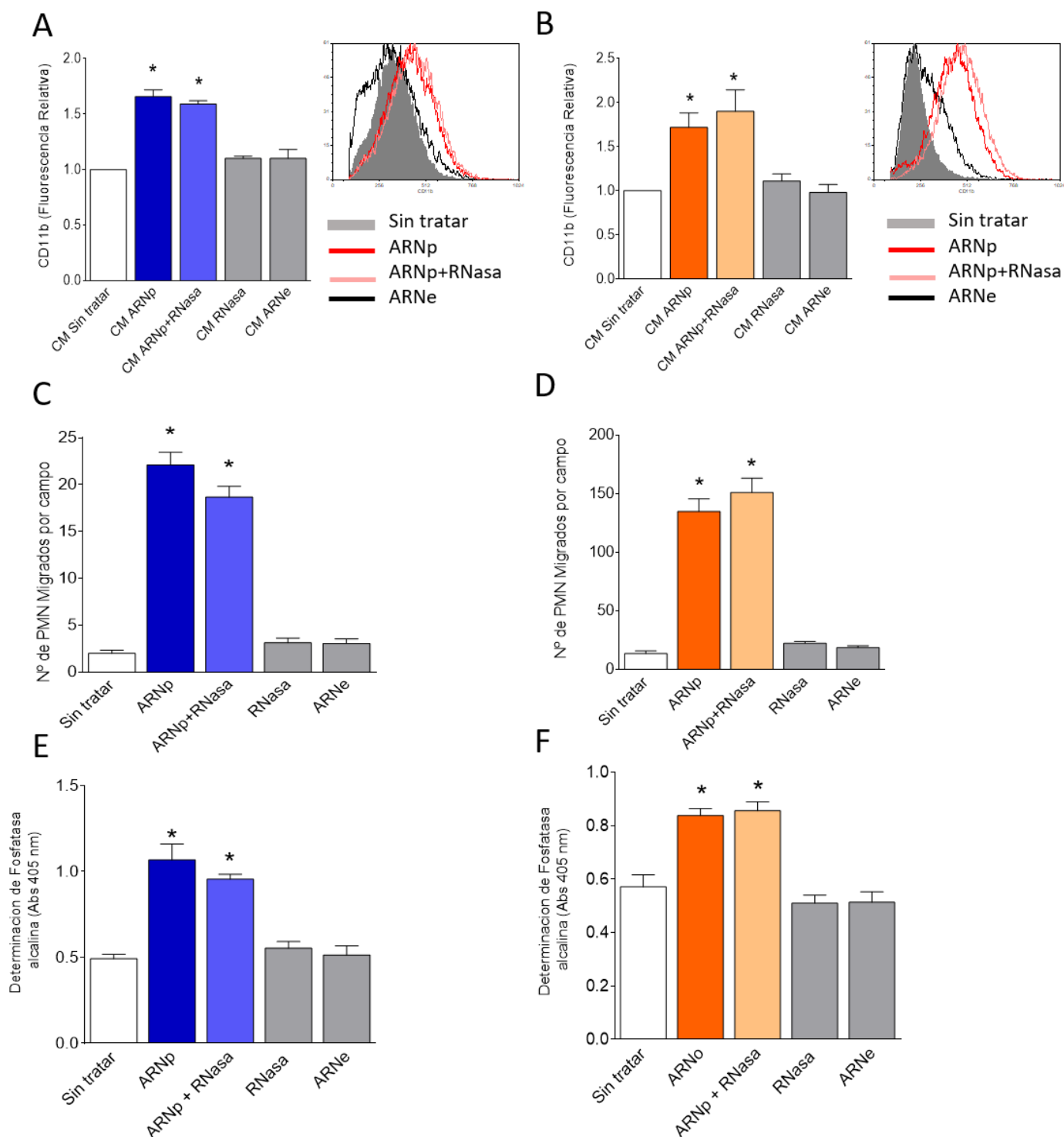
## 2. Las células endoteliales tratadas con ARNp o sus medios condicionados son capaces de activar PMN.

Para evaluar si el medio condicionado (CM) obtenido a partir de células endoteliales tratadas con ARNp era capaz de activar PMN, evaluamos el incremento de la expresión de CD11b en la superficie de los PMN por citometría de flujo en respuesta a los CM. Como se observa en la **Figura II.3 A y B** tanto los CM de HMEC-1 y HUVEC tratadas con ARNp o con ARNp+RNasa fueron capaces de activar los PMN y producir un aumento en la expresión de la integrina CD11b en los mismos.

Considerando el aumento observado de la secreción de IL-8 inducida por ARNp en las células endoteliales (**Figura II.2 C y D**) medimos la capacidad quimiotáctica para PMN de los CM provenientes de los diferentes tratamientos. Como se muestra en la **Figura II.3 C y D**, los CM provenientes de HMEC-1 y de HUVEC tratadas con ARNp o con ARNp+RNasa indujeron la migración de PMN en contraste con el CM de células sin tratar, tratadas con ARNe o con RNasa, que no fueron quimiotácticos para PMN. En concordancia con los mayores niveles de IL-8 producidos por las células HUVEC luego de los estímulos, en esta figura se observa un mayor número de PMN migrados por campo en comparación con la línea HMEC-1.

Dado que la molécula completa de ARNp y sus productos de degradación fueron capaces de aumentar la expresión de ICAM-1, el contra-receptor de Mac-1 (CD11b/CD18) en PMN, evaluamos la adhesión de PMN sobre células endoteliales pre-tratadas (**Figura II.3 E y F**). Encontramos que tanto ARNp como ARNp+RNasa fueron igualmente capaces de causar un aumento estadísticamente significativo en la adhesión de PMN a las células endoteliales. En contraste, el ARNe o RNasa sola no causaron adhesión de los PMN.

En conjunto, estos resultados indican que el ARNp y sus productos de degradación pueden activar PMN, modulando las interacciones endotelio-PMN.



**Figura II.3: Los medios condicionados (CM) de células endoteliales tratadas con ARNp son capaces de activar a PMN humanos. A y B)** Aumento del nivel de expresión de CD11b medido por citometría de flujo luego de incubar los PMN humanos con CM provenientes de células HMEC-1 o HUVEC, respectivamente. **C y D)** Número de PMN migrados a través de una membrana con poro de 3  $\mu$ m en cámara de Boyden utilizando como estímulo CM provenientes de células HMEC-1 o HUVEC, respectivamente. **E y F)** Adhesión de PMN a células endoteliales HMEC-1 o HUVEC, respectivamente, pre-tratadas con ARNp y sus controles, medido por fosfatasa alcalina según se describe en Materiales y Métodos, Los resultados se expresaron como las medias  $\pm$  ES, n=5. En todos los casos \*  $p < 0.05$  para ARNp y ARNp+RNasa vs. todos los demás grupos.

### 3. El ARNp es reconocido por las células HUVEC cuando se administra desde el lado basolateral y es capaz de activar PMN.

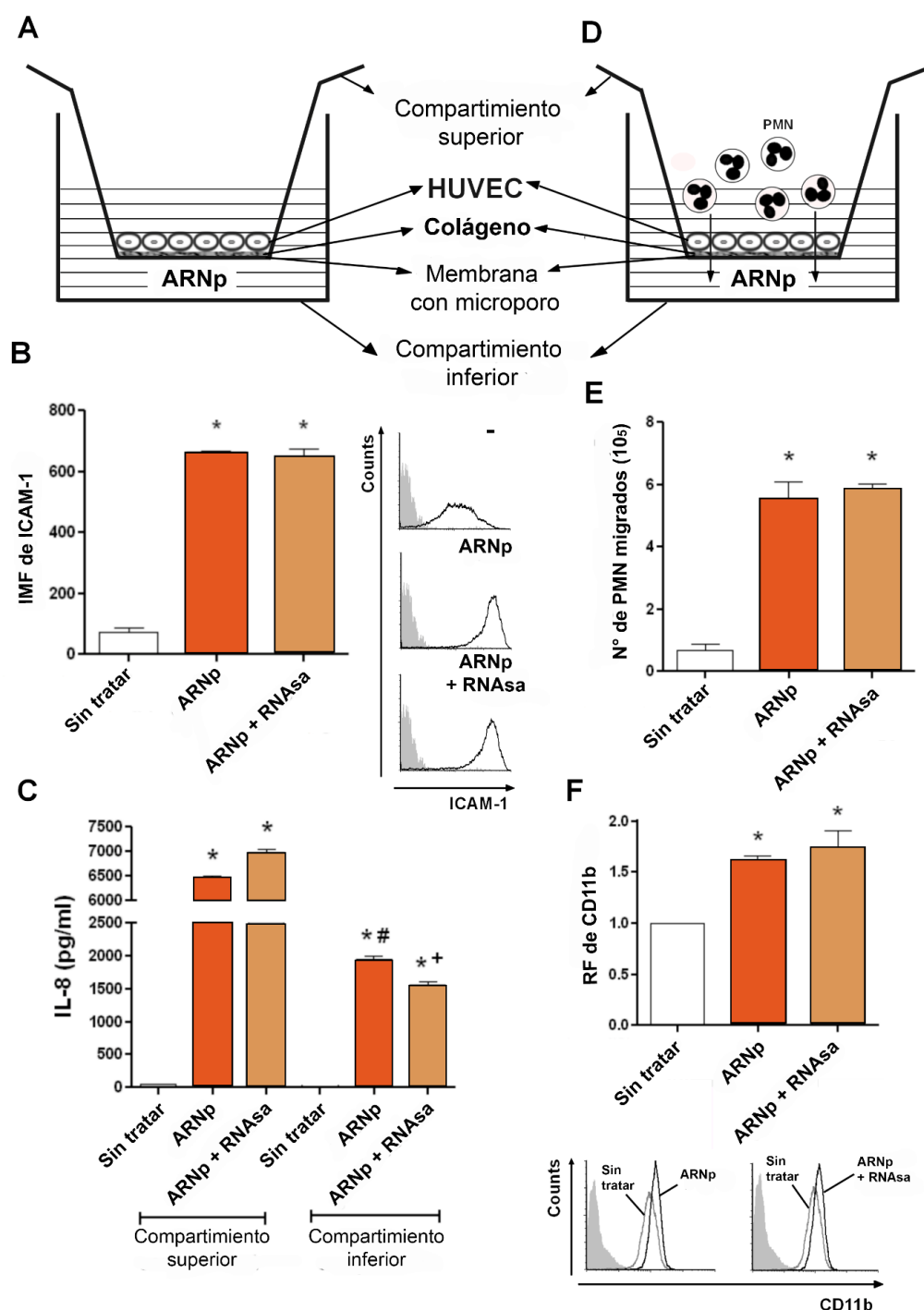
Durante un proceso infeccioso localizado, inicialmente, el inóculo bacteriano se va a encontrar restringido a una zona de tejido específica, en donde liberarán, entre otros productos bacterianos, ARNp.

Con el fin de simular este estado fisiológico, donde las células endoteliales sólo tendrían contacto con el ARNp a través de su cara basolateral y luego de que éste atravesase la lámina basal, se diseñó un experimento de *transwell*. En el compartimento superior y suspendidas sobre un soporte de colágeno las células HUVEC en una monocapa, se mantuvieron en un medio libre de ARNp, y en el compartimento inferior se colocaron los estímulos: ARNp o ARNp+ARNasa como se observa en la **Figura II.4 A**.

Después de 1,5 h, el compartimento inferior conteniendo ARNp se lavó y las células se dejaron durante 18 h, para evaluar la expresión de ICAM-1 y la secreción de IL-8 en las células endoteliales. Como se muestra en la **Figura II.4 B**, el ARNp o el ARNp degradado fueron capaces de estimular a las células HUVEC cuando éstas fueron estimuladas desde la cara basolateral. Los compartimentos superior e inferior del *transwell* se recolectaron por separado para cuantificar las concentraciones de IL-8 (**Figura II.4 C**). Ambos tratamientos, ARNp o ARNp+RNasa, desencadenaron la secreción de IL-8 pero, la cantidad de IL-8 secretada en el compartimento superior fue de 3 a 4 veces mayor que la cantidad encontrada en el compartimento inferior. Estos resultados demuestran que las HUVEC podrían responder al ARNp y sus productos degradados administrados desde el lado basolateral, imitando un foco infeccioso.

Con el fin de determinar si los PMN eran capaces de migrar a través de la monocapa de células endoteliales y el colágeno en respuesta al ARNp, como ocurriría en un estadio fisiológico, se diseñó un modelo experimental donde los PMN fueron colocados en el compartimento superior del *transwell* (**Figura II.4 D**). Luego de 1,5 horas los PMN fueron recolectados del compartimento inferior y contados al microscopio, o utilizados para evaluar

la expresión de CD11b como se demuestra en la **Figura II.4 E y F** respectivamente.



**Figura II.4: El ARNp es reconocido desde la cara basolateral de las células HUVEC y es capaz de activar PMN. A)** Diseño experimental del *transwell* con la monocapa de HUVEC sembrada sobre colágeno. **B)** Intensidad media de fluorescencia de ICAM-1 medida por citometría de flujo en HUVEC. *Derecha:* Histogramas representativos. **C)** Liberación de IL-8, medida mediante ELISA en el compartimento inferior y superior. **D)** Diseño experimental del *transwell* con la monocapa de HUVEC y PMN en el compartimento superior. **E)** Número de PMN migrados a través de la monocapa de HUVEC y recolectados en el compartimento inferior. **F)** Aumento del nivel de expresión de CD11b medido por citometría de flujo en los PMN migrados. Los resultados se expresaron como las medias  $\pm$



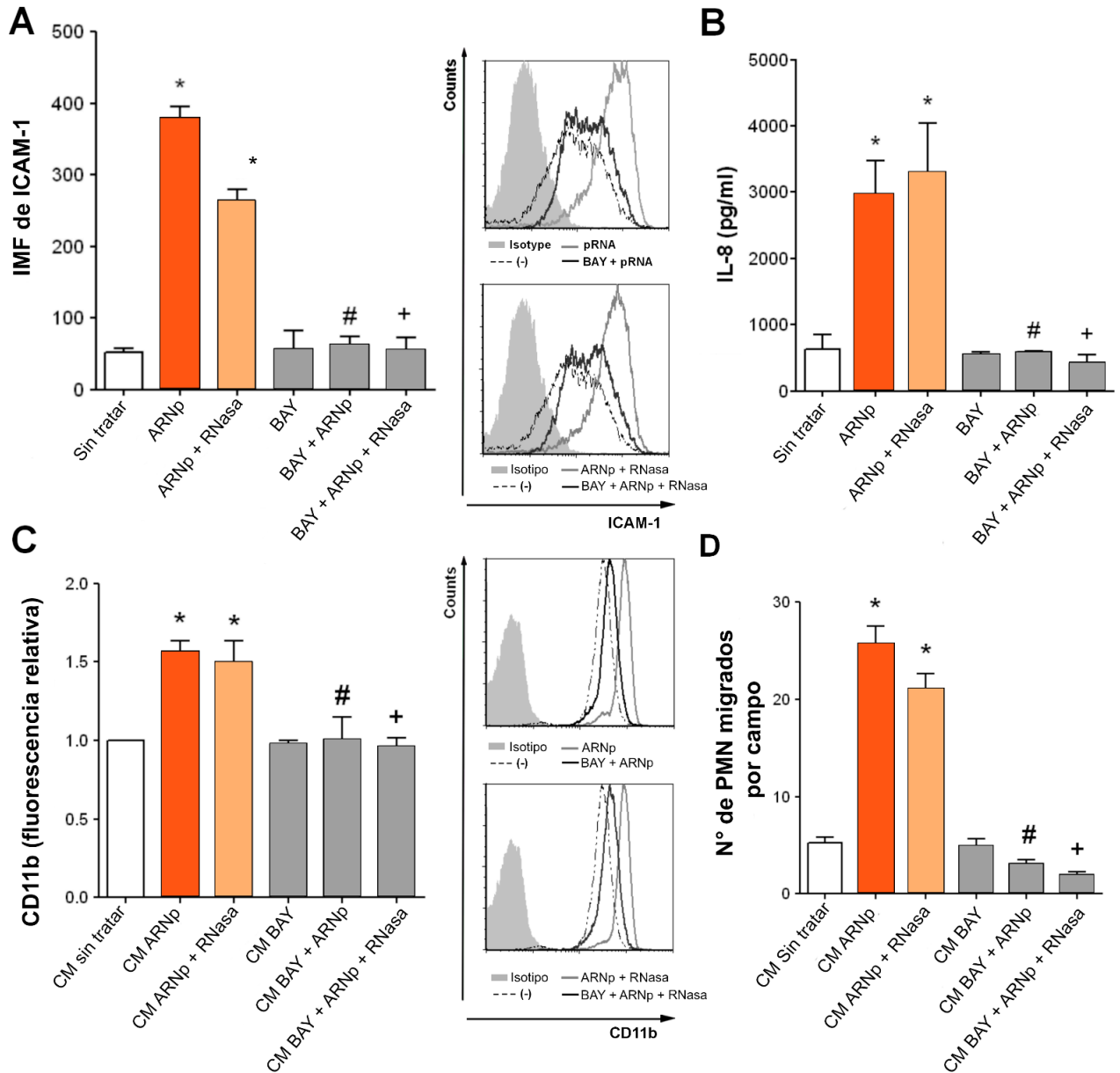
ES, n=3. En todos los casos \* p<0.05 vs. sin tratar, # p<0.05 vs. ARNp del compartimiento superior y + p<0.05 vs. ARNp+RNasa del compartimiento superior.

#### **4. La activación de HUVEC por el ARNp es mediada por NF- $\kappa$ B**

Para evaluar si los efectos del ARNp o sus productos de degradación en HUVEC dependían de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, realizamos un nuevo conjunto de experimentos en presencia del inhibidor de NF- $\kappa$ B, BAY 11-7082 (BAY). Para ello se adicionó 40  $\mu$ M de BAY a los cultivos 30 minutos previos al tratamiento.

Como se observa en la **Figura II.5**, la regulación positiva de ICAM-1, la secreción de IL-8 causada por ARNp y ARNp+RNasa se inhibieron mediante la adición de BAY.

Además, la capacidad del CM tratado para inducir la quimiotaxis y la activación de PMN también se vieron afectadas en presencia de BAY, lo que indica que los efectos del ARNp y sus productos de degradación en HUVEC están mediados por NF- $\kappa$ B.



**Figura II.5: El NF- $\kappa$ B está implicado en la activación de HUVEC por ARNp** En todos los experimentos se utilizó BAY como inhibidor de NF- $\kappa$ B. **A)** Expresión de ICAM-1 medida por citometría de flujo. **B)** Secreción de IL-8 en sobrenadante libre de células. **C)** Expresión de CD11b en PMN tratados con medios condicionados (CM) de HUVEC. **D)** Número de PMN migrados a través de una membrana con poro de 3  $\mu$ m en cámara de Boyden utilizando como estímulo CM de células HUVEC. Los resultados se expresaron como las medias  $\pm$  ES, n=3. En todos los casos \* p<0.05 vs. sin tratar y # p<0.05 vs. ARNp o CM ARNp + y p<0.05 vs. ARNp+RNasa o CM ARNp+RNasa.

---

## DISCUSIÓN

La eliminación de un proceso infeccioso conlleva una serie de procesos regulados y secuenciales en donde la respuesta innata juega un papel fundamental. Las señales provenientes del sitio infeccioso son censadas rápidamente por los PMN circulantes, conduciendo a su activación. En las primeras etapas de este proceso, se desencadenan en los PMN una cascada de eventos que conducen al cambio de forma y aumento de las propiedades de adhesión del PMN al endotelio (Nauseef & Borregaard, 2014).

La interacción con las células endoteliales está mediada por la regulación positiva de las integrinas, como el CD11b, para generar una adhesión firme que sirva de anclaje para luego poder migrar hacia el sitio infeccioso como consecuencia de un gradiente quimiotáctico generado por la misma infección y por las células circundantes a la misma, incluyendo el endotelio (DiStasi & Ley, 2009; van den Berg et al., 1998). Tras el encuentro bacteriano, los PMN eliminan las bacterias, ya sea intracelularmente por fagocitosis y generación de ROS (Fialkow et al., 2007), o extracelularmente por la formación de NETs (Brinkmann et al., 2004).

En este trabajo, el primer punto que abordamos fue estudiar la necesidad de la viabilidad bacteriana para modular la funcionalidad del PMN, midiendo parámetros asociados con diferentes pasos del proceso de activación de este tipo celular. Nuestros resultados indicaron que solamente las bacterias vivas fueron capaces de gatillar todas las funciones del PMN evaluadas, desde el aumento inicial del FSC hasta la activación de mecanismos bactericidas. En cambio, para generar una respuesta frente al estímulo con bacterias muertas el inóculo inicial debió ser mucho mayor, e incluso así no se alcanzaron los niveles de activación observados con las bacterias vivas. Este punto resulta lógico considerando que la activación del PMN lleva inexorablemente a su muerte (Iba et al., 2013), y por lo tanto, una respuesta exacerbada hacia un estímulo no replicativo, y por lo tanto poco peligroso, sería innecesaria.

Además, demostramos que este fenómeno fue independiente de la replicación de la bacteria, ya que los resultados obtenidos con una bacteria viva pero incapaz de proliferar (auxótrofa) fueron iguales, y tampoco resultó exclusivo para *E. coli*, ya que la diferencia en la respuesta del PMN entre bacteria viva-muerta se observó con otras cepas bacterianas. De esta forma, nuestro trabajo demuestra que el PMN es capaz de censar algún componente asociado directamente con la viabilidad bacteriana.

En este sentido, el hecho de que PMN sólo responda a la estimulación con bacterias vivas y no frente a la estimulación con bacterias muertas, puede asociarse con la pérdida del ARNp que sufren estas últimas durante el proceso de muerte. Esto se condice con el hecho de que no se pudo aislar ARN de las MC-Ec, aunque en los sobrenadantes de éstas bacterias muertas se comprobó la presencia de ARN de bajo peso molecular mediante electroforesis en gel de agarosa, lo que demostraría la liberación del ARN al medio extracelular durante la muerte bacteriana.

El hecho de que el peso molecular del ARN liberado en respuesta a la muerte fuese menor al del ARNp aislado a partir de bacterias vivas, probablemente esté asociado a su degradación parcial. Es posible que el proceso de destrucción por calor induzca la degradación intracelular del ARNp y la liberación de ARN parcialmente fragmentado. Más aún, la ausencia de ARNp en el sobrenadante de la bacteria viva refuerza el hecho de que la liberación del ARNp ocurre como consecuencia de la muerte bacteriana.

El tratamiento con RNasa de los sobrenadantes de las MC-Ec reveló que la integridad del ARN es un factor importante que regula la activación de los PMN. Así, se requirió de moléculas de ARNp enteras para activar los mecanismos bactericidas de generación de ROS y NETosis, mientras que otras funciones fueron igualmente disparadas por ARNp entero o degradado. Sin embargo, es posible que estos sobrenadantes puedan contener otras moléculas distintas del ARN capaces de activar a los PMN, tal como se observó con los sobrenadantes obtenidos de bacterias vivas (**Figura I.7**), en

donde no se pudo aislar ARNp pero igualmente fueron inductores de la activación del PMN.

Por este motivo, y para estudiar directamente el rol del ARNp en estos procesos, aislamos ARNp para utilizarlo como estímulo de los PMN. Así, encontramos que el ARNp total aislado imitaba la activación de los PMN obtenida con las bacterias vivas y con los sobrenadantes de bacterias muertas, pero no observamos ninguna activación cuando estimulamos con ARNe. Esto podría explicarse debido a las diferencias intrínsecas entre el ARNp y el ARNe. Por ejemplo, en bacterias el ARN ribosomal difiere en el grado de metilación y contenido de pseudouridina (Kiss, 2001). Otra diferencia es que el ARNm bacteriano no posee colas de 3-poly(A) o son relativamente cortas (14–60 nt) en comparación con sus contrapartes eucariotas, que poseen colas de 3-poly(A) de entre 80 y 200 nt (Sarkar, 1997)(Dreyfus & Régnier, 2002).

En un contexto fisiológico, la presencia de ARNp en el medio extracelular podría ser compatible con la muerte de las bacterias por mecanismos extracelulares, tal como la NETosis. Es posible que, en este sentido, esta liberación de ARNp estimule, de forma parácrina, un loop positivo de activación para los PMN y para otras células, como las células endoteliales. Además, como el ARNp ha sido detectado de forma extracelular asociado a la liberación de vesículas de membrana externa o exosomas por bacterias vivas y también en forma libre no asociado a estas vesículas (Sjöström, Sandblad, Uhlin, & Wai, 2015)(Ghosal et al., 2015; Sjöström et al., 2015), la adición de ARNp extracelularmente en nuestras condiciones experimentales representa un escenario fisiológico posible en un contexto infeccioso.

Para garantizar que la activación de PMN observada estuviera mediada por el ARNp, se realizaron varios controles. En primer lugar, siempre utilizamos preparaciones de ARN aislado con una alta proporción de 260/280 (>1,8). Además, incluimos controles de extracciones para excluir la influencia de los componentes fenólicos y otros contaminantes químicos del RNAzol que pudieran persistir después del aislamiento. Más aún, realizamos

experimentos en presencia de polimixina B para excluir la contribución de lipopolisacáridos (LPS) contaminantes, y también tratamos las preparaciones de ARNp con DNasa para descartar el posible efecto de contaminación del ADN. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con todos estos controles, creemos que el ARNp es la molécula que desencadena todas las funciones analizadas, especialmente cuando se considera que es poco probable que algún otro componente bacteriano, no presente en bacterias muertas, se pueda co-purificar con ARNp en una proporción relevante para desencadenar la activación de PMN.

En línea con esto, aunque el sobrenadante de las bacterias vivas, desprovisto de ARNp (o al menos no detectado por electroforesis) contenía otras moléculas que estimulaban a los PMN, luego del protocolo de extracción de ARN, estos sobrenadantes perdieron su capacidad de activar a los PMN, reforzando el hecho de que el protocolo de extracción de ARN no co-purifica otras moléculas estimulantes de los PMN.

De esta forma, el aumento del tamaño de las células, el incremento en la expresión del CD11b y de la quimiotaxis observado cuando el ARNp purificado se degradó mediante tratamiento con RNasa, y considerando la baja probabilidad de la presencia de otros mediadores activadores de PMN en las preparaciones de ARN, nuestros resultados indican que el ARNp degradado también es capaz de desencadenar respuestas en el PMN, aunque el mecanismo involucrado en este fenómeno necesita de más investigación. Lo que podemos asegurar en este punto, y como se sugirió más arriba, es que la integridad del ARNp sería un factor que regularía diferencialmente el tipo de respuesta del PMN, solo activando funciones bactericidas en presencia de moléculas de ARN de estructura más conservada.

Sumado a esto, demostramos que la generación de ROS y NETs es dependiente de la endocitosis del ARNp. Se ha descrito que los PMN expresan algunos receptores que pueden reconocer ARN y potencialmente podrían estar involucrados en la activación desencadenada por el ARNp en los PMN. En este sentido, de todos los TLR responsables del reconocimiento

de ARN, los PMN solo expresan el TLR8 endosomal (Berger et al., 2012; Hayashi et al., 2003; Janke et al., 2009).

Otro posible receptor intracelular podría ser el NLRP3, un componente citosólico del inflamasoma presente y activable en PMN (Bakele et al., 2014; Pérez-Figueroa et al., 2015). En este sentido, Sander *et al.* han demostrado que el ARN de bacterias viables podría obtener acceso a los receptores citosólicos a través de una fuga desde el fagosoma alcanzando así el NLRP3 (Sander et al., 2012). Independientemente del receptor involucrado, la internalización del ARNp sería un requisito para la interacción con cualquiera de estos receptores. De acuerdo con esto, en nuestros experimentos, el hecho de que con la inhibición de la endocitosis mediante el uso de Nistatina no se indujeran ROS o NETs indicaría, aunque de forma indirecta, que el ARNp está siendo internalizado por los PMN. Otro receptor de ARN presente en PMN es RIG-I. Curiosamente, aunque este receptor es un receptor citosólico en otros tipos de células, en PMN no *primados*, el RIG-I se encontró además de en el citoplasma, en vesículas secretoras y en la superficie celular, sugiriendo que el reconocimiento de ARNp en PMN también podría ocurrir a nivel de la membrana plasmática (Berger et al., 2012). La interacción del ARNp con RIG-I en la membrana plasmática, o con algún otro receptor no identificado, podría explicar la inducción de funciones del PMN que también fueron desencadenadas en presencia del inhibidor de endocitosis, aunque esto requiere una investigación adicional.

Además, nuestros experimentos en sangre entera demostraron que el *priming* también fue necesario para desencadenar la generación de ROS por el ARNp. Aunque la necesidad de *priming* pudiera generar dudas sobre la validez de los resultados encontrados en los PMN purificados, en un contexto infeccioso, los PMN seguramente se encontrarán primados, ya que la presencia de ARNp siempre estará acompañada de mediadores de *priming* o activación del PMN, como componentes estructurales bacterianos o citoquinas inflamatorias liberadas por otras células.

Teniendo en cuenta lo comentado en los párrafos anteriores, nuestros resultados sugieren la existencia en los PMN de dos vías diferentes de

señalización inducidas por el ARNp, una involucrada principalmente en funciones relacionadas con el movimiento y la adhesión y otra relacionada con la inducción de mecanismos bactericidas. Esto es consecuente con la capacidad de movilización diferencial de las vesículas secretoras a la membrana del PMN, pudiendo transportar proteínas funcionales, tales como integrinas, para usar en la trans migración sin liberar proteínas granulares potencialmente dañinas (Borregaard et al., 1993).

Así, mientras que el aumento del FSC, la regulación positiva de CD11b y la quimiotaxis fueron desencadenados también por ARNp degradado, y no dependen de la endocitosis de ARNp o el *priming* de los PMN, la formación de ROS y NETs mostró las características opuestas. Esto podría estar asociado a la presencia de distintos tipos de receptores para el ARNp, uno en membrana plasmática y otro intracelular. Actualmente estamos investigando esta posibilidad si bien hasta el momento no contamos con la demostración formal para asegurar la existencia de estas dos vías diferentes de señalización.

Si bien nuestros resultados demuestran, por primera vez, el papel del ARNp como inductor de la activación de PMN, es claro que el PMN se encuentra en un contexto en donde la respuesta de otras células también influirá sobre su activación.

De esta forma, también nos propusimos estudiar la respuesta de las células endoteliales (CE) al ARNp y su influencia sobre la interacción con el PMN. Esta interacción resulta fundamental para la migración del PMN hacia un foco infeccioso y la correcta eliminación de la infección. Nuestros resultados muestran que las células endoteliales también responden directamente al ARNp o a sus productos de degradación, pero no al ARNe, liberando factores activadores y quimiotácticos para el PMN, como la IL-8, y promoviendo la adhesión del PMN a través del incremento en la expresión del ICAM-1, contraparte del CD11b del PMN en el complejo Mac-1.

También evaluamos medios condicionados de CE tratadas con ARNp sobre PMN, los que fomentaron la capacidad migratoria e incrementaron la



expresión de CD11b en PMN posiblemente debido a la liberación, entre otros factores, de vWF e IL-8 por parte de las células endoteliales.

Con el fin de imitar un proceso infeccioso fisiológico donde inicialmente el inóculo bacteriano se va a encontrar restringido a una zona de tejido específica, desde donde liberará, entre otros productos bacterianos, el ARNp el cual llegaría a las células endoteliales a través de su cara basolateral y luego de que éste atraviese la membrana basal, realizamos experimentos de *transwell*. El ARNp o sus productos de degradación produjeron un incremento diferencial en la liberación de IL-8, siendo superior la liberación de esta citoquina en la cara apical, es decir, hacia la luz del vaso sanguíneo atrayendo así a los PMN circulantes. A su vez, demostramos mediante el mismo modelo experimental que los PMN son capaces de adherirse a las células endoteliales y migrar a través de ellas en respuesta al gradiente de ARNp.

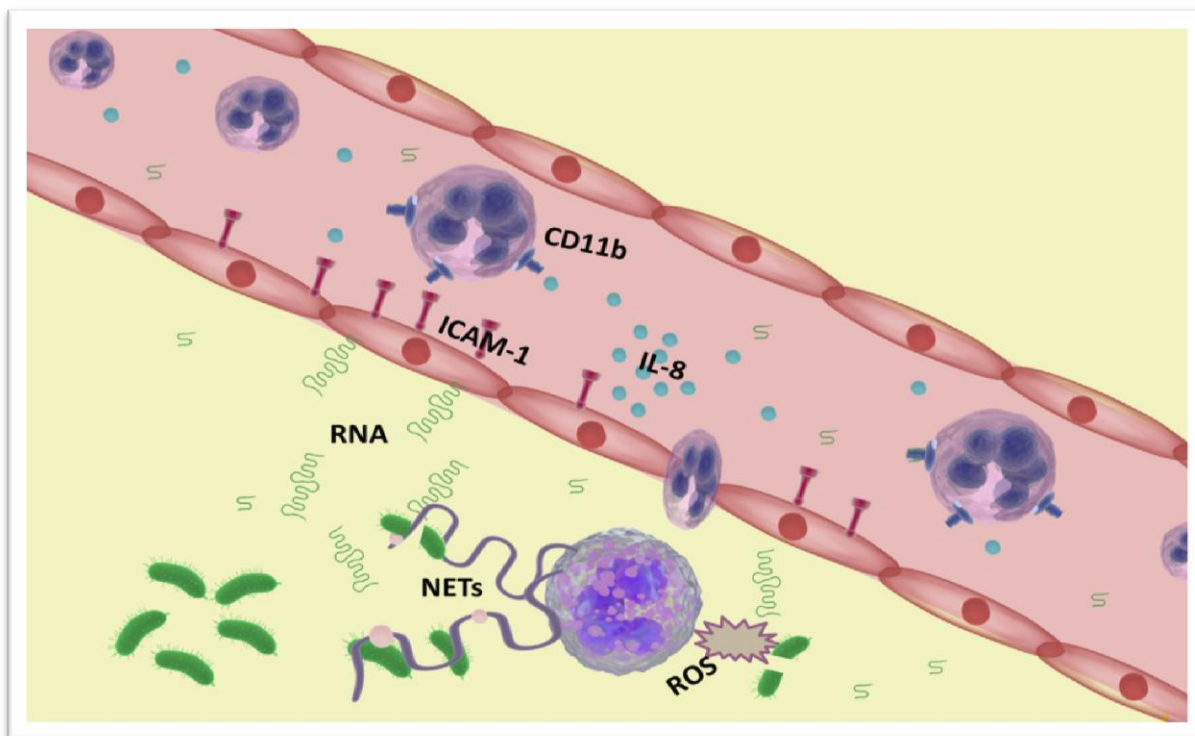
De los receptores de tipo TLR presentes en humanos capaces de censar ácidos nucleicos: TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 (éste último destinado a di-nucleótidos CpG de ADN), todos han sido detectados en uno u otro tipo de célula endotelial, al igual que los receptores RIG-I. (Khakpour et al., 2015; Maaser et al., 2004; Salvador et al., 2016; Wang et al., 2011). Sin embargo, y en particular en HUVEC, no se ha podido detectar la expresión de TLR7 o TLR8, lo que descartaría que el ARNp se active utilizando estos receptores (Salvador et al., 2016). Esto requerirá investigaciones futuras para aclarar el mecanismo de reconocimiento del ARNp por las células del endotelio.

El modelo final simplificado para englobar todos nuestros resultados se puede resumir en la **Figura 4**. Allí se esquematiza un foco infeccioso localizado. Los compuestos bacterianos, incluyendo el ARNp, activarán a las células inmunes presentes en el foco infeccioso y a las células cercanas como las células endoteliales. Esto generará la liberación de factores quimiotácticos como IL-8 por parte de las células endoteliales a circulación que atraerán PMN y favorecerán la adhesión de estas células al endotelio activado.

Es probable que el ARNp proveniente del foco infeccioso acceda a circulación y comience a degradarse en el proceso. Este ARNp degradado activaría las respuestas iniciales del PMN sin iniciar aún respuestas bactericidas. Una vez adherido al endotelio, el PMN extravasaría al sitio de infección, y en presencia de ARNp no degradado los mecanismos bactericidas del PMN contribuirían a contener la infección eliminando la bacteria por fagocitosis y producción de ROS a nivel intracelular, y NETosis a nivel extracelular. La liberación de ARNp por bacterias que mueren extracelularmente, por NETosis, creará un ciclo de amplificación que llamará más PMN al sitio de la infección.

La existencia de dos vías de activación diferentes dependiendo de la integridad del ARN, podría actuar como una separación espacio-temporal para el PMN, evitando la activación de mecanismos como ROS y NETs en circulación donde podrían causar daño endotelial, un aspecto que muchas veces se observa en patologías donde se produce una activación del PMN poco controlada (Jorch & Kubes, 2017; Xu et al., 2009). De esta manera, si la activación de las respuestas bactericidas se concentra en el foco infeccioso en donde las moléculas de ARNp estén menos degradadas, se limitan los efectos nocivos de daño tisular que podría ocasionar la activación desmedida del PMN en circulación.

En **conclusión**, nuestros resultados arrojan luz sobre cómo los PMN evalúan activamente el riesgo infeccioso al reconocer señales de viabilidad bacteriana y, por lo tanto, la infectividad. Además, nuestro trabajo muestra el importante papel del ARN exógeno derivado de bacterias como modulador de la interacción del PMN con el endotelio. Nuestros resultados describen aspectos no explorados hasta el momento sobre las interacciones huésped-microbio y pueden ayudar a elucidar nuevos mecanismos asociados con la patogénesis de las infecciones bacterianas.



**Figura 4.** Modelo esquemático de la influencia de la viabilidad bacteriana y la liberación de ARNp para desencadenar la activación del endotelio y el reclutamiento de PMN al sitio de infección.

Nahuel Rodriguez-Rodrigues

Gabriela Crtistina Fernández

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Aird, W. C. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation Research*.  
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a>
- Akira, S., & Hemmi, H. (2003). Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunology Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(02\)00228-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(02)00228-6)
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., & Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature*.  
<https://doi.org/10.1038/35099560>
- Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F., & Ménard, R. (2006). Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm1350>
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annual Review of Immunology*.
- Anderson, H. a, Chen, Y., & Norkin, L. C. (1996). Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Molecular Biology of the Cell*, 7(11), 1825–1834.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.7.11.1825>
- Bakele, M., Joos, M., Burdi, S., Allgaier, N., Pöschel, S., Fehrenbacher, B., ... Hartl, D. (2014). Localization and functionality of the inflammasome in neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.505636>
- Barnes, P. D., Bergman, M. A., Mecsas, J., & Isberg, R. R. (2006). Yersinia pseudotuberculosis disseminates directly from a replicating bacterial pool in the intestine. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20060905>
- Basu, S., Hodgson, G., Katz, M., & Dunn, A. R. (2002). Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood*, 100(3), 854–861. <https://doi.org/10.1182/blood.V100.3.854>
- Bauer, S., Kirschning, C. J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., ... Lipford, G. B. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.161293498>
- Berger, M., Hsieh, C. Y., Bakele, M., Marcos, V., Rieber, N., Kormann, M., ... Hartl, D. (2012). Neutrophils express distinct RNA receptors in a non-canonical way. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19409–19417. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.353557>
- Blander, J. M., & Sander, L. E. (2012). Beyond pattern recognition: Five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nature Reviews Immunology*.  
<https://doi.org/10.1038/nri3167>
- Borregaard, N., Kjeldsen, L., Løllike, K., & Sengeløv, H. (1993). Granules and vesicles of human neutrophils. The role of endomembranes as source of plasma membrane proteins. *European Journal of Haematology*, 51(5), 318–322.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1993.tb01615.x>
- Boueiz, A., & Hassoun, P. M. (2009). Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. *Microvascular Research*.  
<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2008.10.005>
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., ... Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, 303(5663), 1532–1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>

- Carman, C. V., & Martinelli, R. (2015). T lymphocyte-endothelial interactions: Emerging understanding of trafficking and antigen-specific immunity. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00603>
- Cervantes, J. L., La Vake, C. J., Weinerman, B., Luu, S., O'Connell, C., Verardi, P. H., & Salazar, J. C. (2013). Human TLR8 is activated upon recognition of *Borrelia burgdorferi* RNA in the phagosome of human monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. <https://doi.org/10.1189/jlb.0413206>
- Cole, A. T., Garlick, N. M., Galvin, A. M., Hawkey, C. J., & Robins, R. A. (1995). A flow cytometric method to measure shape change of human neutrophils. *Clin. Sci.*, 89, 549–554. Retrieved from [papers3://publication/uuid/82F54255-AD04-4AAF-BA90-A5EBD9559B03](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/82F54255-AD04-4AAF-BA90-A5EBD9559B03)
- Cooper, S., & Helmstetter, C. E. (1968). Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 31(3), 519–540. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(68\)90425-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(68)90425-7)
- Dalrymple, N. A., & Mackow, E. R. (2012). Endothelial Cells Elicit Immune-Enhancing Responses to Dengue Virus Infection. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.00213-12>
- Dancey, J. T., Deubelbeiss, K. A., & Harker and Finch, L. A. C. A. (1976). Neutrophil kinetics in man. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI108517>
- Detmer, A., & Glenting, J. (2006). Live bacterial vaccines - A review and identification of potential hazards. *Microbial Cell Factories*, 5(iii), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-23>
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., & Reis E Sousa, C. (2004). Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1093616>
- DiStasi, M. R., & Ley, K. (2009). Opening the flood-gates: how neutrophil-endothelial interactions regulate permeability. *Trends in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.07.012>
- Dreyfus, M., & Régnier, P. (2002). The poly(A) tail of mRNAs: Bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01137-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01137-6)
- Edwards, S. W. (1994). *Biochemistry and physiology of the neutrophil*. Cambridge [England] ; New York: Cambridge University Press.
- Eigenbrod, T., & Dalpke, A. H. (2015). Bacterial RNA: An Underestimated Stimulus for Innate Immune Responses. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500530>
- Eigenbrod, T., Pelka, K., Latz, E., Kreikemeyer, B., & Dalpke, A. H. (2015). TLR8 Senses Bacterial RNA in Human Monocytes and Plays a Nonredundant Role for Recognition of *Streptococcus pyogenes*. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403173>
- Evans, R., Patzak, I., Svensson, L., De Filippo, K., Jones, K., McDowall, A., & Hogg, N. (2009). Integrins in immunity. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.019117>
- Faurschou, M., Sørensen, O. E., Johnsen, A. H., Askaa, J., & Borregaard, N. (2002). Defensin-rich granules of human neutrophils: Characterization of secretory properties. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(02\)00243-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(02)00243-4)
- Fialkow, L., Wang, Y., & Downey, G. P. (2007). Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.09.030>

- Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., ... Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>
- Ghosal, A., Upadhyaya, B. B., Fritz, J. V., Heintz-Buschart, A., Desai, M. S., Yusuf, D., ... Wilmes, P. (2015). The extracellular RNA complement of *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen*. <https://doi.org/10.1002/mbo3.235>
- Ginsburg, D., & Steitz, J. A. (1975). The 30 S ribosomal precursor RNA from *Escherichia coli*. A primary transcript containing 23 S, 16 S, and 5 S sequences. *Journal of Biological Chemistry*.
- Harcourt, J. L., Hagan, M. K., & Offermann, M. K. (2002). Modulation of Double-Stranded RNA-Mediated Gene Induction by Interferon in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 20(11), 1007–1013. <https://doi.org/10.1089/10799900050198453>
- Hayashi, F., Means, T. K., & Luster, A. D. (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*, 102(7), 2660–2669. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1078>
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., ... Bauer, S. (2004). Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1093620>
- Hidmark, A., von Saint Paul, A., & Dalpke, A. H. (2012). Cutting Edge: TLR13 Is a Receptor for Bacterial RNA. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200898>
- Hillyer, P., & Male, D. (2005). Expression of chemokines on the surface of different human endothelia. *Immunology and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2005.01345.x>
- Hoebe, K., Janssen, E., & Beutler, B. (2004). The interface between innate and adaptive immunity. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni1004-971>
- Huang, Y. H., Lei, H. Y., Liu, H. S., Lin, Y. S., Liu, C. C., & Yeh, T. M. (2000). Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.
- Hyun, Y.-M., Sumagin, R., Sarangi, P. P., Lomakina, E., Overstreet, M. G., Baker, C. M., ... Kim, M. (2012). Uropod elongation is a common final step in leukocyte extravasation through inflamed vessels. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20111426>
- Iba, T., Hashiguchi, N., Nagaoka, I., Tabe, Y., & Murai, M. (2013). Neutrophil cell death in response to infection and its relation to coagulation. *Journal of Intensive Care*. <https://doi.org/10.1186/2052-0492-1-13>
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni1112>
- Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., & Minick, C. R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI107470>
- Jaillon, S., Peri, G., Delneste, Y., Fremaux, I., Doni, A., Moalli, F., ... Mantovani, A. (2007). The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20061301>
- Jaiswal, N., Diz, D. I., Chappell, M. C., Khosla, M. C., & Ferrario, C. M. (1992). Stimulation of endothelial cell prostaglandin production by angiotensin peptides. Characterization of receptors. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*.

- Janeway, C. a, & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20(2), 197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
- Janke, M., Poth, J., Wimmenauer, V., Giese, T., Coch, C., Barchet, W., ... Hartmann, G. (2009). Selective and direct activation of human neutrophils but not eosinophils by Toll-like receptor 8. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(5), 1026–1033. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.02.015>
- Jorch, S. K., & Kubes, P. (2017). An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.4294>
- Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A. M., Wagner, H., ... Bauer, S. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848 [1]. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni0602-499>
- Kansas, G. (1996). Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*, 88(9), 3259–3287. <https://doi.org/10.1136/bmj.s4-1.148.879-a>
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>
- Kawecki, C., Lenting, P. J., & Denis, C. V. (2017). von Willebrand factor and inflammation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. <https://doi.org/10.1111/jth.13696>
- Kell, A. M., & Gale, M. (2015). RIG-I in RNA virus recognition. *Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.017>
- Khakpour, S., Wilhelmsen, K., & Hellman, J. (2015). Vascular endothelial cell Toll-like receptor pathways in sepsis. *Innate Immunity*. <https://doi.org/10.1177/1753425915606525>
- Kiss, T. (2001). Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3617>
- Konradt, C., & Hunter, C. A. (2018). Pathogen interactions with endothelial cells and the induction of innate and adaptive immunity. *European Journal of Immunology*, 48(10), 1607–1620. <https://doi.org/10.1002/eji.201646789>
- Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A. N. R., Rieber, N., Radsak, M., von Bernuth, H., ... Hartl, D. (2015). Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004651>
- Kuijpers, T. W., Tool, A. T., van der Schoot, C. E., Ginsel, L. A., Onderwater, J. J., Roos, D., & Verhoeven, A. J. (1991). Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation. *Blood*, 78(4), 1105–1111. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1907873>
- Kumar, S., Ingle, H., Prasad, D. V. R., & Kumar, H. (2013). Recognition of bacterial infection by innate immune sensors. *Critical Reviews in Microbiology*. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.706249>
- Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri1312>
- Lee, W. L., Harrison, R. E., & Grinstein, S. (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.014>
- Leech, M., Hutchinson, P., Holdsworth, S. R., & Morand, E. F. (1998). Endogenous glucocorticoids modulate neutrophil migration and synovial P-selectin but not neutrophil phagocytic or oxidative function in experimental arthritis. *Clinical and Experimental Immunology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1998.00601.x>
- Lerman, Y. V., Lim, K., Hyun, Y. M., Falkner, K. L., Yang, H., Pietropaoli, A. P., ... Kim, M. (2014). Sepsis lethality via exacerbated tissue infiltration and TLR-induced cytokine production by neutrophils is integrin  $\alpha 3\beta 1$ -dependent. *Blood*.

- <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-552943>
- Ley, K. (2003). The role of selectins in inflammation and disease. *Trends in Molecular Medicine*. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(03\)00071-6](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00071-6)
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri2156>
- Liu, J., Xu, C., Hsu, L. C., Luo, Y., Xiang, R., & Chuang, T. H. (2010). A five-amino-acid motif in the undefined region of the TLR8 ectodomain is required for species-specific ligand recognition. *Molecular Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.11.003>
- Maaser, C., Heidemann, J., von Eiff, C., Lugering, A., Spahn, T. W., Binion, D. G., ... Kucharzik, T. (2004). Human Intestinal Microvascular Endothelial Cells Express Toll-Like Receptor 5: A Binding Partner for Bacterial Flagellin. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.8.5056>
- Macdonald, J. A., Murugesan, N., & Pachter, J. S. (2010). Endothelial cell heterogeneity of blood-brain barrier gene expression along the cerebral microvasculature. *Journal of Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1002/jnr.22316>
- Marchesi, V. T., & Florey, H. W. (1960). Electron micrographic observations on the emigration of leucocytes. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences*. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1960.sp001489>
- Mayer-Scholl, A., Averhoff, P., & Zychlinsky, A. (2004). How do neutrophils and pathogens interact? *Current Opinion in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.12.004>
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature06246>
- Mitroulis, I., Kambas, K., Chrysanthopoulou, A., Skendros, P., Apostolidou, E., Kourtzelis, I., ... Ritis, K. (2011). Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 $\beta$  and autophagy-related signaling in gout. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029318>
- Moretti, J., Roy, S., Bozec, D., Martinez, J., Chapman, J. R., Ueberheide, B., ... Blander, J. M. (2017). STING Senses Microbial Viability to Orchestrate Stress-Mediated Autophagy of the Endoplasmic Reticulum. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.034>
- Moser, J., Zijlstra, J. G., Jongman, R. M., Niemarkt, A. E., Li, R., van Nieuw Amerongen, G. P., ... Aird, W. C. (2016). Intracellular RIG-I Signaling Regulates TLR4-Independent Endothelial Inflammatory Responses to Endotoxin. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501819>
- Nauseef, W. M., & Borregaard, N. (2014). Neutrophils at work. *Nature Immunology*, 15(7), 602–611. <https://doi.org/10.1038/ni.2921>
- Olbrych, M. T., Khan, B. V., Harrison, D. G., Medford, R. M., & Alexander, R. W. (2002). Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(17), 9114–9119. <https://doi.org/10.1073/pnas.99.17.9114>
- Park, S. A., & Hyun, Y.-M. (2016). Neutrophil Extravasation Cascade: What Can We Learn from Two-photon Intravital Imaging? *Immune Network*. <https://doi.org/10.4110/in.2016.16.6.317>
- Pérez-Figueroa, E., Torres, J., Maldonado-Bernal, C., Alvarez-Arellano, L., Sánchez-Zauco, N., Contreras-Ramos, A., & Maldonado-Bernal, C. (2015). Activation of NLRP3 inflammasome in human neutrophils by *Helicobacter pylori* infection. *Innate Immunity*, 22(2), 103–112. <https://doi.org/10.1177/1753425915619475>



- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Näslund, T. I., Liljeström, P., Weber, F., & Reis E Sousa, C. (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1132998>
- Pillay, J., Den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L. M., De Boer, R. J., Borghans, J. A. M., ... Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-259028>
- Pober, J. S., & Sessa, W. C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri2171>
- Potente, M., & Mäkinen, T. (2017). Vascular heterogeneity and specialization in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.36>
- Reikine, S., Nguyen, J. B., & Modis, Y. (2014). Pattern recognition and signaling mechanisms of RIG-I and MDA5. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00342>
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., & Anderson, R. G. W. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, 68(4), 673–682. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90143-Z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90143-Z)
- Sá-Pereira, I., Brites, D., & Brito, M. A. (2012). Neurovascular unit: A focus on pericytes. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8244-2>
- Salvador, B., Arranz, A., Francisco, S., Córdoba, L., Punzón, C., Llamas, M. Á., & Fresno, M. (2016). Modulation of endothelial function by Toll like receptors. *Pharmacological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.038>
- Sander, L. E., Davis, M. J., Boekschoten, M. V., Amsen, D., Dascher, C. C., Ryffel, B., ... Blander, J. M. (2011). Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature10072>
- Sander, L. E., Davis, M. J., Boekschoten, M. V., Amsen, D., Christopher, C., Ryffel, B., ... Blander, J. M. (2012). Sensing prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. *Nature*, 474(7351), 385–389. <https://doi.org/10.1038/nature10072>. Sensing
- Santini, G. F., Battistin, S., De Paoli, P., Villalta, D., Borean, M., & Basaglia, G. (1987). A method for the determination of the adherence of granulocytes to microtitre plates. *Journal of Immunological Methods*, 100(1–2), 153–156. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(87\)90184-0](https://doi.org/10.1016/0022-1759(87)90184-0)
- Sarkar, N. (1997). POLYADENYLATION OF mRNA IN PROKARYOTES. *Annual Review of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.173>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Scott, S. I., & Min-Ho, K. (2010). A day (or 5) in a neutrophil's life. *Blood*, 116(4), 512–513. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-278549>
- Segal, A. W. (2008). How superoxide production by neutrophil leukocytes kills microbes. In *Innate Immunity to Pulmonary Infection* (pp. 92–100). <https://doi.org/10.1002/9780470035399.ch8>
- Sjöström, A. E., Sandblad, L., Uhlin, B. E., & Wai, S. N. (2015). Membrane vesicle-mediated release of bacterial RNA. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep15329>
- Spadoni, I., Zagato, E., Bertocchi, A., Paolinelli, R., Hot, E., Di Sabatino, A., ... Rescigno, M. (2015). A gut-vascular barrier controls the systemic dissemination of bacteria. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aad0135>
- Sun, S., Sursal, T., Adibnia, Y., Zhao, C., Zheng, Y., Li, H., ... Itagaki, K. (2013).

- Mitochondrial DAMPs Increase Endothelial Permeability through Neutrophil Dependent and Independent Pathways. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059989>
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Tamassia, N., Le Moigne, V., Rossato, M., Donini, M., McCartney, S., Calzetti, F., ... Cassatella, M. a. (2008). Activation of an immunoregulatory and antiviral gene expression program in poly(I:C)-transfected human neutrophils. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(9), 6563–6573. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.6563>
- Thomas, C. J., & Schroder, K. (2013). Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.02.008>
- Urban, C. F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., ... Zychlinsky, A. (2009). Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000639>
- van den Berg, R. H., Faber-Krol, M. C., Sim, R. B., & Daha, M. R. (1998). The first subcomponent of complement, C1q, triggers the production of IL-8, IL-6, and monocyte chemoattractant peptide-1 by human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(12), 6924–6930. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/161/12/6924.full>
- Vance, R. E., Isberg, R. R., & Portnoy, D. A. (2009). Patterns of Pathogenesis: Discrimination of Pathogenic and Nonpathogenic Microbes by the Innate Immune System. *Cell Host and Microbe*, 6(1), 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.06.007>
- Voisin, M. B., & Nourshargh, S. (2013). Neutrophil transmigration: Emergence of an adhesive cascade within venular walls. *Journal of Innate Immunity*. <https://doi.org/10.1159/000346659>
- Wang, W., Deng, M., Liu, X., Ai, W., Tang, Q., & Hu, J. (2011). TLR4 activation induces nontolerant inflammatory response in endothelial cells. *Inflammation*. <https://doi.org/10.1007/s10753-010-9258-4>
- Watson, F., Robinson, J. J., & Edwards, S. W. (1992). Neutrophil function in whole blood and after purification: Changes in receptor expression, oxidase activity and responsiveness to cytokines. *Bioscience Reports*, 12(2), 123–133. <https://doi.org/10.1007/BF02351217>
- Wood, J. P., Maroney, S. A., Camire, R. M., Mast, A. E., Bunce, M. W., & Tracy, P. B. (2013). Tissue factor pathway inhibitor-alpha inhibits prothrombinase during the initiation of blood coagulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310444110>
- Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C. T., Semeraro, F., ... Esmon, C. T. (2009). Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.2053>