



**Inducción de muerte celular del neutrófilo (NETosis) por Cocaína-Levamisol
y sus posibles mecanismos como evento disparador de Vasculopatías**

Manuela Osorio Alvarez

Tutor:

Carlos Horacio Muñoz Vahos
Grupo de Reumatología. Departamento de Medicina Interna. Facultad de
Medicina. Hospital San Vicente Fundación e IPS universitaria

Co-tutora:

Gloria María Vásquez Duque
Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética (GICIG)

**Universidad de Antioquia
Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas
Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en Inmunología
Medellín, Colombia
2022**

**Inducción de muerte celular del neutrófilo (NETosis) por Cocaína-Levamisol
y sus posibles mecanismos como evento disparador de Vasculopatías**

Manuela Osorio Alvarez

Trabajo de investigación para optar al título de magister en Ciencias Básicas
biomédicas

Comité Tutorial

Tutor: Carlos Horacio Muñoz Vahos. Médico internista Reumatólogo.

Co-tutora: Gloria María Vásquez Duque. Médico Reumatólogo. Doctora en Ciencias básicas Biomédicas

Miembro comité Mauricio Rojas López. Biólogo. Doctor en Ciencias Básicas Biomédicas

Miembro comité Adriana Lucia Vanegas García. Médico internista Reumatólogo

Miembro comité Yermis Carolina Rocha. Microbióloga y Bioanalista. Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas

Universidad de Antioquia
Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas
Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en Inmunología
Medellín, Colombia

2022

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su amor, apoyo incondicional y motivación para lograr llevar a cabo este proceso

A mi compañero de vida Jhon Alexander Ramírez, por su compañía, tomar mi mano fuertemente y darme fortaleza durante este proceso.

A ASOREUMA por la financiación para el desarrollo del proyecto “Inducción de muerte celular del neutrófilo (NETosis) por Cocaína-Levamisol y sus posibles mecanismos como evento disparador de Vasculopatías.

AL programa de sostenibilidad de la Universidad de Antioquia, quienes apoyaron el desarrollo de este proceso.

A la Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas y a la Universidad de Antioquia por la formación recibida.

A la sección de Reumatología del Hospital Universitario San Vicente Fundación por la ayuda brindada en el proceso de captación de los pacientes con VICOL

Al Grupo de investigación GICIG y a la Unidad de Citometría de Flujo, por facilitar el espacio propicio para poder llevar a cabo el desarrollo del proyecto.

A mi tutor Carlos Horacio Muñoz Vahos, mi co-tutora Gloria Vásquez Duque y al profesor y coordinador de la Unidad Citometría de Flujo y del GICIG Mauricio Rojas López, por su constante apoyo y guía en este proceso.

A los miembros del comité tutorial, la doctora Adriana Lucia Vanegas y Yermis Carolina Rocha por los aportes brindados durante el desarrollo del presente trabajo.

A todos los miembros del GICIG, profesores, estudiantes y personal administrativo por su voz de aliento, aportes científicos y cariño brindado.

Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS.....	3
Lista de símbolos y abreviaturas.....	6
Resumen.....	8
Abstract.....	10
1.Introducción.....	12
1.1 Antecedentes.....	12
1.2Marco teórico.....	14
1.2.1 Vasculopatías.....	14
1.2.2 Neutrófilos.....	17
1.2.3 NETosis: muerte celular de los neutrófilos.....	18
1.2.4 NETosis y Vasculitis asociada a ANCA.....	21
1.2.5 Mecanismos implicados en la inducción de NETosis.....	24
1.2.6 Vasculitis inducida por Cocaína-Levamisol.....	26
1.3 Planteamiento del problema.....	28
2.Objetivos.....	29
2.1 General.....	29
2.2 Específicos.....	29
Hipótesis.....	30
Pregunta de investigación.....	30
3.MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1 Reactivos.....	31
3.2 Pacientes y controles incluidos en el estudio.....	31
3.3 Separación de sueros.....	32
3.4 Preparación de mezcla de sueros.....	32
3.5 Aislamiento de neutrófilos a partir de sangre periférica.....	32
3.6 Ensayos de inducción de muerte celular de Neutrófilos.....	33
3.7 Ensayos de inhibición de muerte celular de Neutrófilos.....	33
3.8 Medición de citoquinas por Cytometric Bead Array (CBA).....	34
3.9 Confirmación de la inducción de NETosis por microscopía de fluorescencia.....	34
3.10 Producción de especies reactivas de oxígeno.....	35
3.11 Vías de calcio.....	35
3.12 Análisis estadísticos.....	36
4. RESULTADOS.....	37

4.1 Características demográficas y clínicas de los pacientes donantes de sueros incluidos en el estudio.....	37
4.2 Inducción de muerte celular de los neutrófilos por Cocaína y Levamisol	37
4.3 Liberación de MPO y no de EN en las NET de neutrófilos tratados con Cocaína, Levamisol y Cocaína- Levamisol.....	38
4.4 Inducción de muerte celular de los neutrófilos utilizando mezcla de sueros	39
4.5 Citoquinas como inductores de muerte celular de neutrófilos tratados con sobrenadantes de Cocaína, Levamisol, Cocaína- Levamisol y mezcla de suero de pacientes VICOL.....	39
4.6 ROS como posible mecanismo inductor de NETosis en neutrófilos tratados con Cocaína, Levamisol y Cocaína- Levamisol.....	40
4.7 Calcio como posible mecanismo inductor de NETosis en neutrófilos tratados con Cocaína, Levamisol y Cocaína- Levamisol.....	41
4.8 Modulación de la NETosis utilizando Butilbromuro de Hioscina (BBH) en neutrófilos tratados con Cocaína, Levamisol y Cocaína- Levamisol.....	41
4.9 Modulación de la NETosis con BBH en Neutrófilos tratados con la mezcla de sueros.....	42
5. FIGURAS Y TABLAS	43
Figura 1. Evaluación de pureza y viabilidad.....	43
Figura 2. Inducción de muerte celular	44
Figura 3. Confirmación de Inducción de muerte celular mediante anticuerpos dirigidos contra antígenos en las NET	45
Figura 4: Inducción de muerte celular.....	46
Figura 5: Citoquinas evaluadas por CBA.....	47
Figura 6: Liberación de especies reactivas de oxígeno.....	48
Figura 7: Calcio intracelular como mecanismo de NETosis.....	49
Figura 8: Modulación de NETosis.....	50
Figura 9: Modulación de NETosis	51
Tabla 1. Características sociodemográficas de pacientes donantes de suero incluidos en el estudio.....	52
Tabla 2: Manifestaciones clínicas de pacientes donantes de suero incluidos en el estudio.....	52
Tabla 3: Datos paraclínicos de pacientes donantes de suero incluidos en el estudio....	53
6. DISCUSIÓN.....	54
Figura 10: Modelo propuesto de la inducción de NETosis	61
7. CONCLUSIONES.....	62
8. REFERENCIAS	64
TRABAJOS EN EVENTOS.....	73

Lista de símbolos y abreviaturas

μL: Microlitros.

ACD: Solución citrato trisódico, ácido cítrico y dextrosa.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ANA: Anticuerpo antinuclear.

ANCA: Anticuerpo anticitoplasma del neutrófilo.

BBH: Butilbromuro de Hioscina.

CBA: Arreglo de perlas para citometría, del inglés “*cytometric bead array*”.

CD: Cluster de diferenciación.

CEC: Células endoteliales en circulación.

CHCC: Consenso de *Chapel Hill-2012*.

CI: Complejos Inmunes.

CRISP3: Proteína secretora 3 rica en cisteína.

DAMP: Patrones moleculares asociados a daño, del inglés “*Damage Associated Molecular Patterns*”.

DHR-123: Dihidrorrodamina-123.

DiOC-6: Yoduro de Dihexiloxacarbocianina, del inglés “*3,3'-Dihexyloxacabocyanine iodide*”.

EN: Elastasa del neutrófilo.

Fc: Fracción cristizable del anticuerpo.

GC-MS: Cromatografía gases/espectroscopía de masas.

GEPA: Granulomatosis eosinofílica con poliangitis.

GPA: Granulomatosis con poliangitis.

GRUA: Grupo de Reumatología de la Universidad de Antioquia.

ICAM-1: Molécula de adhesión intracelular 1, del inglés “*Intracellular adhesion molecule 1*”.

IL: Interleuquina.

IMF: Intensidad media de fluorescencia.

IP₃: Inositol trifosfato.

IP: Yoduro de propidio.

LPS: Lipopolisacárido.

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1, del inglés "*monocyte chemoattractant protein 1*".

mL: Mililitro.

MMP9: Mieloperoxidasa de matriz 9.

MPO: Mieloperoxidasa.

NCCD: Comité de nomenclatura de muerte celular, del inglés "*Nomenclature Committee on Cell Death*".

NET: Trampas extracelulares de neutrófilo, del inglés "*Neutrophils Extracellular Traps*".

PAD-4: Peptidil-Arginina-Deiminasa 4.

PAM: Poliangeitis microscópica.

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos, del inglés "*Pathogen-associated molecular pattern*".

p-ANCA: ANCA Patrón perinuclear.

PBS: Buffer fosfato salino, del inglés "*Phosphate buffered saline*."

PMA: 12 miristato, 13 acetato de forbol, del inglés "*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*".

PR3: Proteinasa-3.

ROS: Especies reactivas de oxígeno, del inglés "*Reactive Oxygen Species*".

RPMI-1640: Medio del instituto Roswell Park Memorial, del inglés "*Roswell Park Memorial Institute Medium*".

SBF: Suero bovino fetal.

SDF1: Factor derivado del estroma 1.

SNC: Sistema nervioso central.

TLR: Receptores tipo Toll, del inglés "*Toll like receptors*".

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés "*Tumor necrosis factor alpha*".

UNODC: Oficina de las naciones unidas contra drogas y el delito

VAA: Vasculitis asociada a ANCA.

VICOL: Vasculitis inducida por Cocaína Levamisol.

Resumen

Introducción: Desde 2010 se reportan casos de una nueva vasculopatía inducida por el consumo de cocaína contaminada con levamisol (VICOL), caracterizada por púrpura retiforme, necrosis de pabellones auriculares, compromiso multisistémico y positividad para múltiples autoanticuerpos. Se conocía la capacidad del levamisol de inducir reacción inmunológica con lesiones cutáneas y se habían descrito eventos con Cocaína; por la similitud que tiene la VICOL con la vasculitis asociada a anticuerpo anticitoplasma del neutrófilo se postula que pudieran compartir fisiopatologías entre ellas, así como la participación de neutrófilos y su muerte por NETosis.

Metodología: Neutrófilos de controles sanos fueron aislados por gradiente de densidad Ficoll-Dextran 3%, la viabilidad celular y pureza fueron evaluadas utilizando PI, DiOC₆, y CD45-PCy7, CD33-PE respectivamente. La inducción de muerte celular fue evaluada mediante el tratamiento con Cocaína, Levamisol, Cocaína-Levamisol, mezcla de suero de individuos control y mezcla de suero de pacientes VICOL. La cuantificación de NETosis se realizó mediante un método recientemente descrito, citometría de flujo, utilizando Sytox green, Hoechst-33342, anti- elastasa del neutrófilo (EN) y anti- mieloperoxidasa (MPO). La confirmación de este tipo de muerte se hizo al evaluar la morfología por microscopia de fluorescencia. La medición de especies reactivas de oxígeno (ROS) se realizó mediante citometría de flujo utilizando dihidrorodamina 123 (DHR-123) y para evaluar la participación de calcio o los receptores muscarínicos se utilizaron como inhibidores BAPTA y Butilbromuro de hioscina (BBH), respectivamente.

Resultados: La inducción de muerte celular fue observada en neutrófilos estimulados con Cocaína y Levamisol de forma individual, además de un efecto sinérgico en la inducción de NETosis al utilizar estos dos compuestos combinados. Aunque no se detectó la presencia de EN, la detección de ácido desoxirribonucleico (ADN) extracelular, el patrón morfológico evidenciado en el registro fotográfico por microscopia de fluorescencia y la presencia de MPO son sugestivas de NETosis.

Resultados preliminares con los inhibidores sugieren la participación de las vías dependientes de calcio y de receptores muscarínicos.

Conclusión: Estos resultados validan la citometría de flujo como una técnica útil para la evaluación de NETosis, además muestran la capacidad de la Cocaína y el Levamisol de inducir NETosis. También, nos sugieren que la vía de calcio y la participación de los receptores muscarínicos como posibles mecanismos de inducción de este tipo de muerte generada por Cocaína- Levamisol

Abstract

Introduction: Since 2010, there have been reported cases of a new vasculopathy induced by the consumption of cocaine contaminated with levamisole (VICOL), characterized by retiform purpura, bilateral earlobe necrosis, multisystem involvement, and positivity for multiple autoantibodies. The ability of levamisole to induce an immunological reaction with skin lesions was known and there had been described events with cocaine. Due to the similarity of VICOL with vasculitis associated with anti-neutrophil cytoplasmic antibody, it is postulated that they could share pathophysiologies, as well as the participation of neutrophils and their death by NETosis.

Methodology: Neutrophils from healthy controls were isolated by 3% Ficoll-Dextran density gradient, cell viability and purity were assessed using PI, DiOC6, and CD45-PCy7, CD33-PE respectively. Cell death induction was assessed by treatment with Cocaine, Levamisole, Cocaine-Levamisole, serum mixture from control individuals and serum mixture from VICOL patients. Quantification of NETosis was performed by a recently described method that employs flow cytometry, using Sytox green, Hoechst-33342, anti-neutrophil elastase (NE) and anti-myeloperoxidase (MPO). Confirmation of this type of death was made by assessing morphology with fluorescence microscopy. Measurement of ROS was performed by flow cytometry using DHR-123, and to evaluate the involvement of calcium or muscarinic receptors, BAPTA and hyoscine butylbromide were used as inhibitors, respectively.

Results: Induction of cell death was observed in neutrophils stimulated with Cocaine and Levamisole individually, in addition to a synergistic effect in the induction of NETosis when using these two compounds in combination. Although the presence of NE was not detected, the detection of extracellular DNA, the morphological pattern evidenced in the photographic record by fluorescence microscopy and the presence of MPO are suggestive of NETosis. Preliminary results with inhibitors suggest the involvement of calcium-dependent pathways and muscarinic receptors.

Conclusion: These results validate flow cytometry as a useful technique for the evaluation of NETosis and show the ability of Cocaine and Levamisole to induce NETosis. Also, they suggest the calcium pathway and the participation of muscarinic receptors as possible mechanisms of induction of this type of death generated by Cocaine-Levamisole.

1. Introducción

1.1 Antecedentes

Las vasculopatías son un grupo de enfermedades que afectan los vasos sanguíneos caracterizada por lesiones isquémicas de diferentes órganos las cuales pueden ser leves o ser tan graves para conducir a la muerte (1). Las vasculitis, un tipo de vasculopatías, se caracteriza por la inflamación de los vasos sanguíneos, estas pueden clasificarse según el calibre de los vasos y su etiología en primarias o secundarias. Las vasculitis primarias son aquellas en las que no se logra identificar un desencadenante concreto y las vasculitis secundarias son inducidas por medicamentos, infecciones, neoplasias o enfermedades autoinmunes (2,3).

El Levamisol, uno de los adulterantes de la Cocaína, se ha visto asociado a vasculitis, desde 1999 se ha encontrado casos en los cuales los pacientes tratados con este medicamento presentaron placas purpúricas en ambas mejillas y necrosis en pabellones auriculares; por lo que tuvo que ser retirado del mercado y solo se permitió su uso veterinario (4,5). En el año 2002, en estados unidos se conoció por primera vez, que el Levamisol era utilizado como adulterante de la cocaína y en menos de una década la adulteración paso del 1% al 70%, (4,6,7). En 2010 se describieron casos de VICOL, donde los individuos presentan diversas manifestaciones clínicas como presencia de púrpura retiforme dolorosa con o sin necrosis central y ampollas hemorrágicas; además de títulos altos de auto anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo (ANCA), antinucleares (ANA), Anti-MPO y Anti-Proteinasa 3 (PR3) (8,9).

Otro grupo de vasculitis primarias, son las Vasculitis asociadas a ANCA (VAA), caracterizada por la presencia de estos anticuerpos en circulación, los cuales van dirigidos contra componentes del citoplasma de los neutrófilos, como la MPO y PR3 (10,11). Se conoce que estas células participan activamente en la fisiopatología de estas vasculitis, ellas presentan diferentes tipos de muerte celular como necrosis y apoptosis; sin embargo, recientemente se ha conocido una muerte celular diferente

en los neutrófilos, llamada NETosis, la cual se caracteriza por la liberación de contenido citoplasmático y nuclear al espacio extracelular mediante trampas extracelulares del neutrófilo (NET, por sus siglas en inglés). Se ha encontrado que el Levamisol puede inducir la liberación de NET (12), sin embargo, no se conoce si el uso combinado de Cocaína con Levamisol, tiene un efecto en la inducción de NETosis y pudiera explicar algo de la fisiopatología y presentación de la VICOL la cual puede semejarse a las vasculitis ANCA positivo.

Por otro lado, la NETosis se puede dar a partir de diferentes mecanismos, entre los principales se encuentran activación de diferentes receptores, entre ellos los muscarínicos, la producción de ROS a partir de la activación del sistema NADPH-oxidasa y mediante la inducción del aumento de calcio intracelular, llevando a una posterior activación de la enzima peptidil-arginina-deiminasa 4 (PAD-4). (13). Aunque en pocos estudios se ha reportado el mecanismo de inducción de liberación de NET en neutrófilos tratados con Levamisol, aun no se conoce cuál es el mecanismo por el cual ambos compuestos inducen este tipo de muerte celular

Conocer los mecanismos que participan en la NETosis como probable evento desencadenante de la VICOL puede darnos posibles opciones terapéuticas, ya que actualmente, el tratamiento utilizado para esta entidad son los inmunosupresores, los cuales hacen propensos a los pacientes al desarrollo de enfermedades, por lo que, se considera que el uso de antagonistas muscarínicos (butilbromuro de hioscina) pueda ser una posible herramienta terapéutica, debido a que este tipo de receptores se encuentran en los neutrófilos y son activados por compuestos como el Levamisol.

1.2 Marco teórico

1.2.1 Vasculopatías

Las vasculopatías son un grupo de enfermedades que afectan los vasos sanguíneos caracterizadas por lesiones isquémicas de diferentes órganos pueden ser leves o tan graves como para conducir a la muerte. Entre ellas se incluyen alteraciones vasculares causadas por condiciones degenerativas, metabólicas, e inflamatorias, siendo múltiples las etiologías descritas (1). Las vasculitis, un tipo de vasculopatía, se caracterizan por la inflamación de los vasos sanguíneos, a menudo, acompañadas de isquemia, necrosis e inflamación de los órganos afectados. Las manifestaciones clínicas son diversas y dependen del tamaño, ubicación y grado de inflamación de los vasos afectados y del patrón de inflamación extravascular. Una característica histológica importante es la presencia de células del sistema inmune alrededor y en el interior de la pared de los vasos sanguíneos, principalmente neutrófilos en las lesiones agudas y linfocitos en las lesiones crónicas (2). El consenso de *Chapel Hill-2012* (CHCC-2012, por sus siglas en inglés), las clasificó según el calibre de los vasos predominantemente afectados y, de acuerdo con su etiología, en primarias y secundarias (3). Las vasculitis primarias son aquellas en las que no se logra identificar una etiología o desencadenante concreto y no hay una clara asociación con otra enfermedad o exposición. Las vasculitis secundarias incluyen cuatro grandes grupos; las cuales son: inducidas por medicamentos o tóxicos (antihipertensivos, antibióticos, antitiroideos entre otros), las secundarias a infecciones usualmente virales, aquellas asociadas con neoplasias principalmente hematológicas y las relacionadas con otras enfermedades autoinmunes (14,15). Existen varios factores que determinan las diferencias clínicas entre las vasculitis, incluyendo la gravedad del daño vascular, la localización, el calibre de los vasos afectados (pequeño, mediano o grande) y la intensidad de la respuesta local y sistémica (16).

Desde hace muchos años, se conocen casos de vasculitis asociadas a medicamentos, en 1970 se reportaron casos de vasculitis inducida por

Propiltiouracilo, un tiamida utilizada principalmente para tratar el hipertiroidismo, se observó que los pacientes presentaban gran variedad de manifestaciones clínicas y paraclínicas como agranulocitosis, anemia aplásica, hepatitis y vasculitis, además de títulos altos de autoanticuerpos como ANA y ANCA con patrón perinuclear (p-ANCA). La discontinuación del medicamento en los pacientes resolvía la vasculitis (17,18). Otro medicamento asociado a la inducción de vasculitis es la Hidralazina, utilizada en pacientes con hipertensión arterial, actúa causando vasodilatación en arterias y arteriolas permitiendo la disminución de la presión arterial; sin embargo, se han descrito efectos secundarios tales como la inducción de lupus y vasculitis con títulos elevados de ANCA y ANA, al igual que manifestaciones clínicas sugestivas de estas enfermedades como pancitopenia, exantema malar, artralgias, y lesiones en piel (19–21).

El Levamisol, un antihelmíntico con efectos inmunomoduladores y adyuvantes en el tratamiento del cáncer, por su capacidad de aumentar la quimiotaxis de macrófagos y neutrófilos (4,5); al igual que los medicamentos antes descritos, se ha asociado con el desarrollo de vasculitis. En 1999, en un estudio de serie de casos realizado por Rongioletti y colaboradores, en 5 niños con síndrome nefrótico tratados con Levamisol durante 24 meses, se observó como efecto adverso, la aparición de máculas purpúricas y eritematosas, áreas necróticas que crecían rápidamente y afectación de los pabellones auriculares en todos los pacientes, lesiones que se resolvían luego de 2-3 semanas de suspendido el tratamiento con Levamisol. En el año 2000, el Levamisol tuvo que ser retirado del mercado para uso humano debido a los múltiples casos de agranulocitosis y vasculitis en pacientes tratados con este medicamento, por lo que solo se permitió su uso veterinario (6).

En el año 2002, en Estados Unidos se conoció por primera vez, que el Levamisol era utilizado como adulterante de la cocaína y en menos de una década la adulteración paso de 1% al 70%, observándose un incremento significativo en reportes de casos de pacientes consumidores de Cocaína que desarrollaban neutropenia e infecciones graves en diferentes ciudades de este país (4,7,22,23); Bradford y colaboradores en el año 2010, reportaron los primeros dos casos de

VICOL, los cuales se caracterizaban por la presencia de placas purpúricas dolorosas en ambas mejillas, necrosis en pabellones auriculares, artralgias y neutropenia (8). En 2019, Muñoz Vahos y colaboradores reportaron la serie de casos más grande de esta vasculitis descrita hasta ahora en la literatura, incluyendo consumidores de Cocaína adulterada con Levamisol en Colombia, encontrando mayor prevalencia en hombres. Estos individuos presentan diversas manifestaciones clínicas, incluyendo púrpura retiforme dolorosa con o sin necrosis central y ampollas hemorrágicas, que compromete pabellones auriculares, cara, tronco y extremidades; además de la afección de otros órganos y sistemas (articular, renal, hematológico, respiratorio, entre otros). En los estudios paraclínicos realizados en los pacientes VICOL, observaron la presencia de leucopenia, neutropenia, linfopenia, títulos altos de diferentes autoanticuerpos incluyendo los ANCA, de tipo anti-MPO, predominante y ocasionalmente anti-PR3, además de los ANA, anticuerpos antifosfolípidos y anti-DNA de doble cadena (9,24)

Previo a la descripción de estas vasculitis en consumidores de Cocaína adulterada con Levamisol y compartiendo la característica de la presencia de ANCA se conoce ampliamente otro grupo de vasculitis primarias denominadas, VAA, caracterizadas por la presencia de estos anticuerpos en circulación, los cuales están dirigidos contra componentes del núcleo y citoplasma de los neutrófilos y monocitos (11,25). VAA incluye 3 fenotipos clínicos: granulomatosis con poliangeitis (GPA), poliangeitis microscópica (PAM), granulomatosis eosinofílica con poliangeitis (GEPA) y las formas limitadas a un órgano, usualmente las VAA limitadas a riñón; son enfermedades con comportamiento clínico remitente y recurrente; además, se caracterizan por la infiltración de vasos sanguíneos de pequeño y mediano calibre las cuales son infiltrados por células inflamatorias que causan destrucción vascular e isquemia tisular secundaria, Los principales blancos antigénicos de ANCA son PR-3 y MPO, anticuerpos que se detectan en la mayoría de los pacientes con VAA activa (26–28); Millet y colaboradores demostraron que los genes que codifican estos autoantígenos se sobre expresan en los neutrófilos de pacientes con VAA (29). La PR3 se almacena en los gránulos primarios o azurófilos y en vesículas secretoras del neutrófilo, sin embargo, después de la activación y durante la

apoptosis, la PR3 se expresa en la superficie de estas células (26). La MPO es la proteína más abundante de los neutrófilos, se encuentra almacenada en los gránulos primarios de estas células con capacidad altamente microbicida (30), actúa como facilitadora de inflamación y daño tisular en enfermedades inflamatorias crónicas. Normalmente esta proteína es sintetizada durante la mielopoyesis, pero se ha observado que en pacientes con VAA hay una síntesis aberrante en neutrófilos maduros (26,31,32).

En las VAA ya sean anti-MPO o anti-PR3 positivas, se observa una pérdida en la tolerancia a estas proteínas, lo que lleva a la generación de linfocitos B específicos productores de anticuerpos contra PR3 y MPO. Además, los neutrófilos pueden ser activados mediante proteínas del complemento como C5a, las cuales inducen la externalización de MPO en la superficie del neutrófilo, permitiendo así el reconocimiento por ANCA-MPO. Estos anticuerpos inducen en las células endoteliales la expresión de diferentes moléculas de adhesión como ICAM-1 e ICAM-2 que interactúan con selectinas e integrinas presentes en los neutrófilos generando una disminución en la velocidad de flujo de estas células en el vaso sanguíneo, permitiendo la transmigración de los neutrófilos, los cuales van a liberar sus NET causando lesiones directas a través de la liberación de ROS, proteasas, histonas y proteínas de los gránulos (MPO, EN, PR3), entre otros; atrayendo células inmunes como linfocitos T específicos de MPO y macrófagos, mediante la liberación de quimioquinas convirtiéndose en un círculo vicioso que lleva a la lesión vascular, fenómenos trombóticos y la posterior isquemia de órganos, con un ambiente inflamatorio en el espacio intersticial, lo cual se traduce en las manifestaciones clínicas de los pacientes como se mencionará más adelante (33).

1.2.2 Neutrófilos

Los Neutrófilos constituyen la subpoblación más abundante de leucocitos en circulación (50-70%), con una vida media de 5 a 10 horas (34). Son generados continuamente en la médula ósea a partir de precursores mieloides y su reclutamiento, activación y supervivencia en los tejidos dañados es favorecido por

las células Th17 (35). Tienen un papel importante en la inmunidad innata, ya que son las primeras células en llegar al sitio de infección y desencadenar diferentes mecanismos de defensa del hospedero; actúan como importantes reguladores de la inmunidad adaptativa, la activación del complemento y la modulación de la respuesta inflamatoria (36). Estructuralmente se identifican por su núcleo multilobulado (2-5 lóbulos), y la presencia de dos tipos de gránulos en el citoplasma, cada uno cargado con diferentes proteínas proinflamatorias y formados consecutivamente durante su maduración (37). Los gránulos primarios (azurófilos o peroxidasa positivos) contienen principalmente proteínas antimicrobianas como la MPO, EN y PR3, mientras que los gránulos secundarios (específicos o peroxidasa negativos) almacenan altas concentraciones de lactoferrina, proteína secretora 3 rica en cisteína (CRISP3) y gelatinasa (mieloperoxidasa de matriz 9, MMP9) (38,39). Cuando los neutrófilos completan su maduración en médula ósea, salen a circulación donde cumplen un papel como centinelas y actúan en respuesta a agentes infecciosos e inflamatorios (40).

1.2.3 NETosis: muerte celular de los neutrófilos

La muerte celular es un proceso que ayuda a mantener la homeostasis de tejidos, organismos o colonias. Históricamente se han conocido tres tipos de muerte celular: apoptosis, autofagia y necrosis, no obstante, el comité de nomenclatura de muerte celular (NCCD) del 2018, reconoció hasta 14 tipos de muerte celular, apoptosis intrínseca, apoptosis extrínseca, necrosis dirigida por la transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT), necroptosis, ferroptosis, piroptosis, partanatos, muerte celular entóxica, muerte celular dependiente de lisosoma, muerte celular dependiente de autofagia, muerte celular inmunogénica, senescencia celular, catástrofe mitótica y NETosis (41). Esta última un tipo de muerte celular característica de los neutrófilos.

La NETosis se caracteriza por la liberación del contenido citoplasmático y nuclear al espacio extracelular mediante redes, denominadas NET en respuesta a una infección por bacterias, hongos, virus o en general patrones moleculares asociados

a patógenos (PAMP) o a patrones moleculares asociados a daño (DAMP) (42–44). Este tipo de muerte celular comenzó a conocerse desde 1996, cuando Takei y colaboradores, en una evaluación realizada en neutrófilos estimulados con 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) como potente activador de muerte en neutrófilos, observaron cambios morfológicos que diferían de los presentados en otras muertes como apoptosis o necrosis típicas; ellos evidenciaron que la cromatina disminuía uniformemente su compactación y se daba un rompimiento en la envoltura nuclear; además, los gránulos citoplasmáticos no sufrían desgranulación. Otro cambio importante que destacaron los investigadores, fue el aumento en la permeabilidad de la membrana citoplasmática, lo cual se observó después de 3 horas de incubación con PMA, concluyendo que los neutrófilos estaban sufriendo una muerte celular atípica (45)(46).

Luego de casi una década de estudios sobre este tipo de muerte celular, en 2004 Brikmann y colaboradores lograron evaluar la formación de NET y descubrir la actividad bactericida de estas estructuras. Ellos estimularon los neutrófilos con 10ng de interleucina-8 (IL-8) o PMA a 25 nM e incubaron 45 y 30 minutos respectivamente. Al visualizar las células mediante microscopía electrónica encontraron que estas formaban redes extracelulares prominentes, de 15 a 17 nm de longitud, en comparación con células sin estimular, que no presentaban estos cambios; asimismo, observaron por inmunofluorescencia que las NET estructuralmente estaban conformadas por componentes celulares como cromatina e histonas y proteínas granulares como MPO, PR3 y EN (47). En el 2006, se evidenció que las NET proporcionan una alta concentración de moléculas antimicrobianas al microambiente extracelular y que degradan los microorganismos eficazmente; además son abundantes en sitios inflamatorios y se asocian a entidades clínicas como apendicitis, preeclampsia, fascitis necrotizante, vasculitis, procesos neoplásicos e inmunodeficiencias (48,49).

A partir de estos hallazgos, en el grupo de Arturo Zychlinsky en el 2007, se definió la NETosis como una muerte celular regulada diferente a necrosis y apoptosis, Estos investigadores primero determinaron la morfología celular por microscopia

electrónica de transmisión y fluorescencia, fijaron los neutrófilos en diferentes tiempos y pasados 70 minutos de la activación se observaron los primeros cambios, los lóbulos del núcleo empezaron a deformarse, la cromatina a descondensarse y la membrana nuclear permaneció intacta; a los 120 minutos la membrana nuclear formó pequeñas vesículas y a los 180 minutos esta membrana se desintegró y los gránulos desaparecieron; sin embargo, observaron que la membrana plasmática de los neutrófilos permanecía intacta después del tiempo del estímulo. Luego evaluaron la diferencia entre la muerte celular por apoptosis y NETosis; para inducir apoptosis incubaron los neutrófilos con anticuerpos anti-Fas por 18 horas, las células muertas mostraron la morfología clásica de apoptosis, que consiste en fragmentación del núcleo sin ruptura de la envoltura nuclear y vacuolización citoplasmática; para el caso de la NETosis, se incubaron los neutrófilos con PMA durante 4 horas, en este caso se observó una desintegración de la membrana nuclear, la mezcla del contenido nuclear y citoplasmático y la desaparición de los gránulos citoplasmáticos, confirmando que la NETosis es una muerte celular diferente. Posteriormente para la evaluación de la formación de NET, utilizaron fragmentos Fab de anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia dirigidos contra complejos compuestos de histonas o EN, observándose la presencia de estas estructuras solo en los neutrófilos tratados con PMA, concluyendo que la muerte dada en los neutrófilos era NETosis, debido a la presencia de contenido nuclear y citoplasmático en las NET (50).

En las investigaciones acerca de la estructura y función de las NET, se describieron dos modelos de NETosis, donde la principal diferencia es la naturaleza del estímulo: NETosis Vital y NETosis suicida o convencional (51–53); en la primera se da el reconocimiento de PAMP por receptores de la superficie celular de los neutrófilo como receptores tipo toll-4 (TLR-4) y receptores del complemento, el neutrófilo es activado, se da la producción de ROS mitocondrial induciendo el cambio tanto en la forma multilobulada del núcleo como en la membrana nuclear; el contenido nuclear es puesto dentro de vesículas; las cuales son liberadas por medio de las NET; en este modelo el neutrófilo no muere. El segundo modelo, la NETosis suicida o convencional, es un proceso lento de 2-4 horas, inducido por PMA, lipopolisacárido

(LPS) u otros estímulos no infecciosos (como fármacos o drogas), donde la molécula es reconocida por los receptores de membrana como TLR, receptores de la fracción cristalizable del anticuerpo (RFc), y receptores muscarínicos acoplados a proteína G. Una vez es activado el neutrófilo inician múltiples vías de señalización, entre ellas la vía Raf/MEK/ERK, llevando a una posterior activación de la NADPH-oxidasa lo que desencadena la liberación ROS, que inducen en los gránulos la liberación de proteínas antimicrobianas como MPO y EN, que migrarán al núcleo de la célula. Por otro lado, la activación del neutrófilo induce el aumento de calcio intracelular llevando a la activación de la PAD-4 enzima que una vez activada se transloca al núcleo y citrulina las histonas facilitando la descondensación de la cromatina. Al mismo tiempo, se puede estar activando el inflammasoma NLRP3 y por ende el clivaje de la gasdermina-D, proteína encargada de formar los poros en la membrana plasmática facilitando la liberación de las NET y la muerte celular. (40,53–55).

1.2.4 NETosis y Vasculitis asociada a ANCA

Los ANCA son anticuerpos tipo inmunoglobulina G que reconocen antígenos expresados en la superficie de los neutrófilos, se clasifican según el patrón de inmunofluorescencia en c-ANCA o p-ANCA, el cual se evidencia luego de poner en contacto neutrófilos con los anticuerpos. El patrón c-ANCA, es citoplasmático difuso y el antígeno principal frente al cual van dirigidos es la PR3; por otro lado, el patrón p-ANCA, perinuclear, presenta una fluorescencia en forma de anillo rodeando el núcleo, en este caso el antígeno diana es la MPO (56). En la activación del neutrófilo por estos anticuerpos participan receptores presentes en la superficie de neutrófilos o monocitos (receptores del complemento) sin embargo, los ANCA también pueden unirse a los receptores presentes en las células endoteliales y otros constituyentes del tejido en los sitios de la lesión (57).

Algunos hallazgos clínicos y resultados de investigaciones han sugerido el efecto activador de los ANCA sobre los neutrófilos durante la patogénesis de VAA, activación que conduce a una mayor adhesión de los neutrófilos al endotelio de los

vasos sanguíneos y a la activación del complemento, liberando C5a el cual a su vez potencia la respuesta inflamatoria al actuar como un quimio atrayente de más neutrófilos al sitio de inflamación donde son activados por estos anticuerpos, producen ROS, sufren desgranulación y finalmente la formación de las NET. También se ha encontrado la persistencia de estos anticuerpos en los tejidos por acción de la actina (una proteína liberada en la NETosis), en los pacientes con vasculitis de vasos pequeño y mediano calibre (27,58–60).

El compromiso renal presente en un grupo significativo de pacientes con VAA, se caracteriza por la infiltración de monocitos, macrófagos glomerulares y linfocitos T (61). Mediante estudios realizados en biopsias de riñón de pacientes con VAA confirmada, se ha evidenciado la presencia de NET; Kessenbrock y colaboradores, observaron la presencia de estas estructuras en los glomérulos mediante colocaciones de ADN y proteínas granulares PR3, LL37, EN y MPO (62); en otro estudio utilizando inmunotinción, Yoshida y colaboradores encontraron NET conformadas por histonas citrulinadas (H3 y H4), MPO y PAD-4 en lesiones necrotizantes en la fase inicial de la poliangeitis asociada a ANCA.(63); Además se ha notado la presencia de calprotectina, un heterodímero complejo de 2 proteínas unidas a calcio intracelular (S100A8 y S100A9), presentes en los neutrófilos y monocitos, y una vez estas células son activadas, secretan las calprotectinas, las cuales se unen a células endoteliales e inducen efectos proinflamatorios (64). Pepper y colaboradores, por medio de ensayos de inmunohistoquímica en biopsias renales observaron que los pacientes con VAA y lesión glomerular presentaban mayor expresión de calprotectina en comparación con individuos sanos; ellos también evaluaron los niveles séricos de este heterodímero por medio de ELISA, encontrando un incremento en los pacientes con vasculitis activa y disminución en pacientes con inflamación subclínica; sin embargo, hasta el momento no se ha identificado la contribución real de la calprotectina asociada a las NET, se cree que la localización diferencial de estas proteínas unida a estas estructuras pueda permitir ser multifuncional y aumentar la respuesta inmune (65).

Además del aumento de las NET en sitios de lesión inflamatoria en los pacientes con VAA, también se ha observado la presencia de estas estructuras en circulación. Se ha considerado que las NET tienen dos papeles en la inmunidad innata, atacan el patógeno, pero a su vez participan en procesos autoinmunes y auto inflamatorios, por lo que se cree que estas estructuras son muy importantes en la patogénesis de las VAA (66,67). Como se ha mencionado en el presente texto, PR3 y MPO son los principales blancos antigénicos de los ANCA, las células dendríticas también logran reconocer estas proteínas, las presentan a los linfocitos T CD4+ presentes en los ganglios linfáticos, los cuales participan en la activación de linfocitos B y su posterior diferenciación a células plasmáticas productoras de ANCA (68). Por otro lado, estos anticuerpos pueden estar activando neutrófilos aumentando la expresión de receptores de adhesión como β -integrinas, las cuales se unen a ICAM-1 e ICAM-2 presentes en células endoteliales permitiendo el rodamiento y la transmigración del neutrófilo al sitio de inflamación (54). Se ha observado que la liberación de NET inducida por ANCA es mucho mayor en pacientes con VAA activas, sin embargo, no todos los ANCA son patogénicos y podrían facilitar la eliminación de las NET mediante la opsonización y formación de complejos inmunes, hipótesis propuesta por Söderberg y colaboradores al encontrar que los niveles de los remanentes de NET diferían entre pacientes con VAA activa y en remisión (69).

Aunque se ha demostrado la Cocaína y el Levamisol pueden inducir la liberación de NET de manera independiente y llevar finalmente a una vasculitis secundaria en un paciente genéticamente predispuesto, hasta ahora se desconoce cómo interactúan con precisión estas dos sustancias en la inducción de la VICOL. Sí bien la frecuencia de vasculitis incrementa en los individuos que consumen Cocaína adulterada con Levamisol, no está claro cuál es el efecto a nivel celular sobre los neutrófilos humanos de la exposición simultánea a estas sustancias, principales inductores de NET y posterior generación de ANCA en estos pacientes. En este trabajo quisimos explorar *in vitro* si el tratamiento con Cocaína y Levamisol de manera concomitante inducen la formación de NET de forma diferencial en comparación con el uso de un solo compuesto, y la presencia de proteínas de los gránulos (MPO, EN) en estas

redes, como marcadores típicos de la NETosis asociada a la patogénesis de estas vasculopatías.

1.2.5 Mecanismos implicados en la inducción de NETosis

Como se ha mencionado en el documento, se puede inducir la muerte de los neutrófilos a través de diferentes mecanismos, una de ellas, mediante NETosis, la cual se puede dar por la producción de ROS y el aumento de calcio intracelular. Los ROS son liberados a partir de la activación del sistema NADPH oxidasa, su principal función es la destrucción de los patógenos, pero además se ha encontrado su relación en la disociación de las proteínas de los gránulos (MPO, EN) induciendo su liberación al citoplasma, estas se translocan al núcleo y participan en la descondensación de la cromatina.

El otro mecanismo implicado en la muerte por NETosis es mediado por el aumento de calcio en el espacio intracelular, lo que lleva a la activación de la PAD-4, importante en el proceso de citrulinación de las histonas (70,71). Con el fin de establecer si este mecanismo participa en la inducción de NETosis por Cocaína-Levamisol se pueden utilizar diferentes estrategias, una de ellas es el uso de inhibidores como el BAPTA, un ácido amino carboxílico específico de calcio, el cual permite la unión de dos iones de calcio, disminuyendo la cantidad de calcio libre en el citoplasma. Si la inhibición de las vías de calcio reduce la NETosis inducida podría afirmarse que esta vía tiene un papel en la inducción de este tipo de muerte celular (72).

El inflammasoma es un complejo multiproteico que se activa luego del reconocimiento de múltiples estímulos derivados de patógenos, medicamentos, células muertas, entre otros; es esencial en la respuesta inmune innata y adaptativa, sin embargo, el exceso de activación de este complejo se asocia con el desarrollo de enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, VAA, entre otros) (73). Este podría ser otro mecanismo implicado en la inducción de muerte por liberación de NET, mediante la secreción de interleucinas bioactivas como IL-1 β e IL-8 (74). Aunque no es muy claro el papel de las citoquinas en la inducción de

NETosis, algunos mediadores inflamatorios se han visto asociados al desarrollo de vasculitis como son IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8, los cuales alteran la homeostasis de la microvasculatura y el flujo sanguíneo. La citocina IL-8, específica de neutrófilos, promueve la adhesión, desgranulación y estallido respiratorio en estas células (75).

Los receptores muscarínicos, acoplados a proteínas G de membrana, ejercen una gran variedad de acciones intracelulares. Estos receptores se dividen en cinco subtipos, el M1 importante en la corteza cerebral; M2 en las aurículas del corazón, M3 en los vasos sanguíneos y músculo liso, M4 y M5 en sistema nervioso central; además, se ha observado que M1 y M3 se encuentran asociados al aumento de calcio intracelular y activación de la PAD-4 en los neutrófilos (76). En algunos estudios se ha encontrado que la Cocaína y el Levamisol tienen efectos agonistas sobre estos receptores en la activación de estas células, Carmona y colaboradores en un estudio realizado en neutrófilos tratados con Levamisol, evaluaron por medio de inhibidores de los receptores muscarínicos M1 (Tele) y M3 (4-DAMP) la modulación en la liberación de NET, observando que el inhibidor del receptor M3 reducía la muerte de los neutrófilos inducida por Levamisol, lo que indica que este compuesto tiene una participación agonista en los receptores muscarínicos M3, facilitando la NETosis; y que una vez activados desencadenan una vía a través de señalización activando RAF/MEK/ERK y NADPH oxidasa. Adicionalmente estos investigadores, encontraron que los neutrófilos de pacientes con enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide, tenían un aumento en la expresión de estos receptores muscarínicos en la superficie celular (13). En otro estudio realizado por Irizarry y colaboradores en el cual evaluaron los mecanismos por los cuales algunos medicamentos implicados en casos de autoinmunidad inducida por fármacos (hidralazina, procainamida, clozapina, minociclina) favorecen la formación de NET, observando que la procainamida indujo la formación de NET mediante la activación de receptores muscarínicos presentes en los neutrófilos evaluados (77).

1.2.6 Vasculitis inducida por Cocaína-Levamisol

La Cocaína, alcaloide obtenido de la hoja de coca (*Erythrocylum coca*), es comúnmente consumida mediante la inhalación y la inyección vía intravenosa. En el informe mundial sobre drogas ilícitas realizado por la Oficina de las Naciones unidas contra la Droga y el Delito (UNODC) en el 2019, se reportó que alrededor de 20 millones de personas entre 15-65 años ha usado esta droga como alucinógeno recreativo; siendo Oceanía (2,7%), Norteamérica (2,1%), Europa (1,4%) y Suramérica (1,0%) las regiones con mayor consumo. En esta última región, se evidenció que cerca de 3 millones de personas habían consumido cocaína en el 2018, teniendo una tendencia alta y uniforme en personas entre los 16-24 años, principalmente hombres (78). En Colombia en el 2019, 2,07% de la población entre 18-64 años, reporto haber utilizado Cocaína, con diferencias significativas entre usuarios hombres y mujeres 3,38% vs 0,86%, respectivamente. En los últimos años se ha observado que algunos departamentos tiene una prevalencia superior al consumo promedio nacional (0,57%), destacándose Antioquia (1,2%), Risaralda (1,1%) y Caquetá (1,0%) (79).

La Cocaína es utilizada como anestésico local y como droga recreativa (80), pues tiene importantes efectos psicotrópicos en el sistema nervioso central (SNC), inhibe la recaptación de dopamina y aumenta sus niveles en la hendidura sináptica; sin embargo, se han reportado múltiples reacciones adversas (81,82). Desde hace varias décadas se comenzaron a observar los diferentes efectos secundarios que presentaban los consumidores de este alcaloide, incluyendo la muerte por fenómenos isquémicos y hemorragias cerebrales. (83). En 2001 Kumar y Smith describieron un posible caso de vasculitis asociado al consumo de Cocaína (84). Ese mismo año, Trimarchi y colaboradores publicaron un estudio de 18 casos de pacientes consumidores de Cocaína atendidos entre 1991 y 1999, donde evaluaron las características clínicas, histológicas y serológicas que presentaban estos individuos, encontrando lesiones ulcerativas necrosantes difusas, formación de costras y perforación del septo nasal; además los pulmones, oídos y nervios craneales también se vieron afectados. Respecto a los resultados serológicos, la

prueba de anticuerpo ANCA fueron positivos en 13 de los 18 pacientes, y en los estudios radiológicos encontraron que todos los pacientes presentaron perforación septal y 12 tenían destrucción parcial del cornete medio. Al evaluar las biopsias de piel, observaron cambios consistentes de fibrosis, inflamación, necrosis extensa, al igual que infiltrados de mononucleares, neutrófilos y eosinófilos (85).

En un estudio, publicado en el 2011 por Saéz y colaboradores a partir de ensayos realizados en 20 pacientes consumidores de Cocaína, se evaluó el número de células endoteliales en circulación (CEC) y diferentes marcadores de disfunción endotelial como el factor 1 derivado del estroma (SDF-1), la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), la molécula de adhesión intracelular soluble (sICAM), entre otras. Se encontró que la Cocaína induce disfunción de las células endoteliales, al observar un aumento significativo en el número de CEC y niveles elevados de los marcadores de daño endotelial en los individuos con consumo activo de Cocaína respecto a los individuos controles. Cuando se analizaron los individuos luego de un mes de abstinencia se logró evidenciar que el número de CEC disminuyó significativamente, aunque los niveles de MCP-1 seguían altos, sugiriendo así un alto grado de daño endotelial persistente incluso en ausencia de consumo (86).

Siempre a lo que ocurre en el resto del mundo, la Cocaína que se consume en Colombia tiene diferentes tipos de adulterantes como clenbuterol, fentanilo, diltiazem, hidroxicina, lidocaína, aminopirina y Levamisol (87), los cuales son utilizados principalmente para aumentar el peso y la potencia de algunos efectos psicotrópicos en las preparaciones del alcaloide aumentando así las ganancias y potenciando los efectos en el de la droga (5,88). Desafortunadamente, algunos adulterantes se han visto asociados con un aumento significativo de las sobredosis o las muertes por envenenamiento entre los usuarios (88).

El Levamisol, uno de los adulterantes, es metabolizado por vía hepática, generando dos metabolitos principales, el p-hydroxilevamisol y el aminorex (89); su vida media es de cinco horas, siendo una limitante para su detección en la orina. Este compuesto posee múltiples acciones farmacodinámicas que pueden favorecer su

uso como adulterante de la Cocaína: Se ha encontrado en estudios en animales (perros y cobayos) que inhibe la monoamino oxidasa tipo A, disminuye la recaptación de serotonina (90) y actúa como agonista del receptor nicotínico y como modulador alostérico de estos receptores (91). Igualmente se ha propuesto que podría incrementar los efectos placenteros y de dependencia de la Cocaína por tener un efecto agonista sobre los receptores nicotínicos centrales, estimular la actividad glutamatérgica en las neuronas dopaminérgicas del sistema de mesolímbico involucrado en el proceso de recompensa (92). Su vida media plasmática corta, rápida absorción y eliminación, además de sus características físicas (polvo blanco), psicotrópicas y la dificultad de detección, hacen del Levamisol un contaminante ideal de la Cocaína aumentando el peso y cantidad de esta. Actualmente las pruebas estandarizadas para la detección de Levamisol no están ampliamente disponibles, pero en laboratorios especializados se puede detectar mediante cromatografía líquida/espectroscopía de masas (GC-MS), aunque la prueba puede ser negativa si se realiza más 24 horas después de la exposición. (88,93)

1.3 Planteamiento del problema

la NETosis se ha visto implicada en la patogénesis de las VAA primarias, entidad con semejanzas clínicas y serológicas con la VICOL; queda por resolver, si los neutrófilos al estar en presencia de Cocaína y Levamisol son capaces de inducir muerte por NETosis y semejar a lo observado en VAA; Además, sería interesante aclarar cuál es la vía de activación de este tipo de muerte, y así proponer posibles opciones de manejo de esta nueva enfermedad.

2. Objetivos

2.1 General

Evaluar la inducción de NETosis, la producción de citoquinas por neutrófilos de controles sanos y la modulación de este tipo de muerte con agentes anticolinérgicos, luego de diferentes estímulos, para entender mejor la fisiopatología, establecer asociaciones clínicas y proponer posibles medidas terapéuticas.

2.2 Específicos

- 2.2.1 Describir las características clínicas, sociodemográficas y paraclínicas de los pacientes con VICOL
 - 2.2.2 Cuantificar y establecer posibles diferencias en la magnitud de la NETosis en neutrófilos de controles sanos inducida por Cocaína, Levamisol, Cocaína más Levamisol, suero de pacientes con VICOL, suero de controles sanos y PMA.
 - 2.2.3 Determinar las concentraciones de IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α producidas por neutrófilos de controles sanos tratados con Cocaína, Levamisol, Cocaína más Levamisol, suero de pacientes con VICOL y suero de controles sanos.
- 2.1.1. Establecer el grado de inhibición de la NETosis inducida por Cocaína, Levamisol o Cocaína más Levamisol en neutrófilos de controles sanos, empleando antagonistas colinérgicos de uso común (BBH).
 - 2.1.2. Evaluar la producción ROS como un mecanismo de inducción de muerte celular en neutrófilos luego de ser estimulados con Cocaína, Levamisol y la mezcla de ambos componentes
 - 2.1.3. Evaluar las vías de calcio como posibles inductoras de muerte celular de los neutrófilos tratados con Cocaína combinada con Levamisol

Hipótesis

La Cocaína y el Levamisol inducen muerte celular en los neutrófilos por NETosis, posiblemente mediada por vías de calcio y receptores muscarínicos.

Pregunta de investigación

En las VAA la NETosis ha demostrado participación en la patogénesis, la similitud clínica de estas vasculitis con el VICOL nos lleva a preguntarnos si la Cocaína y el Levamisol inducen NETosis y cuáles serán las vías por las cuales estos compuestos provocan este tipo de muerte que pudiera tener un papel en la fisiopatología de esta entidad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos

El medio de cultivo RPMI-1640, suero bovino fetal (SBF), tampón fosfato salino de Dulbecco (PBS), Dextran 500 se adquirieron de Gibco®-Life Technologies (Grand Island, NY). Histopaque-1077, azul de tripano, Levamisol hydrochloride (C₁₁H₁₂N₂S-HCl) y Hyoscine Butilbromide (ref: H1450000), Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Dihidrorodamina 123 (DRH123) se obtuvieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO). El estuche comercial para la evaluación de citoquinas en sobrenadantes “Cytometric Bead Array” (CBA), Human Inflammatory Cytokine kit” y anti-CD45-PeCy7 (clona: 30-F11) se compraron a BD Biosciences (San Diego, CA). Yoduro de 3,3'- dihexiloxacarbocianina (DIOC6) e Ioduro de propidio (PI) se adquirieron de Invitrogen (Carlsbad, CA). Sytox green y Hoechst 33342 se adquirieron de Thermofisher. Anticuerpo anti-MPO-PE (clona: 2C7) y anti-NE- alexa fluor 647 (clona: 950317) se obtuvieron de Novusbi. COC-156-HC-1 Cocaína (HCl x 1.0 mg/base 1ml), fue comprada en Lipomed AG (Arlesheim, SUI) e importada mediante químicos® cumpliendo con todos los permisos del fondo nacional de estupefacientes.

3.2 Pacientes y controles incluidos en el estudio

Se incluyeron 25 pacientes con diagnóstico confirmado de VICOL, evaluados por el Grupo de Reumatología de la Universidad de Antioquia (GRUA) en los servicios del Hospital Universitario San Vicente Fundación de Medellín y 10 individuos sanos pareados por sexo y similares en edad con el grupo de pacientes.

Todos los individuos incluidos en el estudio fueron mayores de edad y aceptaron participar voluntariamente en el estudio mediante la firma de un consentimiento informado. Los criterios de exclusión fueron tener infección activa en el momento de la toma de la muestra, diagnóstico de neoplasia maligna y, no tener acceso a la información clínica o paraclínica para llevar a cabo los análisis propuestos

3.3 Separación de sueros

De cada paciente e individuo sano (control), se obtuvo una muestra de 6 mL de sangre venosa periférica, la cual fue centrifugada a 950 g x 10 minutos a temperatura ambiente, obteniendo posteriormente el suero, el cual se dividió en alícuotas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.4 Preparación de mezcla de sueros

Se clasificaron los 25 pacientes según las características clínicas y se dividieron en dos grupos, pacientes con compromiso renal y sin este compromiso, se prepararon 2 mezclas de sueros de cada uno de estos grupos de pacientes.

3.5 Aislamiento de neutrófilos a partir de sangre periférica

Se obtuvieron 8 ml de sangre periférica de donantes sanos en tubos con anticoagulante, solución de citrato trisódico, ácido cítrico y dextrosa (ACD). En un tubo de 15 mL se dispuso la sangre llevando con PBS (1x) a un volumen final de 10 mL. En otro tubo de 15 mL se adicionaron 3 mL de Hystopaque-1077 y suavemente por las paredes se adicionaron los 10 mL de sangre-PBS. Se centrifugaron a 900g por 30 minutos, luego se descartó el Hystopaque-1077, los mononucleares y el plasma, y se obtuvieron del fondo la fase de los eritrocitos y neutrófilos. Posteriormente, se adicionó PBS hasta completar 7 mL al igual que 7 mL de Dextrano 3% (1x) dejando incubar a temperatura ambiente por 20 minutos. Pasado el tiempo de incubación se tomó con cuidado la población de neutrófilos y se dispusieron en otro tubo de 15 mL, donde se adicionó PBS hasta completar 14 mL, se centrifugó a 650g por 7 minutos, posterior a esto se descartó el sobrenadante, se adicionó 5 mL de buffer PBS hipotónico, se dejó 30 segundos en reposo y se adicionó 5 mL de buffer PBS reequilibrio, se centrifugó a 650g por 7 minutos y se repitió este paso nuevamente. Una vez descartado el sobrenadante se suspendieron las células en 600 µL de medio RPMI sin SBF, se realizó el recuento en cámara de Neubauer y se dispusieron 100.000 células en 200 µL de medio RPMI,

para posterior análisis por citometría de flujo. La viabilidad fue evaluada por citometría de flujo utilizando DIOC-6 y PI, y para la pureza se utilizó CD45 y CD33, obteniéndose porcentajes de viabilidad $\geq 95\%$ y una pureza del 93%, resultado representativo (**Figura 1A, B y C**).

3.6 Ensayos de inducción de muerte celular de Neutrófilos

Para evaluar la inducción de muerte celular de los neutrófilos, luego de hacer una búsqueda en la literatura sobre las concentraciones y tiempos, se realizaron ensayos de dosis respuesta y cinética (2, 4 y 6 horas) con cada uno de los compuesto, Cocaína (20 μ M, 40 μ M), Levamisol (20nM, 40nM), mezcla de Cocaína-Levamisol 20/20 y 40/40 μ M y suero de pacientes con VICOL (5%, 10%, 20% y 40%) (datos no mostrados). Para el desarrollo de los ensayos, 1×10^5 células en un volumen final de 200 μ L de medio se mantuvieron en tubos de 12 x 75 mm, y se estimularon con Cocaína, Levamisol, mezcla de Cocaína- Levamisol, mezcla de sueros de pacientes con VICOL, mezcla de suero de controles sanos y PMA 20 nM (control positivo). Se incubaron por 6 horas a 37°C; luego, se evaluó la inducción de muerte celular utilizando Sytox green, Hoechst 33342, anti-MPO-PE y anti-EN-Alexa flúor por citometría de flujo. Teniendo como base el artículo escrito por Zharkova y colaboradores (94), en el cual definen NETosis a aquella región en la cual los eventos son doble positivos para Hoechst 33342 y Sytox green, dos tinciones dirigidas a los ácidos nucleicos, con la diferencia de que el primero atraviesa membrana citoplasmática y el segundo no y sólo se unirá a ácidos nucleicos cuando hay algún daño y el material genético este expuesto. La

Figura 2A representa la estrategia de análisis utilizada.

3.7 Ensayos de inhibición de muerte celular de Neutrófilos

Para evaluar la capacidad del BBH de inhibir la muerte celular, se usaron dos concentraciones (20nM y 40nM), y al igual que en la inducción diferentes tiempos de incubación (2, 4, 6 horas) para lograr estandarizar la prueba (datos no mostrados). Dispusimos 1×10^5 neutrófilos en tubos de 12 x 75 mm, primero se adicionaron 20 μ L del inhibidor (20nM), luego de 10 minutos se adicionaron los diferentes tratamientos (Cocaína, Levamisol, mezcla de Cocaína-Levamisol, mezcla combinada de sueros de pacientes, controles y PMA), se dejaron incubar por 6 horas a 37°C, y utilizando Sytox green, Hoechst 33342, Anti-MPO-PE y, Anti-EN-Alexa flúor, se analizó la inducción e inhibición de muerte celular por citometría de flujo.

3.8 Medición de citoquinas por Cytometric Bead Array (CBA)

Para tratar de establecer si la muerte celular en este modelo está mediada por citoquinas se evaluó en cada uno de los sobrenadantes recolectados a partir de los experimentos anteriores, los niveles de las citoquinas proinflamatorias: TNF- α , IL-1 β , IL-12p70, IL-8, IL-6 e IL-10 mediante el kit “Cytometric Bead Array” (CBA) siguiendo las instrucciones del fabricante, como se describe brevemente a continuación. Primero se mezclaron las esferas de cada una de las citoquinas y se dejaron en reposo 30 minutos, posteriormente se adicionaron en los tubos de 12 x 75 mm previamente marcados con cada uno de los sobrenadantes de las muestras a evaluar al igual que las esferas mezcladas, luego se adicionó el anticuerpo de detección marcado con PE, y se dejó en incubación por 3 horas, posterior a esto se realizó un lavado utilizando buffer de lavado y centrifugando a 200 g x 5 minutos, el botón resultante se re-suspendió en buffer para su posterior análisis por citometría de flujo. El límite de detección para cada citoquina es: IL-8 3,6pg/ml, IL-1 β 7,2 pg/ml, IL-6 2,5 pg/ml, IL-10 3,3pg/ml, TNF 3,7pg/ml, IL-12p-70 1,9pg/ml.

3.9 Confirmación de la inducción de NETosis por microscopía de fluorescencia

Para confirmar la inducción de muerte por los diferentes tratamientos, se sembraron 1×10^5 neutrófilos en platos de 24 pozos (Falcon ref 353047) y se dejaron adherir durante 30 minutos, luego se realizaron los diferentes tratamientos con Cocaína 40 μ M, Levamisol 20 nM, mezcla de Cocaína-Levamisol, mezcla de sueros de pacientes con VICOL al 20%, mezcla de suero de controles sanos 20% y PMA 20 nM, se incubaron por 6 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se adicionó Sytox Green, Hoechst 33342 y anti-MPO para observar la presencia de NET por microscopía de fluorescencia. El análisis de las fotografías fue realizado utilizando ImagenJ software.

3.10 Producción de especies reactivas de oxígeno

Para evaluar si el mecanismo de muerte celular de los neutrófilos inducida por Cocaína y Levamisol era mediado por la presencia de especies reactivas de oxígeno, una vez aislados los neutrófilos, se mantuvieron 1×10^5 células en un volumen final de 500 μ L de medio en tubos de 12 x 75 mm. Se precalentaron las células por 5 minutos a 37°C, se adicionó Dihidrorodamina 123 (1:1000), dejando en incubación 10 min 37°C. Posterior a este tiempo, se adicionaron los diferentes estímulos: Cocaína, Levamisol, mezcla de Cocaína-Levamisol y PMA, evaluando tiempos de incubación de 20 minutos y 60 minutos post- tratamiento. Pasado el tiempo los tubos con las células se dispusieron en hielo durante 10 minutos para frenar la reacción, luego se realizaron dos lavados utilizando PBS 1X y centrifugando a 450g x 5 minutos a 4°C. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en PBS, se mantuvieron en hielo hasta su posterior lectura en el citómetro de flujo.

3.11 Vías de calcio

Para evaluar si el mecanismo de muerte celular de los neutrófilos inducida por Cocaína y Levamisol se debía al aumento de calcio intracelular, se utilizó una estrategia de inhibición, 1×10^5 neutrófilos en tubos de 12 x 75 mm se incubaron con diferentes concentraciones de BAPTA (un quelante de calcio) 2 μ M, 20 μ M y 50 μ M, luego de 10 minutos se adicionó el tratamiento de la mezcla de Cocaína-Levamisol dejando incubar las células durante 3 horas, después de este tiempo se tiñeron las células con Sytox green y Hoechst 33342 para la posterior lectura en el citómetro de flujo.

3.12 Análisis estadísticos

Las características demográficas y clínicas de los pacientes y controles son presentadas con medidas de tendencia central como mediana y porcentaje. Los análisis estadísticos de los datos de inducción de muerte se realizaron con el software GraphPad Prism 8.0.1. Se evaluaron 4 experimentos individuales por cada ensayo (N=4). Se compararon las medianas usando la prueba de Kruskal-Wallis con corrección de Dunn para comparaciones múltiples y se graficaron la mediana con rango intercuartílico. Se consideran diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 Características demográficas y clínicas de los pacientes donantes de sueros incluidos en el estudio

De las muestras colectadas en el estudio de Muñoz-Vahos y colaboradores (24), quienes evaluaron 40 pacientes, en el presente estudio se incluyó información de una submuestra de 25 individuos con diagnóstico de VICOL.

Las características clínicas, serológicas e histopatológicas de los pacientes VICOL incluidos en el estudio se resumen en las **tablas 1-3**. La mediana de edad fue de 34 años (rango 25-51) predominaron los hombres (21/25, 84%), la mayor parte de los pacientes declararon haber consumido otra sustancia diferente a Cocaína, como marihuana (19/25), cigarrillo (19/25) y alcohol (16/25); las manifestaciones clínicas más importantes fueron necrosis de pabellones auriculares (20/25, 80%), artralgias/artritis (16/25, 64%), úlceras cutáneas (9/25, 36%), anemia hemolítica autoinmune (7/25, 28%) y nefritis confirmada por biopsia (15/25, 60%), observándose de manera predominante la glomerulonefritis proliferativa mediada por inmunocomplejos; en la biopsia de piel se logró evidenciar 4 (16%) pacientes con pseudovasculitis, 3 (12%) con pioderma gangrenoso, 2 (8%) con vasculitis leucocitoclástica, 2 (8%), con vasculopatía trombotica y 2 (8%) con ambos tipos de compromiso vascular. A partir de los datos del laboratorio se reportaron un total de 4 (16%) casos de pacientes con neutropenia (recuento absoluto de neutrófilos, ANC <1500), 13 pacientes (52%) con hipocomplementemia C3 y 3 (12%) con hipocomplementemia C4; otros hallazgos importantes fueron la presencia de p-ANCA (9/25, 36%), anti-MPO (92%), anti-PR3(28%) y ANA (56%).

4.2 Inducción de muerte celular de los neutrófilos por Cocaína y Levamisol

Con el fin de evaluar si la Cocaína y el Levamisol inducían muerte celular se trataron 1×10^5 neutrófilos enriquecidos con Cocaína 40 μ M y 20 nM de Levamisol, mediante tinción con Sytox y Hoechst y posterior análisis por citometría de flujo teniendo el PMA como control positivo, se evaluó la presencia de ADN extracelular. Se encontró

que hubo una mayor proporción de neutrófilos Sytox green+ Hoeschst-33342+ en respuesta al tratamiento con Levamisol con una mediana del porcentaje de células doble positivas del 20.28% [8.02-44.7], con respecto al tratamiento con Cocaína con el que, se observaron células doble positivas en un 2.52% [0.443-3.35]. Para establecer si la mezcla de ambos tratamientos podría tener un efecto aditivo o sinérgico sobre la muerte celular en los neutrófilos; se realizaron 4 experimentos donde se trataron los neutrófilos con un mezcla de Cocaína-Levamisol y se incubaron durante 6 horas, posterior a esto se analizó por citometría de flujo el porcentaje de muerte celular utilizando Sytox green y Hoechst; observando que una vez se combinan los compuestos la inducción de muerte celular aumenta con respecto a los tratamientos individuales a 67.43% [31.3-88.8], con lo que se podría decir que el Levamisol y la Cocaína tuvieron un efecto sinérgico en la inducción de muerte celular de los neutrófilos. **(Figura 2B y C)**

4.3 Liberación de MPO y no de EN en las NET de neutrófilos tratados con Cocaína, Levamisol y Cocaína- Levamisol

Con el fin de confirmar si la muerte celular que estaban sufriendo los neutrófilos durante la estimulación con Cocaína y Levamisol era NETosis, se decidió utilizar anticuerpos dirigidos contra antígenos presentes en las NET como son las proteínas de los gránulos MPO y EN. Para esto los neutrófilos fueron tratados con Cocaína, Levamisol y mezcla de ambos componentes e incubados por 6 horas. En las células Sytox green+ y Hoechst-33342 + se evaluó la presencia de MPO y EN encontrando que la mediana del porcentaje de células MPO+ con cada tratamiento fue: Cocaína 2,7% [1,69-7,0], Levamisol 13,7% [8,22-31,7] y la mezcla 32,6% [23,3-65,9]. No se observó presencia de la EN las células con externalización del ADN. Con estos resultados se logró evidenciar concordancia entre los datos de la muerte celular obtenidos en las células doble positivas para Sytox green y Hoechst-33342 y las células anti MPO positivas, sugiriendo que dicha muerte muy probablemente es NETosis. **(Figura 3 A y B)**. Por medio de microscopía de fluorescencia se confirmó la liberación de NET a partir de los diferentes tratamientos, previamente

mencionados, lo que soporta la inducción de muerte celular vía NETosis. (**Figura 2D**)

4.4 Inducción de muerte celular de los neutrófilos utilizando mezcla de sueros

Se evaluó si los sueros de pacientes con VICOL tienen la capacidad de inducir el mismo fenómeno de muerte en los neutrófilos. Los sueros de los pacientes se agruparon en dos categorías definidas como aquellos con nefritis y los que no la tuvieron, ya que la mayoría de las biopsias renales evidenciaron inmunocomplejos se deduce que los pacientes con nefritis tienen más probabilidad de tener estos elementos circulantes con respecto a pacientes sin esta manifestación y sugiriendo que los inmunocomplejos pudieran ser inductores de muerte celular. Todos los sueros de pacientes clasificados en estas dos categorías fueron combinados y la mezcla se utilizó en un porcentaje del 20%. Esta proporción se definió en ensayos de dosis respuesta previos (datos no mostrados) y como control negativo se utilizó mezcla de sueros de individuos sanos a la misma concentración. Las muestras se incubaron bajo las condiciones del ensayo y se evaluó el DNA extracelular con Sytox green y Hoechst. Los sueros de los dos grupos de pacientes con VICOL indujeron muerte celular en proporciones similares. En las células tratadas con sueros de pacientes con compromiso renal se observó una mediana del porcentaje de células positivas del 10,6% [2,39-14,3] y en los sueros provenientes de individuos sin nefritis la mediana del porcentaje de células positivas fue del 11,4% [5,97-15,]. Con los sueros de individuos sanos la mediana fue 5,1% [3,35-8,75]. Sin embargo, estos valores, aunque se evidencian la inducción de muerte, no alcanzaron los porcentajes observados con la mezcla de Cocaína y Levamisol. (**Figura 4**)

4.5 Citoquinas como inductores de muerte celular de neutrófilos tratados con sobrenadantes de Cocaína, Levamisol, Cocaína- Levamisol y mezcla de suero de pacientes VICOL.

Con el fin de determinar si las citoquinas acumuladas durante los tratamientos con Cocaína y Levamisol se pudieran asociar con los eventos de muerte observados en

los neutrófilos, se evaluó TNF- α , IL-1 β , IL-12p70, IL-8, IL-6 e IL-10 en los sobrenadantes de cada uno de los ensayos (n:8) encontrando únicamente un aumento en la acumulación de IL-8 cuando se trataron los neutrófilos con Cocaína y con el control positivo (PMA), pero no con Levamisol, con la mezcla de ambos compuestos se observó menor acumulación de estas citoquinas; además ninguna de las otras citoquinas fue detectada.

Con las muestras de suero llamó la atención un incremento de la IL-8 por encima de sus niveles basales, observando con la mezcla de los sueros control una concentración de 427 pg/mL, mezcla de suero de pacientes con compromiso renal de 508 pg/mL y en la mezcla de suero sin compromiso renal de 399 pg/mL. Entre las tres fuentes de suero no se observó ninguna diferencia. Lo anterior, sugiriendo que en los sueros de los pacientes podría haber presencia de diferentes elementos solubles induciendo la producción de esta interleucina **(Figura 5)**.

4.6 ROS como posible mecanismo inductor de NETosis en neutrófilos tratados con Cocaína, Levamisol y Cocaína- Levamisol.

La NETosis puede generarse por diferentes vías. Comúnmente se consideran la liberación de ROS y el aumento de calcio intracelular como los posibles inductores de la formación de NET. Se evaluó si los tratamientos per se inducían la liberación de ROS. Luego de tratar los neutrófilos con Cocaína, Levamisol y la mezcla de Cocaína con Levamisol, las células fueron cargadas con DHR 123, y se evaluó la conversión a Rodamina por medio del anión superóxido. La Cocaína indujo, después de una hora de tratamiento, una leve producción de ROS incrementando la intensidad de fluorescencia media (IMF) 1,3 veces comparado con el control positivo (PMA) en el mismo tiempo con un incremento de 5,2 veces; sin embargo, cuando se trataron con Levamisol se observó que la señal de la DHR123 fue menor al control negativo, y antagonizó la producción de ROS inducida por Cocaína lo que sugiere que este no es posiblemente el mecanismo inductor de muerte celular **(Figura 6)**,.

4.7 Calcio como posible mecanismo inductor de NETosis en neutrófilos tratados con Cocaína, Levamisol y Cocaína- Levamisol

El aumento de calcio intracelular es uno de los mecanismos por los cuales se puede dar la NETosis, ya que lleva a la activación de la PAD-4, enzima importante en el proceso de descondensación de la cromatina y posterior liberación de NET. Se utilizó BAPTA, para evaluar de forma indirecta la vía del calcio en la muerte celular. En células tratadas con Cocaína combinada con Levamisol se evidenció como resultado preliminar la inducción de muerte celular con un porcentaje de células Hoechst⁺ Sytox green⁺ de 40%; No obstante, cuando se adiciona el BAPTA, este porcentaje disminuyó a 21% y aumentó la región Hoechst⁺ Sytox green⁻ (**Figura 7**). Estos resultados podrían sugerir que la vía de activación de calcio intracelular es el mecanismo por el cual la Cocaína y el Levamisol podrían estar induciendo la NETosis, sin embargo, son necesarios otros ensayos e implementar nuevas metodologías para poder confirmar esta hipótesis.

4.8 Modulación de la NETosis utilizando Butilbromuro de Hioscina (BBH) en neutrófilos tratados con Cocaína, Levamisol y Cocaína- Levamisol.

El BBH es un fármaco anticolinérgico derivado del amonio cuaternario, se ha encontrado posible efecto antagonista de los receptores muscarínicos presentes en diferentes células, entre ellas los neutrófilos (95). Se evaluó si este fármaco modulaba la inducción de muerte celular, para esto los neutrófilos fueron pretratados con BBH (20 nM y 40 nM) y tratadas con Cocaína, Levamisol y la mezcla de Cocaína-Levamisol. En presencia de BBH se observó una reducción de 18.9% en el porcentaje de células con liberación del ADN extracelular inducida por la combinación de Cocaína-Levamisol. Esta reducción, aunque no cuantificada se observa en la microscopía de fluorescencia. (**Figura 8 A, B y C**)

4.9 Modulación de la NETosis con BBH en Neutrófilos tratados con la mezcla de sueros.

Al observar que el BBH tiene un efecto sobre la muerte inducida por la mezcla de Cocaína-Levamisol, se evaluó si este mismo lo tendría sobre la muerte inducida por la mezcla de sueros de los pacientes. Para esto se incubaron los neutrófilos con el BBH y posteriormente se adicionaron las mezclas de sueros de pacientes con compromiso renal, sin compromiso renal y las de individuos sanos. No hubo inhibición del efecto de los tres grupos de sueros. Los porcentajes de células con daño en ausencia del inhibidor y en su presencia con cada uno de los tipos suero fueron: control $5,6\% \pm 0,56\%$ a $3,8\% \pm 0,42\%$; con compromiso renal $9,5\% \pm 1,12\%$ a $9,3\% \pm 0,89\%$ y sin compromiso renal $11,02\% \pm 0,85\%$ a $8,6\% \pm 0,93\%$. **(Figura 9)**

5. FIGURAS Y TABLAS

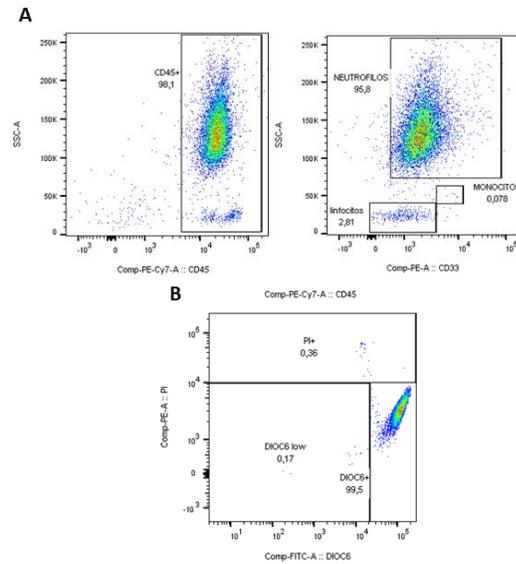


Figura 1. Evaluación de pureza y viabilidad. A) Izquierda, Determinación de la Población celular CD45+ vs granularidad-área (SSC-A), Derecha, Pureza del 95,8% (CD33+, CD45+). B) Células vivas (DIOC₆(3)^{bright} IP⁻), Células con daño mitocondrial (DIOC₆(3)^{dim} IP⁻) y células con daño en membrana (IP⁺). Los gráficos de puntos son representativos de cuatro experimentos independientes.

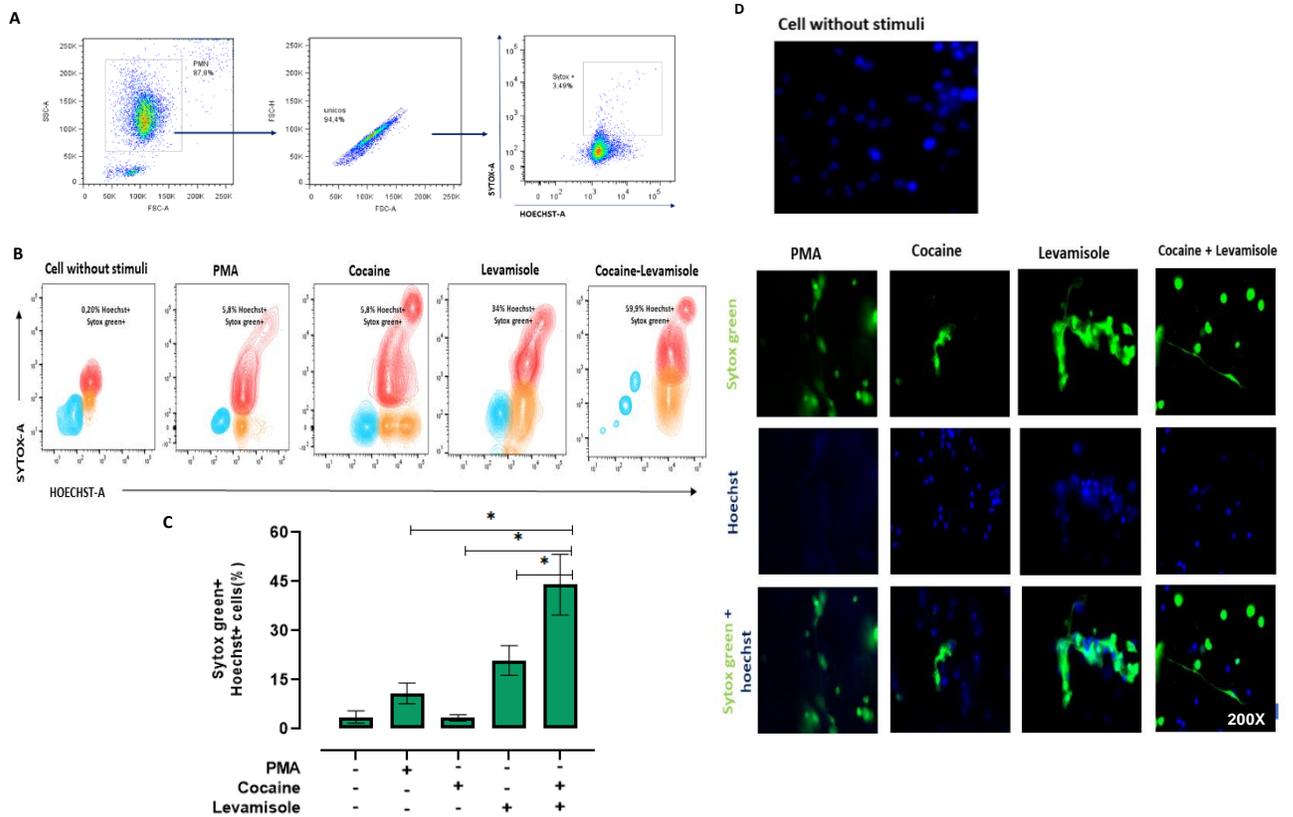


Figura 2. Inducción de muerte celular. Gráficas de un experimento representativo (n:4) en las cuales los neutrófilos fueron estimulados con PMA, Cocaína, Levamisol, Cocaína-Levamisol. A) Estrategia utilizada para el análisis en citometría de flujo. B) Cuantificación por citometría de flujo utilizando Sytox green y Hoechst-33342 La región representada en rojo son las células doble positivas (Sytox green⁺ Hoechst⁺), la región en naranja son células Hoechst⁺ y la región azul son células Hoechst^{low} C) Porcentaje de células doble positivas para Sytox green y Hoechst-33342. D) Confirmación por microscopía de fluorescencia (n:3), magnificación 200x. Los resultados son mostrados como la mediana y RIQ, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, * $p \leq 0,05$.

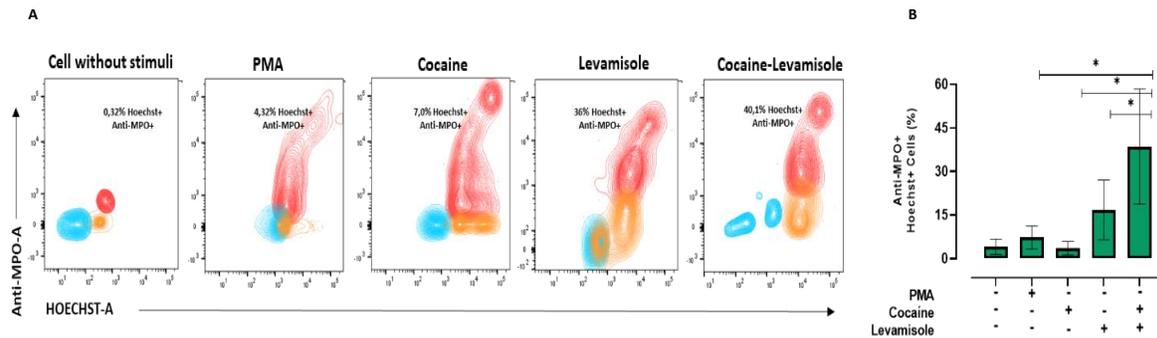


Figura 3. Confirmación de Inducción de muerte celular mediante anticuerpos dirigidos contra antígenos en las NET. Gráficas de un experimento representativo (n:4) en los cuales los neutrófilos fueron estimulados con PMA, Cocaína, Levamisol, Cocaína-Levamisol. A) Estrategia utilizada para el análisis en citometría de flujo. Cuantificación por citometría de flujo utilizando Anti-MPO y Hoechst-33342. B) Porcentaje de células doble positivas para anti-MPO y Hoechst- 33342. Los resultados son mostrados como la mediana y RIQ, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, * $p \leq 0,05$.

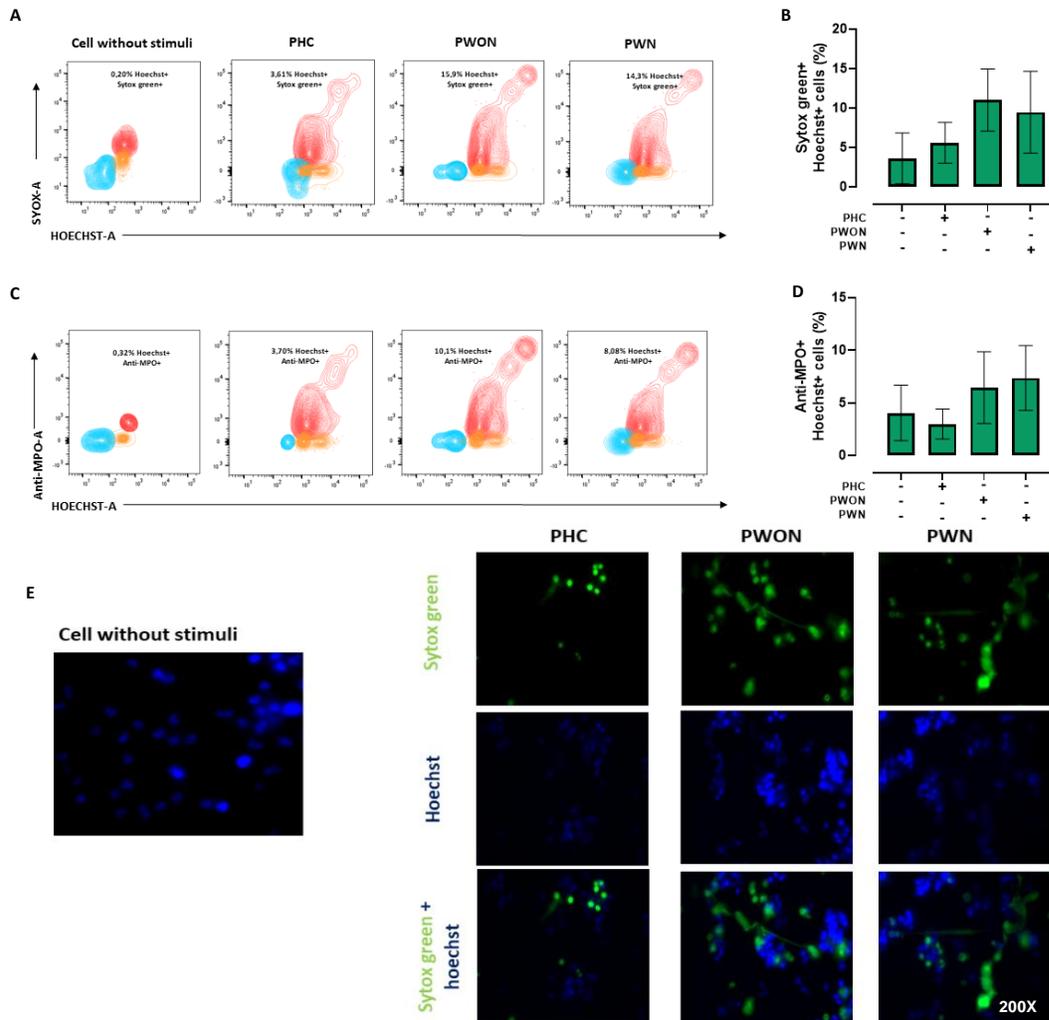


Figura 4: Inducción de muerte celular. Gráficas de un experimento representativo (n:4) en los cuales los neutrófilos fueron estimulados con mezcla de suero de pacientes con compromiso renal (PWN), mezcla de suero de pacientes sin compromiso renal (PWON) y mezcla de suero de individuos control (PHC) A) Cuantificación por citometría de flujo utilizando Sytox green y Hoechst-33342, B) Porcentaje de células doble positivas para Sytox green y Hoechst-33342. C) Análisis por citometría de flujo para confirmar NETosis utilizando Anti-MPO y Hoechst-33342, D) Porcentaje de células doble positivas para Anti-MPO y Hoechst-33342. E) Confirmación por microscopía de fluorescencia. Los resultados son mostrados como la mediana y RIQ.

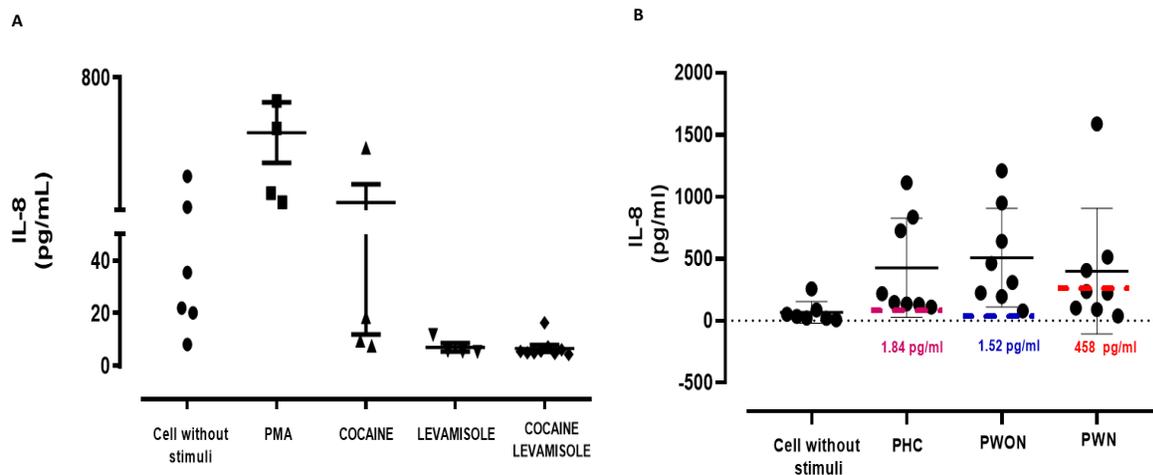


Figura 5: Citoquinas evaluadas por CBA. En sobrenadantes de cultivos de neutrófilos estimulados se evaluó la acumulación de IL-8 A) PMA, Cocaína, Levamisol, Cocaína + Levamisol, B) Mezcla de suero de pacientes con compromiso renal, mezcla de suero de pacientes sin compromiso renal y suero de individuos sanos (n:8). Los resultados son expresados en picogramo por mililitro (pg/ml). Línea roja valor basal de suero de paciente con compromiso renal 458 pg/ml, línea azul valor basal suero de pacientes sin compromiso renal 1.52 pg/ml y línea violeta valor basal del suero de individuos control 1,84 pg/ml.

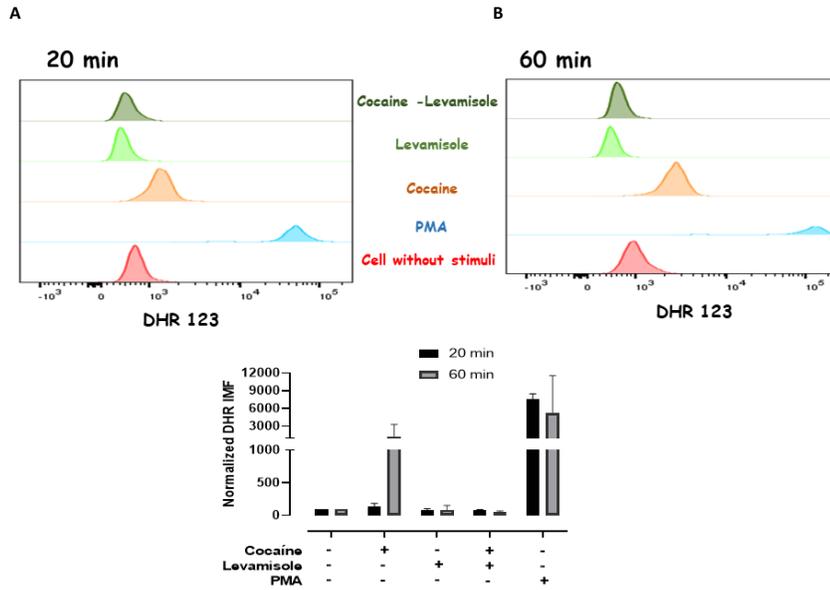


Figura 6: Liberación de especies reactivas de oxígeno. Gráfica de un experimento representativo (n:3) en el cual se evaluó en dos tiempos la liberación de ROS A) Tiempo de evaluación 20 minutos. B) Tiempo de evaluación 60 minutos, en neutrófilos tratados con Cocaína, Levamisol, Cocaína-Levamisol y PMA. C) Porcentaje de DHR positivo.

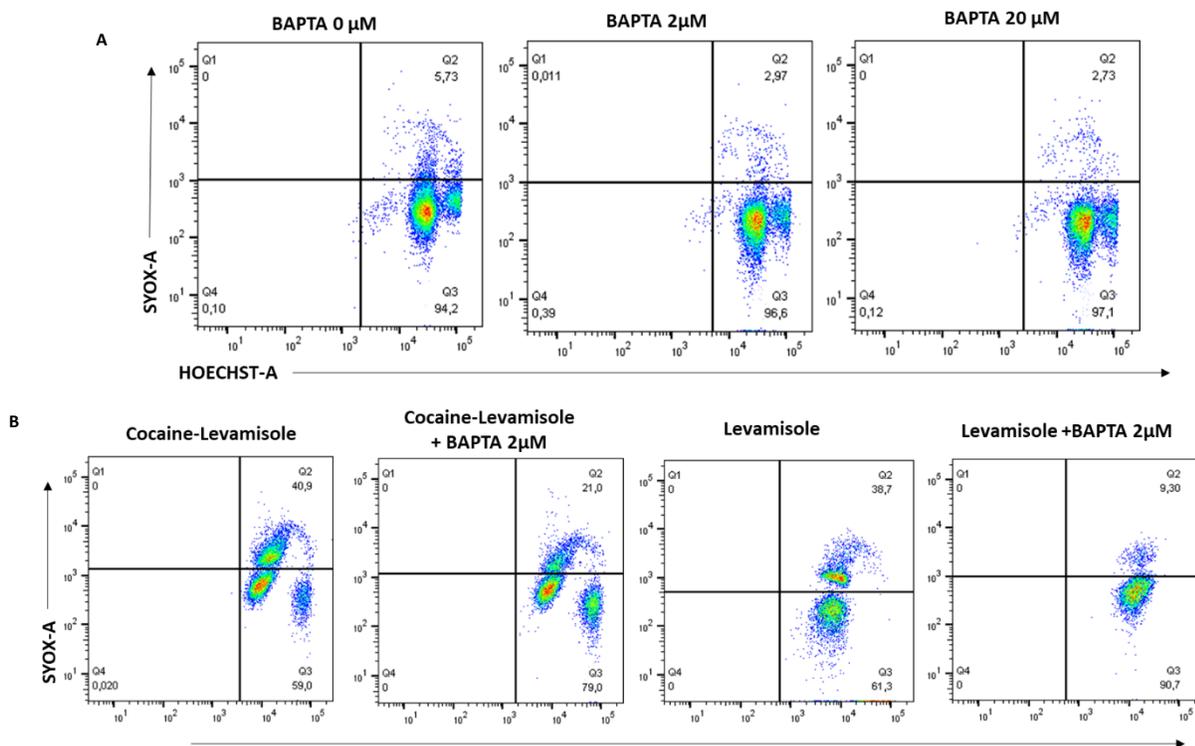


Figura 7: Calcio intracelular como mecanismo de NETosis. Gráfica de un experimento representativo (n:2) en el cual se evaluó el efecto del calcio en la muerte celular de los neutrófilos tratados con levamisol y Cocaína+ Levamisol, luego de 3 horas de incubación en presencia o ausencia de BAPTA, un quelante de calcio. A) Concentraciones de BAPTA evaluadas 0 μM , 2 μM y 20 μM B) Gráfica de neutrófilos tratados con Levamisol, Levamisol-BAPTA 2 μM , Cocaína-Levamisol y Cocaína-Levamisol en presencia de BAPTA 2 μM .

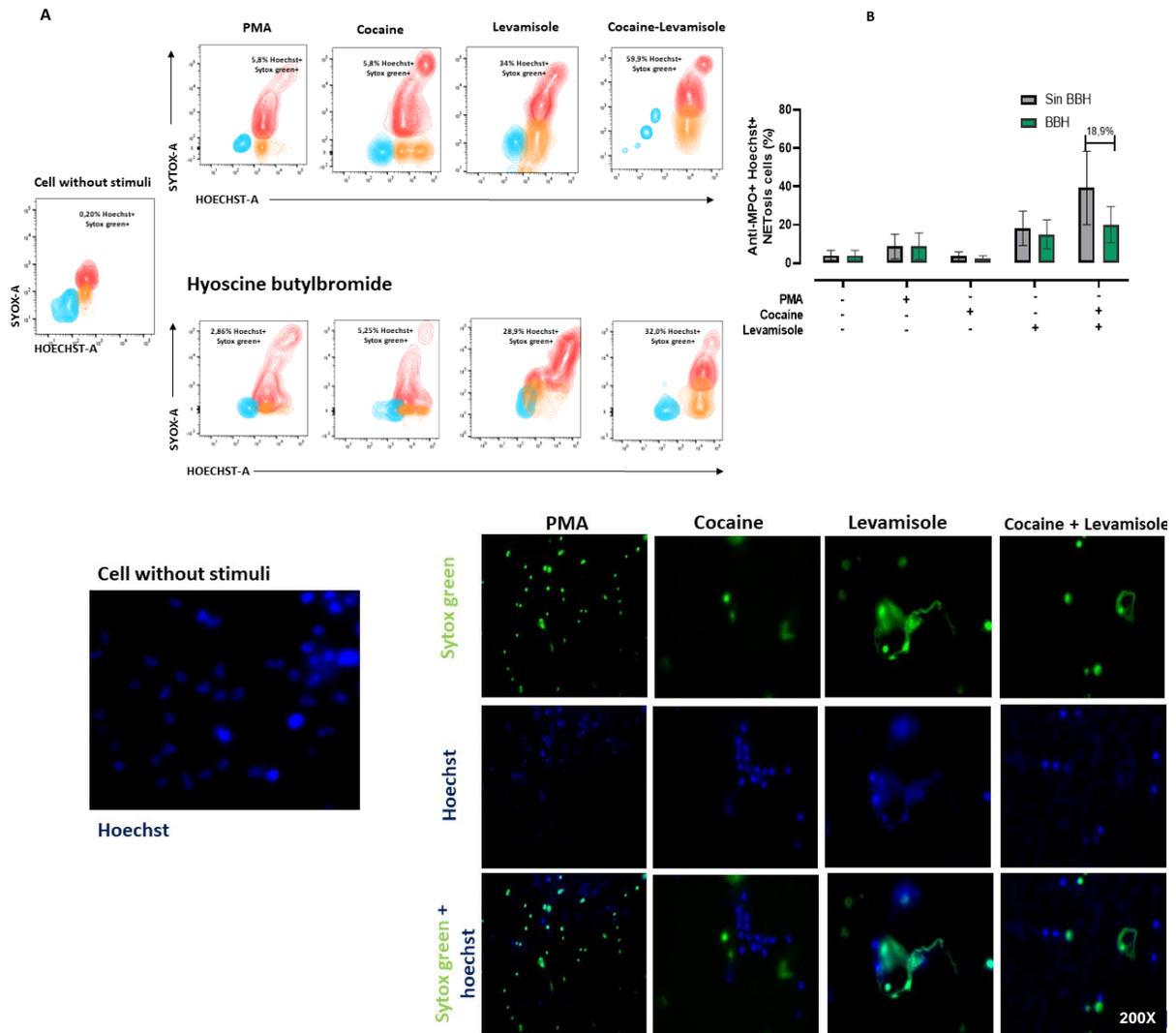


Figura 8: Modulación de NETosis. Experimento representativo (N:4), en el que se observa el efecto del BBH 20 nM en la inhibición de muerte celular luego de la estimulación de los neutrófilos con PMA, Cocaína, Levamisol, Cocaína-Levamisol. A) Cuantificación por citometría de flujo utilizando Sytox green y Hoechst 33342 B) Porcentaje de células doble positivas para Sytox Green y Hoechst C) Confirmación por microscopía de fluorescencia. Los resultados son mostrados como la mediana y RIQ.

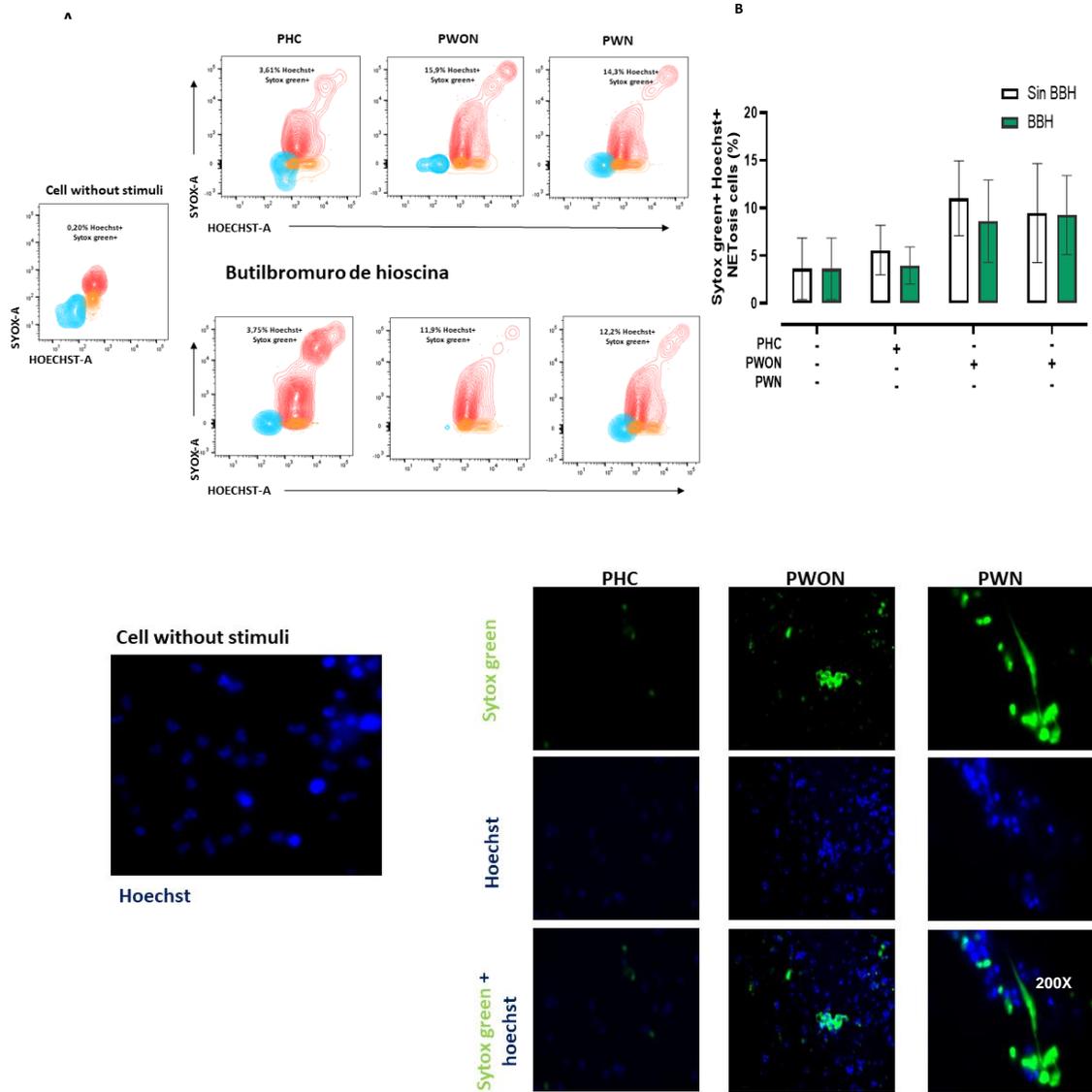


Figura 9: Modulación de NETosis. Experimento representativo (N:4), en el que se observa el efecto del BBH 20nM en la inhibición de muerte celular luego de la estimulación de los neutrófilos con PWN, PWON y PHC. A) Cuantificación por citometría de flujo utilizando Sytox green y Hoechst 33342 B) Porcentaje de células doble positivas para Sytox Green y Hoechst C) Confirmación por microscopía de fluorescencia. Los resultados son mostrados como la mediana y RIQ.

Tabla 1. Características sociodemográficas de pacientes donantes de suero incluidos en el estudio.

Variables		Pacientes n:25 (%)
Edad en años (Rango)		34 (25-31)
Sexo	Femenino	4 (16)
	Masculino	21 (84)
Consumo de sustancias	Alcohol	16 (64)
	Marihuana	19 (71)
	Cigarrillo	19 (71)

Tabla 2: Manifestaciones clínicas de pacientes donantes de suero incluidos en el estudio.

Variables		Pacientes n:25 (%)
Necrosis de pabellones auriculares		20 (80)
Artralgias/artritis		16 (64)
Úlceras cutáneas		9 (36)
Anemia hemolítica autoinmune		7 (28)
Nefritis	Inmunocomplejos	9 (36)
	Otras nefritis	6 (24)
Pseudovasculitis		4 (16)
Pioderma gangrenoso)		3 (12)
Vasculitis	Leucocitoclástica	2 (8)
Vasculopatías	Trombótica	2 (8)

Tabla 3: Datos paraclínicos de pacientes donantes de suero incluidos en el estudio.

Variables		Pacientes n:25 (%)
Neutropenia		4 (16)
Hipocomplementemia	C3	13 (52)
	C4	3 (12)
Autoanticuerpos	ANA	14 (56)
	p-ANCA	9 (36)
	ANCA 24 (92%)	Anti-MPO 16 (64)
		Anti-PR3 7 (28)

6. DISCUSIÓN

La microscopía de fluorescencia ha sido por mucho tiempo la técnica más utilizada para cuantificar la NETosis, sin embargo es un proceso subjetivo y requiere mucho tiempo para su realización; desde hace pocos años ha surgido el interés por cuantificar mediante citometría de flujo la NETosis, por ser un proceso simple, reproducible, con menor probabilidad de pérdidas de datos, mayor rendimiento, detección y agilidad en el proceso, ya que las células no requieren de lavados previos, ni ser fijadas, además de poca manipulación, algo importante para los neutrófilos ya que son células de fácil activación.

En el 2015 Gavillet y colaboradores, identificaron en neutrófilos la liberación de NET por la detección de MPO e histonas citrulinadas mediante citometría de flujo, otro estudio realizado en el mismo año por Zaho y colaboradores, evaluó el cambio en el área nuclear y la intensidad de fluorescencia causada por NETosis a partir de imágenes espectrales tomadas por citometría de flujo (96); en el 2017 Masuda y colaboradores comenzaron a implementar la tinción de ácidos nucleicos mediante la utilización de Sytox green y observaron que los neutrófilos luego de ser tratados con PMA eran Sytox green⁺, indicando liberación de NET. En el 2019, Zharkova y colaboradores utilizaron dos sondas dirigidas a la tinción de ácidos nucleicos: Sytox Orange y DAPI, el primero solo tiñe células muertas o con daño en membrana y el segundo es semipermeable, demostraron como mediante citometría de flujo se puede cuantificar la liberación de NET ya sea en sangre total, utilizando anticuerpos específicos de la población, o a partir de neutrófilos purificados; así mismo, utilizaron anticuerpos dirigidos contra las proteínas de los gránulos como la MPO, y establecieron la correlación de la región doble positiva (SO y DAPI) con la región anti-MPO para confirmar lo definido como NETosis, además de la validación por microscopía de fluorescencia, donde se logra presenciar la morfología de las NET, los ensayos realizados fueron en neutrófilos tratados con PMA (94). En nuestro estudio realizando algunas modificaciones al protocolo de Zharkova y colaboradores, utilizamos como sondas Sytox green y Hoechst. Sytox green no

atraviesa la membrana de células vivas, mientras que Hoechst es semipermeable a la membrana; la región doble positiva para estas tinciones nos indicó la salida del material nuclear de la célula; así mismo, el uso del anticuerpo anti MPO y la visualización por microscopía de fluorescencia fueron necesarios para confirmar la presencia de proteínas de los gránulos mezclada con contenido nuclear, lo que nos permite afirmar que el tipo de muerte observada corresponde a NETosis.

Estudios previos como los de Carmona y colaboradores muestran que el Levamisol es capaz de inducir muerte celular en los neutrófilos, al igual que el estudio de Lood y Hunges los cuales muestran que la Cocaína y el Levamisol en forma individual son capaces de inducir en los neutrófilos la liberación de NET ricas EN (58). En nuestros resultados al igual que en estos estudios, logramos observar la inducción de la liberación de NET por neutrófilos de individuos sanos tratados tanto con Cocaína y Levamisol en forma individual, sin embargo, aunque se ha reportado en la literatura la presencia de EN en las NET inducidas por estas sustancias, en nuestros resultados solo encontramos MPO. Datos que se podrían relacionar con los datos clínicos de los pacientes, ya que el 92% de la población evaluada presentan en el suero anticuerpos ANCA-MPO positivos. Se conoce que la liberación de MPO es necesaria para la formación de NET, en un artículo realizado por Metzler y colaboradores se encontró que los neutrófilos de individuos inmunodeficientes de MPO no lograban liberar NET, y esto los hacía más susceptibles a desarrollar infecciones (43). El hallazgo de solo MPO en las NET de neutrófilos tratados con Cocaína Levamisol sugeriría que el predominio de ANCA anti-MPO observado en el grupo de pacientes, difiriendo de lo previamente descrito de la presencia de EN en las NET inducidas por Cocaína y Levamisol.

Al utilizar la Cocaína y el Levamisol combinados, se presentó un efecto sinérgico en la inducción de la muerte celular, esto posiblemente este asociado a mecanismo neuro farmacológico por el cual el Levamisol inhibe la enzima monoamino oxidasa y activa los receptores muscarínicos, lo que aumenta la transmisión de dopamina (97,98), otra hipótesis que nos ayuda a explicar este fenómeno, sería que el efecto generado sobre la Cocaína es dado por Aminorex, un metabolito del Levamisol, el

cual mejora las propiedades estimulantes de está, asimismo, una ingesta prolongada de este metabolito se ha encontrado asociado a diferentes enfermedades como hipertensión pulmonar y vasculitis (99,100)

Las vasculitis son un tipo de vasculopatías que se caracterizan por la inflamación de las paredes de los vasos sanguíneos, existen dos mecanismos involucrados en la inducción de la inflamación, los inmunopatogénicos y los no inmunopatogénicos. Dentro de los no inmunopatogénicos se encuentran aquellos en los cuales la infiltración de la pared del vaso sanguíneo o tejido circundante es por microorganismos o mecanismos no identificados; los mecanismos inmunopatogénicos son aquellos en los cuales se encuentran involucrada células del sistema inmune como linfocitos T citotóxicos dirigidos contra componentes de los vasos sanguíneos, expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales y la presencia de anticuerpos, los cuales pueden formar inmunocomplejos en la pared de los vasos o generar daño directo en las células endoteliales (101). En nuestra población de estudio, pacientes con VICOL, encontramos que el 92% de los pacientes presentan títulos de anticuerpos ANCA, 64% presentan títulos de MPO y el 28% de PR3 en suero acompañados de un diagnóstico de vasculitis confirmado por biopsia de piel, además se observó que el 36 % de pacientes presentaron nefritis por inmunocomplejos (CI), por lo que hipotetizamos que este grupo podría tener estos elementos circulantes y ser los CI los causantes de la muerte celular de los neutrófilos descrita en esta entidad, por esta razón, se decide evaluar la capacidad de inducción de muerte de dos mezclas de sueros, una de pacientes con nefritis con mayor probabilidad de presencia de CI circulantes y una segunda mezcla sin compromiso renal y menor probabilidad de estos CI circulantes. En nuestros resultados, observamos que los neutrófilos tratados con estos sueros presentan un bajo porcentaje de muerte celular comparado con la muerte inducida con Cocaína y Levamisol, no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de mezclas de sueros, lo que sugiere que posiblemente los CI no son el mecanismo de inducción de muerte del neutrófilo observada en los pacientes con VICOL y que otros posibles mecanismos estén involucrados.

Se cree que uno de los principales receptores involucrados en la activación de los neutrófilos son los receptores muscarínicos, los cuales podrían tener un papel importante en todo este proceso de inducción de NETosis a partir de Cocaína y Levamisol, por lo tanto, en nuestro estudio se decidió evaluar un antagonista de estos receptores muscarínicos M3, el BBH, con el fin de encontrar una posible herramienta terapéutica para tratar los pacientes con VICOL. En un estudio realizado por Carmona y colaboradores, en el cual evaluaron el mecanismo por el cual se puede estar induciendo la muerte celular de los neutrófilos mediante tratamiento con Levamisol, utilizaron inhibidores de los receptores muscarínicos M1 (Tele y UV) y M3 (4-DAMP), encontrando que en presencia del inhibidor disminuía el porcentaje de liberación de NET en los neutrófilos; al correlacionar estos resultados con lo observado en nuestro estudio, evidenciamos que el BBH indujo una inhibición parcial en la muerte inducida por Cocaína más Levamisol, lo que nos sugiere que los receptores muscarínicos podrían ser una de las vías por las cuales se está mediando la NETosis en los neutrófilos; otro tipo de receptores que podrían estar involucrados en la inducción de NETosis son los receptores Dectina-1, CD14, C1qR , receptores tipo Toll (TLR), receptores Fc, siendo estos últimos reconocidos por los ANCA (102), mecanismos no evaluados en este estudio. Por otro lado, algo que llama la atención es que el BBH no inhibe la inducción de muerte por PMA, en el artículo de Carmona y colaboradores se observó que el PMA activa la muerte del neutrófilo por la fosforilación de la vía RAF/MEK/ERK, dato obtenido mediante un inhibidor de esta vía, el cual disminuye el porcentaje de NET en las células tratadas con PMA, esto explicaría el hallazgo de Carmona y de nuestro estudio en que BBH no inhibe la muerte inducida por PMA y si reduce la muerte inducida por Cocaína y Levamisol, observaciones que sugieren que la vía RAF/MEK/ERK no es la vía de inducción de muerte en el caso de Cocaína y Levamisol (13). Con estos resultados nos podríamos plantar la idea de utilizar el BBH como posible tratamiento de la VICOL, ya que al inhibir parcialmente la muerte celular por NETosis, podría disminuir las manifestaciones clínicas en los pacientes, asimismo, se lograría limitar el uso de medicamentos inmunosupresores, disminuyendo así los efectos adversos asociados a dicha terapia.

Entre los mecanismos de inducción de muerte de neutrófilos tipo NET, se han descrito la activación de NADPH oxidasa lo que lleva a la posterior liberación de ROS, los cuales promueven la liberación de las diferentes proteínas de los gránulos, que participan en la muerte del neutrófilo y el aumento de calcio intracelular, el cual lleva a la activación de la PAD-4, involucrada en la citrulinación de las histonas. Al evaluar de forma indirecta la producción de ROS inducida por los tratamientos con Cocaína y Levamisol y la mezcla de ambas sustancias en dos tiempos diferentes (20 y 60 minutos), utilizando DHR-123 para su detección, observamos a los 60 minutos que la Cocaína induce liberación de ROS, no obstante, se evidenció que el Levamisol no, al combinarse con la Cocaína se sugiere un posible efecto antagonista, ya que a los 60 minutos de tratamiento la producción de ROS fue menor a la observada con la Cocaína individual, En el estudio realizado por Carmona y colaboradores, observaron, al igual que en nuestro estudio, que el Levamisol no induce la liberación de ROS, utilizando DPI (yodonio difenileno) el cual inhibe de forma específica la NADPH-oxidasa y por ende la liberación de ROS, lo que nos sugiere que la vía por la cual se da el mecanismo de NETosis es independiente de la liberación de ROS (13).

Como se mencionó anteriormente, otro mecanismo por el cual se podría estar induciendo la NETosis, es el aumento de calcio intracelular, debido a que la activación de PAD-4 es dependiente de calcio, y se necesita niveles altos de este ion en la célula para poder ser activado (103). En nuestro estudio utilizamos BAPTA un ácido amino carboxílico específico de calcio, al cual se van a unir dos iones de calcio, disminuyendo la cantidad de calcio libre en el citoplasma. Hallazgos preliminares muestran que las células tratadas con Cocaína combinada con Levamisol inducen muerte, pero cuando evaluamos este tratamiento en presencia de BAPTA se evidencia una disminución en esta muerte celular y un aumento en el porcentaje de células vivas; con esto, podría especularse que la vía de inducción de la muerte celular por la cual la Cocaína y el Levamisol inducen NETosis es mediante el reconocimiento del receptor muscarínico presente en la membrana plasmática, lo cual podría inducir la activación de proteínas tirosinasa, las cuales fosforilan la fosfolipasa C, llevando a la hidrólisis de fosfatidilinositol difosfato en diacilglicerol e

inositol trifosfato, este último se uniría a receptores presentes en el retículo endoplásmico induciendo la liberación de calcio (104); este aumento de calcio en el citoplasma del neutrófilo activa la PAD-4 importante en la descondensación de la cromatina promoviendo la inducción de muerte por NETosis. En el artículo de Carmona y colaboradores, evaluaron este mecanismo mediante el uso de inhibidores de la PAD-4 (Cl-amidina) y observaron una disminución en el porcentaje de NET con respecto a las células tratadas solo con Levamisol (13). Así mismo, en otro estudio realizado por Hemmers y colaboradores, en el cual utilizaron ratones deficientes de PAD-4, evaluaron la formación de NET luego de ser expuestos a infección por influenza A, encontrando que los neutrófilos de estos ratones no lograron producir NETs, comparado con los neutrófilos de los ratones control, lo que sugiere que PAD-4 y su activación es necesaria para llevarse a cabo la muerte celular por NETosis (105); ya que como se ha encontrado en algunos estudios la citrulinación de las histonas H3 y H4 es un paso requerido para la formación de las NET (106–108).

En un estudio realizado por Altstaedt y colaboradores, muestra que los neutrófilos pueden inducir de forma constitutiva la producción de IL-8 (109). En nuestro estudio evaluamos la producción de citoquinas como posible mecanismo de inducción de muerte y promotor del ambiente inflamatorio asociado al VICOL. Al evaluar un perfil proinflamatorio (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL12-P70 e IL-8) encontramos que solo los neutrófilos que habían sido tratados con los sueros de los pacientes presentaron concentraciones de IL-8. En el estudio realizado por Hsieh y colaboradores en el cual cultivaron neutrófilos con ANCA-MPO y ANCA-PR3 con el fin de determinar la función de estos anticuerpos sobre los neutrófilos, encontraron que los ANCA-MPO induce la liberación de IL-8 (110), esto podría explicar que los sueros de los pacientes de nuestro estudio podrían tener ANCA circulantes, los cuales indujeron la producción de esta interleucina.

En resumen, la Cocaína y el Levamisol pueden inducir muerte celular del neutrófilo vía NETosis, mediante diferentes trayectorias: primero mediante la activación de receptores muscarínicos que se encuentran en la membrana citoplasmática de los

neutrófilos, estas células una vez activadas pueden mediar la liberación de ROS a partir de la NADPH oxidasa, lo que sería concomitante con la liberación de las proteínas de los gránulos y su posterior traslocación al núcleo, donde median la descondensación de la cromatina y liberación de las NET con contenido nuclear y citoplasmático como MPO. Segundo, el neutrófilo, luego de su activación aumentaría los niveles de calcio intracelular mediado por la activación del inositol trifosfato (IP3) y promoviendo la activación de PAD-4, mediador importante en este tipo de muerte, ya que PAD4 media la citrulinación de las histonas causando la descondensación de la cromatina, llevando a una posterior liberación de las NET. Cuando se utilizó el BBH, antagonista muscarínico, disminuyó parcialmente la NETosis inducida por Cocaína y Levamisol, evidenciando la importancia de estos receptores en la inducción de esta forma de muerte. La activación de esta vía también podría inducir la movilización de calcio un mediador adicional en las vías de inducción de NETosis.

Luego de la liberación de las NET, aunque no estaba dentro de los alcances de este proyecto, consideramos que células presentadoras de antígeno deben reconocer la MP. Median la activación de linfocitos T CD4 y favoreciendo la activación de los linfocitos B, los cuales producen los autoanticuerpos dirigidos contra MPO (ANCA-MPO). Estos anticuerpos amplificarían mecanismos adicionales como la activación de otros neutrófilos vía receptores Fc, más liberación de NET y la activación de células endoteliales promoviendo. La expresión de moléculas de adhesión, la disminución en la velocidad del flujo sanguíneo y la unión de los neutrófilos a estas moléculas e iniciar la diapédesis generando un ambiente inflamatorio y trombótico. Como consecuencia a esto los pacientes presentan las manifestaciones clínicas características que hemos venido mencionando como, necrosis del pabellón auricular (Figura 10).

Una de las preguntas que nos surgen a partir de los resultados obtenidos es: ¿Podrá el sinergismo observado de Cocaína-Levamisol en la inducción de muerte de los neutrófilos depender de la activación de una única vía o de la sumatoria de algunas de ellas? Esto debido a que la Cocaína pudiese estar induciendo la liberación de

NET mediante la producción de ROS, por el contrario, el efecto del Levamisol parece estar mediado por la vía del calcio ya que en presencia del quelante (BAPTA) disminuyó la muerte y se observó un aumento en la viabilidad (Sytox- Hoechst⁺). Sin embargo, son necesarios otros ensayos que nos permitan soportar mejor esta hipótesis.

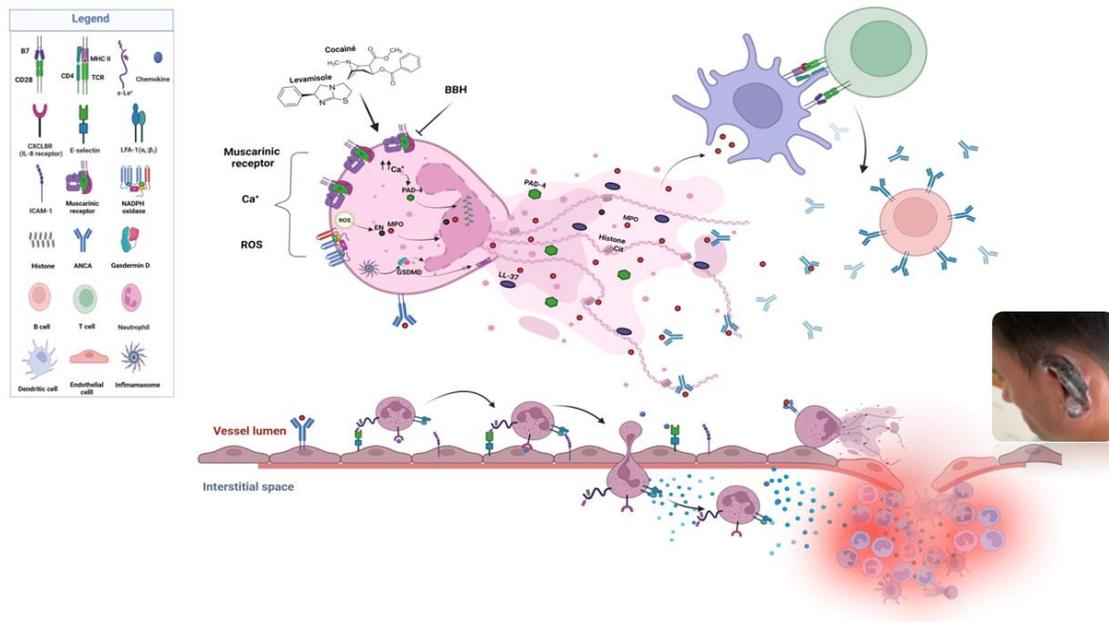


Figura 10: Modelo propuesto de la inducción de NETosis por Cocaína-Levamisol y posibles mecanismos implicados en ella y en el desarrollo de VICOL.

7. CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que hay un sinergismo entre la Cocaína y el Levamisol en la liberación de ADN y de MPO. Aunque no se detectó la presencia de EN, la detección de DNA extracelular, el patrón evidenciado en el registro fotográfico por microscopía de fluorescencia y la presencia de MPO son sugestivas de que lo observado corresponde a NETosis

Los sueros de los pacientes con vasculitis también indujeron la liberación de ADN y MPO con un patrón morfológicamente compatible con NETosis pero en una menor proporción que lo observado con Cocaína y Levamisol.

No se encontraron niveles de citoquinas detectables después del tratamiento con Levamisol solo, en presencia de Cocaína se observó una reducción en los niveles de IL-8 presente en los sueros de los pacientes, lo que sugiere que probablemente el papel de las citoquinas en la inducción de la NETosis observada no sea claro.

El mecanismo mediante el cual se da la inducción de la muerte parece ser independiente de la producción de ROS, ya que Levamisol no indujo su producción y antagonizó la inducida por Cocaína. Sin embargo, los resultados preliminares sugieren que el mecanismo por el cual se está presentando la NETosis inducida por Cocaína-Levamisol sea por una vía dependiente de calcio.

El pretratamiento con Butilbromuro de hioscina, antagonista de los receptores muscarínicos, redujo parcialmente los efectos simultáneos de la Cocaína y el Levamisol evidenciando la participación de esta vía en la inducción de este tipo de muerte compatible con NETosis.

Cabe resaltar que nuestros resultados validan la citometría de flujo como una técnica útil para la evaluación de la NETosis, ya que es un procedimiento simple, reproducible, con menor probabilidad de pérdidas de datos, mayor rendimiento, detección y agilidad en el proceso.

8. PERSPECTIVAS

- Evaluar de forma directa el mecanismo de inducción de muerte mediante la vía de calcio, con cada uno de los tratamientos individual y combinados.
- Evaluar posibles polimorfismos en los receptores muscarínicos de neutrófilos de pacientes con VICOL.
- Evaluar el papel del inflamasoma mediante la medición de IL-18 como posible mecanismo de inducción de muerte por NETosis.
- Fortalecer las evidencias de la participación de las vías de calcio y receptores muscarínicos para proponer posibles terapias para resolver la NETosis y por ende la enfermedad inflamatoria que ella causa.

9. REFERENCIAS

1. Marković A. [Vasculitis and vasculopathy]. *Acta Med Croatica*. 2012 Oct;66 Suppl 1:19–24.
2. Brogan P, Eleftheriou D, Dillon M. Small vessel vasculitis. *Pediatr Nephrol*. 2010;25(6):1025–35.
3. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 Revised International Chapel Hill consensus conference nomenclature of vasculitides. *Arthritis Rheum*. 2013;65(1):1–11.
4. Lee KC, Ladizinski B, Federman DG. Complications Associated With Use of Levamisole-Contaminated Cocaine: An Emerging Public Health Challenge. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2012;87(6):581–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025619612003904>
5. Lopera G. VASCULITIS Y NEUTROPENIA ASOCIADA AL CONSUMO DE COCAINA ADULTERADA CON LEVAMISOL : Nuevas complicaciones para viejos problemas clínicos VASCULITIS AND NEUTROPENIA ASSOCIATED WITH THE CONSUMPTION OF COCAINE MIXED WITH LEVAMISOLE : New. *Rev Patol Dual*. 2016;3(3):1–8.
6. Wolford A, McDonald TS, Eng H, Hansel S, Chen Y, Bauman J, et al. Immune-mediated agranulocytosis caused by the cocaine adulterant levamisole: a case for reactive metabolite(s) involvement. *Drug Metab Dispos*. 2012 Jun;40(6):1067–75.
7. Knowles L, Buxton JA, Skuridina N, Achebe I, LeGatt D, Fan S, et al. Levamisole tainted cocaine causing severe neutropenia in Alberta and British Columbia. *Harm Reduct J* [Internet]. 2009;6(1):30. Available from: <https://doi.org/10.1186/1477-7517-6-30>
8. Bradford M, Rosenberg B, Moreno J, Dumyati G. Bilateral Necrosis of Earlobes and Cheeks: Another Complication of Cocaine Contaminated With Levamisole. *Ann Intern Med* [Internet]. 2010 Jun 1;152(11):758–9. Available from: <https://www.acpjournals.org/doi/abs/10.7326/0003-4819-152-11-201006010-00026>
9. Muñoz-Vahos CH, Herrera-Uribe S, Arbeláez-Cortés Á, Jaramillo-Aroyave D, González-Naranjo LA, Vásquez-Duque G, et al. Clinical Profile of Levamisole-Adulterated Cocaine-Induced Vasculitis/Vasculopathy: A 30-Case Series. *J Clin Rheumatol Pract reports Rheum Musculoskelet Dis*. 2019 Apr;25(3):e16–26.
10. Martínez Téllez G, Torres Rives B, Rangel Velázquez S, Sánchez Rodríguez V, Ramos Ríos MA, Fuentes Smith LE. Anticuerpos contra el citoplasma del neutrófilo: Positividad y correlación clínica. *Reumatol Clin*. 2015;11(1):17–21.
11. Guerreiro Hernández AM, Villaescusa Blanco R, Morera Barrios LM, Arce Hernández AA, Merlín Linares JC. Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos

(ANCA): una herramienta importante en el diagnóstico de las vasculitis . Vol. 18, Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia . scielocu ; 2002. p. 0.

12. Carmona-Rivera C, Carlucci PM, Goel RR, James EA, Brooks SR, Rims CR, et al. Neutrophil extracellular traps mediate articular cartilage damage and enhance cartilage component immunogenicity in rheumatoid arthritis. *JCI Insight*. 2020;5(13).
13. Carmona-Rivera C, Purmalek MM, Moore E, Waldman M, Walter PJ, Garraffo HM, et al. A role for muscarinic receptors in neutrophil extracellular trap formation and levamisole-induced autoimmunity. *JCI Insight*. 2017;2(3):1–15.
14. Ricard Cervera Segura, Gerard Espinosa Garriga, Manuel Ramos-Casals, Jose Hernandez-Rodriguez MCCX. Enfermedades autoinmunes sistemicas. Editor medica Panam. 2014;1(5):1–589.
15. Gamarra AI, Jesús J De, Turbay C. Análisis crítico de las clasificaciones de las vasculitis. *Rev Colom Reuma*. 2006;13(1):48–64.
16. Aguirre V, Alvo M, Ardiles L, Fierro A, Goecke A, Iruretagoyena M, et al. Compromiso renal en vasculitis asociadas a anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos. Recomendaciones de consenso de las Sociedades Chilenas de Nefrología y Reumatología. *Rev Med Chil*. 2018;146(2):241–8.
17. Wada N, Mukai M, Kohno M, Notoya A, Ito T, Yoshioka N. Prevalence of serum anti-myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibodies (MPO-ANCA) in patients with Graves' disease treated with propylthiouracil and thiamazole. *Endocr J*. 2002 Jun;49(3):329–34.
18. Lee E, Miki Y, Hosokawa M, Sayo H, Kariya K. Oxidative metabolism of propylthiouracil by peroxidases from rat bone marrow. *Xenobiotica*. 1988 Oct;18(10):1135–42.
19. Sangala NC, Lee RWJ, Horsfield C, Goldsmith DJA. Combined ANCA-associated vasculitis and lupus syndrome following prolonged use of hydralazine: a timely reminder of an old foe. *Int Urol Nephrol*. 2009;42:503–6.
20. Wiik A. Drug-induced vasculitis. *Curr Opin Rheumatol*. 2008;20(1).
21. Bukhari M. Drug-induced rheumatic diseases: a review of published case reports from the last two years. *Curr Opin Rheumatol*. 2012 Mar;24(2):182–6.
22. Lee D, Chronister CW, Broussard WA, Utlely-Bobak SR, Schultz DL, Vega RS, et al. Illicit Fentanyl-Related Fatalities in Florida: Toxicological Findings. *J Anal Toxicol* [Internet]. 2016 Oct 1;40(8):588–94. Available from: <https://doi.org/10.1093/jat/bkw087>
23. Czuchlewski DR, Brackney M, Ewers C, Manna J, Fekrazad MH, Martinez A, et al. Clinicopathologic features of agranulocytosis in the setting of levamisole-tainted cocaine. *Am J Clin Pathol*. 2010 Mar;133(3):466–72.
24. Horacio C, Vahos M, Arroyave DJ, Zapata JH, Giraldo IV, Darío R, et al.

Vasculopatía Inducida por Cocaína – Levamisol : Nuevas Lecciones de Nuestra Cohorte Introducción La vasculopatía inducida por cocaína contaminada con levamisol (VICOL) descrita por primera vez en 2010 , se caracteriza por púrpura Pacientes y Métodos Rep. 2019;(February).

25. Martínez Téllez G, Torres Rives B, Rangel Velázquez S, Sánchez Rodríguez V, Ramos Ríos MA, Fuentes Smith LE. Anticuerpos contra el citoplasma del neutrófilo: positividad y correlación clínica. *Reumatol Clínica*. 2015;11(1):17–21.
26. Cornec D, Gall EC-L, Fervenza FC, Specks U. ANCA-associated vasculitis — clinical utility of using ANCA specificity to classify patients. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(10):570–9.
27. Kambas K, Chrysanthopoulou A, Vassilopoulos D, Apostolidou E, Skendros P, Girod A, et al. Tissue factor expression in neutrophil extracellular traps and neutrophil derived microparticles in antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis may promote thromboinflammation and the thrombophilic state associated with the disease. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(10):1854–63.
28. Marzano AV, Raimondo MG, Berti E, Meroni PL, Ingegnoli F. Cutaneous Manifestations of ANCA-Associated Small Vessels Vasculitis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017;53(3):428–38.
29. Millet A, Martin KR, Bonnefoy F, Saas P, Mocek J, Alkan M, et al. Proteinase 3 on apoptotic cells disrupts immune silencing in autoimmune vasculitis. *J Clin Invest*. 2015/10/05. 2015 Nov;125(11):4107–21.
30. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: Implications for innate immunity. *Blood*. 2011;117(3):953–9.
31. Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med*. 2017;23(3):279–87.
32. McInnis EA, Badhwar AK, Muthigi A, Lardinois OM, Allred SC, Yang J, et al. Dysregulation of autoantigen genes in ANCA-associated vasculitis involves alternative transcripts and new protein synthesis. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Feb;26(2):390–9.
33. O’Sullivan KM, Holdsworth SR. Neutrophil Extracellular Traps: A Potential Therapeutic Target in MPO-ANCA Associated Vasculitis? *Front Immunol*. 2021;12(March):1–16.
34. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JAM, et al. In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*. 2010 Jul;116(4):625–7.
35. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*. 2010;31(8):318–24.

36. Jaillon S, Galdiero MR, Del Prete D, Cassatella MA, Garlanda C, Mantovani A. Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin Immunopathol.* 2013;35(4):377–94.
37. Hidalgo A, Chilvers ER, Summers C, Koenderman L. The Neutrophil Life Cycle. *Trends Immunol.* 2019 Jul;40(7):584–97.
38. Häger M, Cowland JB, Borregaard N. Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med.* 2010 Jul;268(1):25–34.
39. Faurschou M, Sørensen OE, Johnsen AH, Askaa J, Borregaard N. Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Aug;1591(1–3):29–35.
40. Rai G. NETosis: Immunity, Pathogenesis, and Therapeutics. In: Elsevier. India; 2019. p. 1–21.
41. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486–541.
42. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. *J Immunol.* 2012;189(6):2689–95.
43. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood.* 2011 Jan;117(3):953–9.
44. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol.* 2014 Nov;15(11):1017–25.
45. Frangou E, Vassilopoulos D, Boletis J, Boumpas DT. An emerging role of neutrophils and NETosis in chronic inflammation and fibrosis in systemic lupus erythematosus (SLE) and ANCA-associated vasculitides (AAV): Implications for the pathogenesis and treatment. *Autoimmun Rev.* 2019;18(8):751–60.
46. Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J Leukoc Biol.* 1996 Feb;59(2):229–40.
47. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004 Mar;303(5663):1532–5.
48. Urban CF, Lourido S, Zychlinsky A. How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol.* 2006 Nov;8(11):1687–96.
49. Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, et al. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol.* 2006 Feb;16(4):396–400.
50. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel

- cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007;176(2):231–41.
51. Masuda S, Nakazawa D, Shida H, Miyoshi A, Kusunoki Y, Tomaru U, et al. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin Chim Acta.* 2016;459:89–93.
 52. Douda DN, Khan MA, Grasemann H, Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci.* 2015 Mar;112(9):2817 LP – 2822.
 53. Sorvillo N, Cherpokova D, Martinod K, Wagner DD. Extracellular DNA networks with dire consequences for health. *Circ Res.* 2019;125(4):470–88.
 54. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(2):134–47.
 55. Khan MA, Farahvash A, Douda DN, Licht J-C, Grasemann H, Swezey N, et al. JNK Activation Turns on LPS- and Gram-Negative Bacteria-Induced NADPH Oxidase-Dependent Suicidal NETosis. *Sci Rep.* 2017;7(1):3409.
 56. Radice A, Sinico RA. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Autoimmunity.* 2005 Feb;38(1):93–103.
 57. Savage CO, Gaskin G, Pusey CD, Pearson JD. Myeloperoxidase binds to vascular endothelial cells, is recognized by ANCA and can enhance complement dependent cytotoxicity. *Adv Exp Med Biol.* 1993;336:121–3.
 58. Lood C, Hughes GC. Neutrophil extracellular traps as a potential source of autoantigen in cocaine-associated auto immunity. *Rheumatol (United Kingdom).* 2017;56(4):638–43.
 59. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood.* 2011 Jan;117(3):953–9.
 60. Frangou E, Vassilopoulos D, Boletis J, Boumpas DT. An emerging role of neutrophils and NETosis in chronic inflammation and fibrosis in systemic lupus erythematosus (SLE) and ANCA-associated vasculitides (AAV): Implications for the pathogenesis and treatment. *Autoimmun Rev [Internet].* 2019;18(8):751–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.06.011>
 61. Ruth A-J, Kitching AR, Kwan RYQ, Odobasic D, Ooi JDK, Timoshanko JR, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and effector CD4+ cells play nonredundant roles in anti-myeloperoxidase crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Jul;17(7):1940–9.
 62. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarker U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med.* 2009;15(6):623–5.
 63. Yoshida M, Sasaki M, Sugisaki K, Yamaguchi Y, Yamada M. Neutrophil extracellular trap components in fibrinoid necrosis of the kidney with

- myeloperoxidase-ANCA-associated vasculitis. *Clin Kidney J.* 2013;6(3):308–12.
64. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2009 Oct;5(10):e1000639.
 65. Pepper RJ, Hamour S, Chavele KM, Todd SK, Rasmussen N, Flint S, et al. Leukocyte and serum S100A8/S100A9 expression reflects disease activity in ANCA-associated vasculitis and glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2013;83(6):1150–8.
 66. Wang H, Wang C, Zhao M-H, Chen M. Neutrophil extracellular traps can activate alternative complement pathways. *Clin Exp Immunol.* 2015 Sep;181(3):518–27.
 67. Kumar SVR, Kulkarni OP, Mulay SR, Darisipudi MN, Romoli S, Thomasova D, et al. Neutrophil Extracellular Trap-Related Extracellular Histones Cause Vascular Necrosis in Severe GN. *J Am Soc Nephrol.* 2015 Oct;26(10):2399–413.
 68. Misra DP, Thomas KN, Gasparyan AY, Zimba O. Mechanisms of thrombosis in ANCA-associated vasculitis. *Clin Rheumatol [Internet].* 2021;40(12):4807–15. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10067-021-05790-9>
 69. Söderberg D, Kurz T, Motamedi A, Hellmark T, Eriksson P, Segelmark M. Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the circulation of patients with small vessel vasculitis, but an inverse correlation to anti-neutrophil cytoplasmic antibodies during remission. *Rheumatology.* 2015 Nov;54(11):2085–94.
 70. Stoiber W, Obermayer A, Steinbacher P, Krautgartner WD. The role of reactive oxygen species (ROS) in the formation of extracellular traps (ETs) in humans. *Biomolecules.* 2015;5(2):702–23.
 71. Vorobjeva N V, Chernyak B V. NETosis: Molecular Mechanisms ., 2020;85(10):1178–90.
 72. Zhou S, Yuan X, Liu Q, Zhang X, Pan X, Zang L, et al. BAPTA-AM, an intracellular calcium chelator, inhibits RANKL-induced bone marrow macrophages differentiation through MEK/ERK, p38 MAPK and Akt, but not JNK pathways. *Cytokine.* 2010 Dec;52(3):210–4.
 73. Shin J II, Lee KH, Joo YH, Lee JM, Jeon J, Jung HJ, et al. Inflammasomes and autoimmune and rheumatic diseases: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2019 Sep;103:102299.
 74. Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a key driver of vascular disease. *Cardiovasc Res.* 2022 Jan;118(2):372–85.
 75. Keshari RS, Jyoti A, Dubey M, Kothari N, Kohli M, Bogra J, et al. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the

- inflammatory disease condition. PLoS One. 2012;7(10):e48111.
76. Flores Soto ST. Estructura y función de los receptores nicotínicos. *Rev Mex Neuroci.* 2005;6(4):315–26.
 77. Irizarry-Caro JA, Carmona-Rivera C, Schwartz DM, Khaznadar SS, Kaplan MJ, Grayson PC. Brief Report: Drugs Implicated in Systemic Autoimmunity Modulate Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ).* 2018 Mar;70(3):468–74.
 78. Estupefacientes JI De. Informe. 2022.
 79. ODC. Estudio Nacional De Consumo De Sustancias Psicoactivas En Colombia - 2013. *Obs Drog Colomb.* 2013;66:37–9.
 80. Pomara C, Cassano T, Errico S, Bello S, Romano AD, Riezzo I, et al. Data Available on the Extent of Cocaine Use and Dependence: Biochemistry, Pharmacologic Effects and Global Burden of Disease of Cocaine Abusers [Internet]. Vol. 19, *Current Medicinal Chemistry.* 2012. p. 5647–57. Available from: <http://www.eurekaselect.com/article/47297>
 81. Chung C, Tumeh PC, Birnbaum R, Tan BH, Sharp L, McCoy E, et al. Characteristic purpura of the ears, vasculitis, and neutropenia--a potential public health epidemic associated with levamisole-adulterated cocaine. *J Am Acad Dermatol.* 2011 Oct;65(4):722-725.e2.
 82. González Rodríguez G, Sánchez CG, Sanclemente J. Vasculitis asociada al consumo de cocaína adulterada con levamisol. *Rev la Asoc Colomb Dermatología y Cirugía Dermatológica.* 2017;25(4):314–20.
 83. Raso AM, Visentin I, Zan S, Rispoli P, Conforti M, Moniaci D, et al. [Vascular pathology of surgical interest in drug addicts]. *Minerva Cardioangiol.* 2000 Oct;48(10):287–96.
 84. Kumar PD, Smith HR. Cocaine-related vasculitis causing upper-limb peripheral vascular disease. Vol. 133, *Annals of internal medicine.* United States; 2000. p. 923–4.
 85. TRIMARCHI M, GREGORINI G, FACCHETTI F, MORASSI ML, MANFREDINI C, MAROLDI R, et al. Cocaine-Induced Midline Destructive Lesions: Clinical, Radiographic, Histopathologic, and Serologic Features and their Differentiation from Wegener Granulomatosis. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2001;80(6). Available from: https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2001/11000/Cocaine_Induced_Midline_Destructive_Lesions_.5.aspx
 86. Sáez CG, Olivares P, Pallavicini J, Panes O, Moreno N, Massardo T, et al. Increased number of circulating endothelial cells and plasma markers of endothelial damage in chronic cocaine users. *Thromb Res.* 2011 Oct;128(4):e18-23.
 87. Lapachinske SF, Okai GG, dos Santos A, de Bairros AV, Yonamine M. Analysis of cocaine and its adulterants in drugs for international trafficking

- seized by the Brazilian Federal Police. *Forensic Sci Int*. 2015 Feb;247:48–53.
88. OEA - CICAD. *Adulterantes de las Drogas y sus Efectos en la Salud de Los Usuarios* [Internet]. Organización de los Estados Americanos. 2019. 169 p. Available from: <http://www.cicad.oas.org/oid/pubs/FINALAdulterantesESP.pdf>
 89. Bertol E, Mari F, Milia MG Di, Politi L, Furlanetto S, Karch SB. Determination of aminorex in human urine samples by GC-MS after use of levamisole. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2011;55(5):1186—1189. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.03.039>
 90. Vanhoutte PM, Van Nueten JM, Verbeuren TJ, Laduron PM. Differential effects of the isomers of tetramisole on adrenergic neurotransmission in cutaneous veins of dog. *J Pharmacol Exp Ther*. 1977 Jan;200(1):127–40.
 91. Levandoski MM, Piket B, Chang J. The anthelmintic levamisole is an allosteric modulator of human neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol*. 2003 Jun;471(1):9–20.
 92. Raymon LP, Isenschmid DS. Letter to the editor: The possible role of levamisole in illicit cocaine preparations. Vol. 33, *Journal of analytical toxicology*. England; 2009. p. 620–2.
 93. Brunt TM, van den Berg J, Pennings E, Venhuis B. Adverse effects of levamisole in cocaine users: a review and risk assessment. *Arch Toxicol*. 2017;91(6):2303–13.
 94. Zharkova O, Tay SH, Lee HY, Shubhita T, Ong WY, Lateef A, et al. A Flow Cytometry-Based Assay for High-Throughput Detection and Quantification of Neutrophil Extracellular Traps in Mixed Cell Populations. *Cytom Part A*. 2019;95(3):268–78.
 95. Raufman J-P, Shant J, Xie G, Cheng K, Gao X-M, Shiu B, et al. Muscarinic receptor subtype-3 gene ablation and scopolamine butylbromide treatment attenuate small intestinal neoplasia in *Apcmin/+* mice. *Carcinogenesis* [Internet]. 2011/06/24. 2011 Sep;32(9):1396–402. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21705482>
 96. Zhao W, Fogg DK, Kaplan MJ. A novel image-based quantitative method for the characterization of NETosis. *J Immunol Methods* [Internet]. 2015;423:104–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2015.04.027>
 97. Brunt TM, van den Berg J, Pennings E, Venhuis B. Adverse effects of levamisole in cocaine users: a review and risk assessment. *Arch Toxicol*. 2017 Jun;91(6):2303–13.
 98. Tallarida CS, Egan E, Alejo GD, Raffa R, Tallarida RJ, Rawls SM. Levamisole and cocaine synergism: a prevalent adulterant enhances cocaine's action in vivo. *Neuropharmacology*. 2014 Apr;79:590–5.
 99. Hofmaier T, Luf A, Seddik A, Stockner T, Holy M, Freissmuth M, et al. Aminorex, a metabolite of the cocaine adulterant levamisole, exerts amphetamine like actions at monoamine transporters. *Neurochem Int*

- [Internet]. 2014;73:32–41. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018613003070>
100. Karch SB, Mari F, Bartolini V, Bertol E. Aminorex poisoning in cocaine abusers. *Int J Cardiol* [Internet]. 2012;158(3):344–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167527311006620>
 101. Collinao Romero M. Vasculitis sistémica. *Rev Mex Enfermería Cardiológica* [Internet]. 2003;11(1):26–31. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/enfe/en-2003/en031e.pdf>
 102. Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2013;17(3):638–50. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576913003056>
 103. Arneth B, Arneth R. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and Vasculitis. *Int J Med Sci*. 2021;18(7):1532–40.
 104. Marinissen MJ, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2001;22(7):368–76. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165614700016783>
 105. Hemmers S, Teijaro JR, Arandjelovic S, Mowen KA. PAD4-Mediated Neutrophil Extracellular Trap Formation Is Not Required for Immunity against Influenza Infection. *PLoS One* [Internet]. 2011;6(7):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022043>
 106. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med*. 2010 Aug;207(9):1853–62.
 107. Neeli I, Khan SN, Radic M. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J Immunol*. 2008 Feb;180(3):1895–902.
 108. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*. 2009 Jan;184(2):205–13.
 109. Altstaedt J, Kirchner H, Rink L. Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. *Immunology*. 1996 Dec;89(4):563–8.
 110. Hsieh SC, Yu HS, Cheng SH, Li KJ, Lu MC, Wu CH, et al. Anti-myeloperoxidase antibodies enhance phagocytosis, IL-8 production, and glucose uptake of polymorphonuclear neutrophils rather than anti-proteinase 3 antibodies leading to activation-induced cell death of the neutrophils. *Clin Rheumatol*. 2007 Feb;26(2):216–24.

TRABAJOS EN EVENTOS

ALACI22 - 13th Latin American and Caribbean Immunology and 7th Cuban Immunology Society Congresses. Varadero, Cuba. Junio 6-10 del 2022. **Prestación poster: Cocaine-levamisole neutrophils cell death could be mediated by reactive oxygen species.**

American College of Rheumatology (ACCR) convergence 2021. Atlanta, EEUU. Noviembre 06-09, 2021. **Presentación poster: Hyoscine Butylbromide Inhibits Neutrophil Cell Death Induction by Cocaine-levamisole. a Proof of Concept for the Management of Vasculopathy Induced by Cocaine-Levamisole**

IX Congreso Colombiano de Reumatología Pediátrica, XVII Congreso de la Asociación Centroamericana, Caribe (ACCAR). Pereira, Colombia. Septiembre 9-12 del 2021. **Presentación poster: Efecto Sinérgico de Cocaína más Levamisol Como Inductor de la Muerte Celular de Neutrófilos. Evento Fundamental en la Vasculopatía Inducida (VICOL).**