

**EFFECTO DEL IFN γ EN LA INDUCCI3N DE TRAMPAS
EXTRACELULARES DE LOS NEUTR3FILOS (NET) EN PACIENTES
CON ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CR3NICA.**

GABRIEL JAIME V3LEZ TOB3N

**GRUPO DE INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS.
ESCUELA DE MICROBIOLOG3A
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA**

**EFFECTO DEL IFN γ EN LA INDUCCIÓN DE TRAMPAS
EXTRACELULARES DE LOS NEUTRÓFILOS (NET) EN PACIENTES
CON ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA.**

**Trabajo de grado para optar al título de
MAGISTER EN MICROBIOLOGÍA Y BIOANALISIS**

TUTOR

Juan Álvaro López MSc., PhD

COMITÉ TUTORIAL

Marlene Jiménez Del Rio MSc., Dr.Sci

Ángel González Marín MSc., PhD

**GRUPO DE INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS.
ESCUELA DE MICROBIOLOGIA
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
MEDELLÍN
2015**

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer mi tutor Juan Álvaro López y los miembros del comité tutorial Marlene Jiménez Del Rio y Ángel González Marín quienes con sus aportes le dieron gran soporte científico a mi trabajo.

También agradezco al Grupo de Inmunodeficiencias Primarias donde fue posible realizar los experimentos desarrollados en mi trabajo de grado. Así mismo a los pacientes objeto de estudio que representan la motivación para realizar este tipo de estudios

Finalmente, este trabajo no habría sido posible sin la financiación del Departamento Administrativo de Ciencia Tecnología e Innovación COLCIENCIAS (Código del proyecto: 111554531412)

1	SIGLAS	5
2	RESUMEN	6
3	ABSTRACT	9
4	INTRODUCCIÓN	11
4.1	COMPONENTES DEL SISTEMA NADPH OXIDASA	11
4.2	ACTIVACIÓN DEL SISTEMA NADPH OXIDASA	13
4.3	ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA (EGC)	15
4.4	TRATAMIENTO DE LA EGC	17
4.5	TRAMPAS EXTRACELULARES DE LOS NEUTRÓFILOS	18
4.6	NETOSIS	18
4.7	MODELOS DE ESTUDIO PARA EVALUACIÓN DE LAS NET	21
4.8	ALTERACIONES EN LA PRODUCCIÓN DE NET	23
4.9	NET Y ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA	24
5	HIPÓTESIS	28
6	OBJETIVOS	29
6.1	OBJETIVO GENERAL:.....	29
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	29
7	MATERIALES Y MÉTODOS	30
7.1	MUESTRA DE ESTUDIO	30
7.2	PURIFICACIÓN DE NEUTRÓFILOS	30
7.3	DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO	31
7.4	CUANTIFICACIÓN DEL ADN EXTRACELULAR	31
7.5	MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	32
7.6	CUANTIFICACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE NET MEDIANTE ANÁLISIS DE IMÁGENES	33
7.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
8	RESULTADOS	34
8.1	PRODUCCIÓN DE NET EN PACIENTES CON EGG	34
8.2	EFFECTO DEL IFN γ EN LA PRODUCCION DE NET	41
8.3	PRODUCCIÓN DE NET A TRAVÉS DE UN MECANISMO INDEPENDIENTE DEL OXÍGENO	54
8.4	PRODUCCIÓN DE NET DESPUÉS DE LA ESTIMULACIÓN CON LPS.....	60
9	DISCUSIÓN	72
10	PERSPECTIVAS	80
11	APORTES CIENTÍFICOS DE LA INVESTIGACIÓN	81
12	ANEXOS	82
13	BILBIOGRAFÍA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

1 SIGLAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AR: Autosómico recesivo

Cl⁻: Cloro

DHR: Dihidrorodamina

DPI: Difenil yodonio (del inglés *Diphenyleneiodonium Chloride*)

EGC: Enfermedad Granulomatosa Crónica

FAD: Flavín adenín dinucleótido

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HCIO: Ácido hipocloroso

IFN γ : Interferón gamma recombinante

IL: Interleuquina

LX: Ligado al cromosoma X

MPO: Mieloperoxidasa

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NET: Trampas extracelulares de los Neutrófilos

NO: Óxido nítrico

O₂⁻: Anión superóxido

ONOO⁻: Peroxinitrito

PAD4: Peptidil arginina deaminasa 4

Phox: Del inglés "*Phagocyte oxidase*"

PKC: Proteína Quinasa C

PMA: Del inglés Phorbol myristate acetate

PMNN: Polimorfonucleares Neutrófilos

PRR: Región rica en prolinas

PVL: Citolisina Panton Valentine Leucocidina

ROS: Especies Reactivas del Oxígeno

SH3: Del inglés "*Src Homology 3*"

SRC: Proto-oncogen tyrosin proteína quinasa Src

TPR: Tetratricopeptido

UFR: Unidades de fluorescencia relativa

2 RESUMEN

Introducción. Las trampas extracelulares de los neutrófilos (NET) son estructuras compuestas principalmente por cromatina y contenido de los gránulos citoplasmáticos, son liberadas por los polimorfonucleares neutrófilos (PMNN) como mecanismo de defensa inmovilizando y destruyendo microorganismos. El proceso mediante el cual estas estructuras son liberadas es conocido como NETosis. Aunque los mecanismos moleculares involucrados en la formación de NET aún no son completamente conocidos se sabe que las especies reactivas del oxígeno (ROS), producidas por el sistema NADPH oxidasa en las células fagocíticas, son esenciales para la descondensación de la cromatina y subsecuente formación de las NET.

La Enfermedad Granulomatosa Crónica (EGC) es una inmunodeficiencia primaria caracterizada por una falla en la producción de ROS como consecuencia de mutaciones en los genes que codifican para las proteínas que hacen parte del sistema NADPH oxidasa en las células fagocíticas. Se ha reportado que los pacientes con EGC no producen NET y la falla en este mecanismo podría ser parcialmente responsable del incremento en la susceptibilidad a infecciones. Se ha reportado que el uso de interferón gamma recombinante ($\text{IFN}\gamma$) reduce la susceptibilidad a infecciones en algunos de estos pacientes incrementando parcialmente la actividad oxidativa del sistema NADPH oxidasa y consecuentemente la actividad microbicida de los PMNN. Sin embargo, el mecanismo molecular mediante el cual el $\text{IFN}\gamma$ promueve la actividad microbicida en los PMNN de los pacientes aun no es conocido. Con base en lo anterior nuestro objetivo fue determinar el efecto del $\text{IFN}\gamma$ en la producción de NET por parte de los PMNN de pacientes con EGC

Materiales y métodos. Para evaluar la producción de ROS y NET, se aislaron PMNN de individuos sanos (controles) y de pacientes con EGC a partir de sangre periférica, mediante separación por gradiente de densidad. Las células fueron pre-estimuladas con $\text{IFN}\gamma$ (100 UI/mL) por 2 horas a 37°C y posteriormente activadas con PMA (50 nM) por 15 min a 37°C, la producción de ROS fue medida a través de citometría de flujo

usando el test de oxidación de la dihidrorodamina (DHR). Adicionalmente, para la visualización de las NET, los PMNN fueron pre-estimulados con $\text{IFN}\gamma$ (100 UI/mL o 250 UI/mL) y estimuladas con PMA (50 nM), ionomicina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las NET fueron documentadas mediante el uso de un microscopio invertido de fluorescencia, el ADN fue teñido con Hoeschst 33342 y se marcó la elastasa con anticuerpos anti-elastasa humana. La liberación de ADN fue medida a través de un fluorómetro. La producción de NET fue analizada mediante el test de Wilcoxon teniendo en cuenta una $p < 0.01$.

Resultados. Inicialmente los PMNN de individuos sanos y pacientes con EGC fueron estimulados solamente con $\text{IFN}\gamma$ y se observó que ésta citoquina por sí sola no induce producción de ROS; sin embargo, cuando los PMNN fueron pre-estimulados con $\text{IFN}\gamma$ y posteriormente estimulados con PMA hubo un incremento en la producción de ROS en comparación con la células que solo fueron estimuladas con PMA. Además, determinamos la producción de NET a través de microscopía de fluorescencia en PMNN de individuos sanos y pacientes tratados con diferentes estímulos. En las células sin estímulo de ambos grupos se observó la morfología clásica de los PMNN con su núcleo multilobulado, sin embargo cuando las células de los individuos sanos fueron estimuladas con PMA, se observó un incremento significativo en la producción de NET, contrario a lo que ocurrió en los PMNN de los pacientes con EGC en donde se detectó una baja producción de NET. Sin embargo, cuando las células de los pacientes fueron pre-estimuladas con $\text{IFN}\gamma$ 100 UI/mL o $\text{IFN}\gamma$ 250 UI/mL y posteriormente estimuladas con PMA 50 nM hubo un leve incremento en la producción de NET. La estimulación con ionomicina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o LPS 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en las células de pacientes y controles resultó en una alta producción de NET lo cual se evidenció a través de microscopía de fluorescencia y la cuantificación por la fluorimetría.

Discusión. En el presente estudio se demostró que la producción de ROS y NET en PMNN de individuos sanos es inducida normalmente después de la estimulación con PMA, pero no cuando las células son estimuladas solamente con $\text{IFN}\gamma$. Además la pre-estimulación con $\text{IFN}\gamma$ seguido de la estimulación con PMA incrementa la producción

de ROS. Interesantemente, se observó que las células de los pacientes liberan NET cuando son estimuladas con PMA, ionomicina y LPS, contrario a lo que se ha reportado en la literatura. También, estos resultados sugieren que el $IFN\gamma$ podría estar potenciando la actividad microbicida de los PMNN induciendo una mayor liberación de NET. La alta producción de NET cuando las células fueron estimuladas con ionomicina está relacionada con un mecanismo independiente del oxígeno. Finalmente, la producción de NET en células estimuladas con LPS indica que tal vez los PMNN podrían responder frente algunas bacterias a través de la NETosis.

3 ABSTRACT

Introduction. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) are complex variable structures comprised mainly of chromatin and proteins from intracytoplasmic granules that are released by Polymorphonuclear Neutrophils (PMNs) as a defense mechanism that immobilize microorganisms to facilitate their destruction. The process by which these structures are released is known as NETosis. Although the molecular events involved in the formation of NETs are not completely understood, it is known that reactive oxygen species (ROS) produced by the NADPH oxidase system by these phagocytic cells are essential for chromatin decondensation and subsequently NETs formation.

Chronic Granulomatous Disease (CGD) is a primary immunodeficiency characterized by a failure to produce ROS due to mutations in genes coding for different proteins associated with the NADPH oxidase system in phagocytic cells. It has been previously shown that CGD patients do not release NETs and it has been suggested that this mechanism might be partly responsible for their increased susceptibility to infections. The use of recombinant human Interferon gamma (IFN γ) has been shown to reduce this susceptibility in some patients by partly increasing NADPH oxidase activity and consequently the microbicidal activity of PMNs. However, the molecular mechanism by which IFN γ promotes most of its microbicidal activity in PMNs of these patients remains unclear. Therefore, we aimed to determine whether IFN γ affects the production of NETs in PMNs from CGD patients.

Methods. To evaluate production of ROS and NETs, human PMNs were isolated from healthy individuals and patients with X-CGD from peripheral blood using density gradient separation. The cells were then primed with 100 UI/mL of IFN γ for 2 hours at 37°C, and subsequently stimulated with a 50 nM solution of PMA for 15 min at 37°C. ROS production was measured by flow cytometry using the dihydrorhodamine oxidation test (DHR). In addition, for visualization of NETs, PMNs were primed with IFN γ (100 UI/mL or 250 UI/mL) and stimulated with PMA (50 nM) or Ionomycin (5 μ g/mL) or LPS

(5 µg/mL). NETs formation was documented with the Hoeschst 33342 stain solution for DNA and anti-human elastase antibodies, using an inverted fluorescent microscope. DNA release was measured by a fluorometer. NETs production was analyzed by Wilcoxon test with $p < 0.01$.

Results. Initially, PMNs from healthy individuals and patients were stimulated with IFN γ 100 UI/mL alone, and no measurable production of ROS by DHR testing was observed. However, stimulation of PMNs of both groups with PMA 50 nM resulted in high production of ROS as expected. Furthermore, when PMNs were primed with IFN γ and subsequently stimulated with PMA it was observed an increase in the induction of ROS when compared with PMNs stimulated with PMA only. Next, we used fluorescence microscopy to visualize NETs under different conditions. Thus, PMNs from both groups that were non-stimulated retained the classic morphology of multilobed nuclei; in contrast, PMNs from healthy individuals that were stimulated with PMA showed a significant production of NET whereas PMNs from X-CGD patients showed low formation of these structures. In addition, PMNs from both groups treated with ionomycin or LPS resulted in high production of NETs as evidenced by fluorescence microscopy and fluorometry.

Discussion. Herein we demonstrate that production of ROS and NETs by PMNs is induced normally in healthy individuals by stimulation with PMA but not by IFN γ alone, besides priming with IFN γ followed by PMA stimulation increased the ROS production. Interestingly, we found that PMNs from CDG patients released NETs when stimulated with PMA, ionomycin and LPS, in contrast to previous reports. Therefore, we suggest that IFN γ could be potentiating the microbicidal activity of PMNs by promoting the production of NETs. The high production of NETs when cells were stimulated with ionomycin was associated with an independent ROS NETs release. Finally, Production of NETs when cells were stimulated with LPS indicates that PMNs could response against some bacteria through a NETosis mechanism.

4 INTRODUCCIÓN

Los polimorfonucleares neutrófilos (PMNN) son células de conformación esférica con un tamaño medio de 10 – 15 μm cuya principal característica morfológica es la presencia de un núcleo lobulado y citoplasma con abundante granulación. Estos gránulos tienen alta capacidad microbicida y se clasifican en gránulos primarios, secundarios y terciarios. Los gránulos primarios o azurófilos se forman durante la etapa promielocítica en medula ósea y poseen abundante cantidad de mieloperoxidasa acompañada de proteínas antimicrobianas tales como defensinas, proteínas catiónicas, hidrolasas ácidas, fosfatasa ácida, lisozima y proteasas neutras como catepsina D y G (1, 2).

Los gránulos secundarios se forman durante los estadios de mielocito y metamielocito y tienen un alto contenido en lactoferrina, lisozima, fosfatasa alcalina, colagenasa y proteínas del sistema NADPH oxidasa. Finalmente, durante el estadio de banda y neutrófilo se da la formación de los gránulos terciarios ricos en gelatinasa y colagenasa (3-5).

Los PMNN actúan como mediadores primarios ante una respuesta inflamatoria y juegan un papel esencial en la defensa innata del hospedero frente a agentes patógenos. La fagocitosis es su principal mecanismo de eliminación de microorganismos y partículas extrañas que han logrado atravesar las barreras primarias de defensa como piel y mucosas (6-9). Para esto se vale de sustancias proteolíticas contenidas en sus gránulos citoplasmáticos a través mecanismos independientes del oxígeno. Adicionalmente, la acción microbicida se puede presentar por una vía dependiente del oxígeno mediante la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) (10). Las ROS son generadas a través de un proceso conocido como “explosión respiratoria” llevado a cabo por el sistema NADPH oxidasa (11, 12).

4.1 COMPONENTES DEL SISTEMA NADPH OXIDASA

El sistema NADPH oxidasa es un complejo multienzimático que tiene como función la producción de ROS a partir de la molécula NADPH, está localizado en la membrana

celular y de los gránulos secundarios de los fagocitos y se compone de proteínas de membrana y citosólicas que son codificadas por genes independientes (Tabla 1) (9, 10). El componente de membrana está conformado por las proteínas gp91 phox (“phox” del inglés *phagocyte oxidase*) y p22 phox, las cuales conforman el centro catalizador de la oxidasa conocido como *flavohemocitocromo b₅₅₈*. En el citosol se encuentran las subunidades p47 phox, p67 phox, p40 phox y las proteínas reguladoras Rac1 y Rac2 (11).

La gp91 phox es una glicoproteína de 91 kDa, responsable de unir NADPH, FAD y grupos hemo importantes para la transferencia de electrones hacia el oxígeno molecular que se encuentra en la vacuola fagocítica, además de inducir la producción de anión superóxido (O_2^-). La proteína p22 phox (22 kDa) posee una región rica en prolinas (PRR) que interactúa con un dominio de homología 3 de las SRC (SH3) que se encuentra en p47 phox (9, 13); así mismo esta proteína es quien permite que la gp91 phox se acople con estas mismas subunidades citosólicas y se inicie la producción de ROS (14, 15).

La p47 phox interactúa con los demás componentes citosólicos del sistema oxidasa a través de dos dominios SH3, un PRR, y un PX, este último importante para su interacción con la membrana celular (16, 17). La p67 phox posee un dominio de activación esencial para la transferencia de electrones a través del centro reductor del *flavohemocitocromo b₅₅₈* (11, 18). Igualmente, p67 phox posee dos dominios SH3 importante para la interacción con p47 phox, un dominio de repeticiones tetratricopetídicas (TPR) que facilita la interacción con la proteína Rac (19) y un dominio PB1 (*Px-phox* y *Bem1*) importante para la interacción entre p67 phox y p40 phox (20, 21).

Finalmente se encuentra la proteína p40 phox, en la que se han identificado tres dominios: un PX, un SH3 y un PB1. El papel de esta proteína en humanos es mantener acoplado el sistema NADPH oxidasa durante la activación y la producción de anión superóxido (O_2^-) (22-24)

Como componentes reguladores de este complejo enzimático se encuentran las proteínas Rac1 y Rac2, las cuales para estimular la producción de ROS pasan de una forma inactiva unida a GDP a la forma activa unida a GTP (17, 23, 25).

Tabla 1: Identificación de los componentes del sistema NADPH oxidasa

Proteína	Ubicación celular	Aminoácidos	Gen	Ubicación cromosómica	Tamaño del gen (kb)	Exones	Herencia	Casos
<i>gp91phox</i>	Membrana	570	<i>CYBB</i>	Xp21.1	30	13	LX	70%
<i>p22phox</i>	Membrana	195	<i>CYBA</i>	16q24	8,5	6	AR	5%
<i>p47phox</i>	Citosol	390	<i>NCF1</i>	7q11.23	15	11	AR	20%
<i>p67phox</i>	Citosol	526	<i>NCF2</i>	1q25	40	16	AR	5%
<i>p40phox</i>	Citosol	339	<i>NCF4</i>	22q13.1	18	10	AR	1*

LX: Ligado al X, AR: Autosómico Recesivo, * Un caso reportado

4.2 ACTIVACIÓN DEL SISTEMA NADPH OXIDASA

Para la producción de ROS por el sistema NADPH oxidasa es necesario la interacción de los componentes de membrana (*gp91 phox* y *p22 phox*) con los componentes citosólicos (*p47 phox*, *p67 phox* y *p40 phox*) y las proteínas Rac (25, 26). Es por esto que la activación de la oxidasa requiere cambios complejos entre las subunidades proteicas del sistema, mediadas en gran parte por cambios conformacionales y enlaces no covalentes entre dominios SH3 y regiones ricas en prolina de la proteína *p47 phox* con la *p22 phox* (9, 13). En estado de reposo, las proteínas de membrana y las citosólicas se encuentran separadas y no hay producción de ROS (Figura 1A), pero ante un estímulo externo tal como la presencia de microorganismos o mediadores pro-inflamatorios, comienza el proceso de explosión respiratoria. En primer lugar se da la translocación y unión de las proteínas citoplasmáticas con el *flavohemocitocromo b₅₅₈*

(se fosforila p47 phox y se dan cambios estructurales que permiten la interacción con p22 phox) y en segundo lugar, se promueve la generación de la conformación activa del complejo enzimático (27, 28) para lo cual son necesarias las proteínas unidoras de GTP (Rac) (29). Una vez ocurre esto, el *flavohemocitocromo b₅₅₈*, que lleva unido por enlaces no covalentes un cofactor FAD y dos grupos prostéticos heme (en la gp91 phox), toma electrones de la molécula de NADPH y los transfiere al oxígeno molecular (O_2), para generar el anión superóxido (O_2^-) y $NADP^+$ (Figura 1B) (30).

Este anión superóxido es el precursor de potentes oxidantes y, a su vez, puede reaccionar entre sí para generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de una reacción conocida como dismutación, la cual puede ser espontánea o catalizada por la enzima superóxido dismutasa (31). Así mismo, en presencia de hierro, el O_2^- y el H_2O_2 reaccionan para generar radicales hidroxilos (OH^-) y además, en procesos inflamatorios se pueden generar otros agentes oxidantes tales como el ácido hipocloroso (HClO); producto de la oxidación del cloro (Cl^-) con el H_2O_2 y el peroxinitrito ($ONOO^-$); formado por la reacción entre el O_2^- y óxido nitroso (NO) (31-33). En consecuencia, debido a la formación de las ROS al interior del fagolisosoma se crea un ambiente con alto potencial antimicrobiano por la presencia de las ROS (Figura 1) (31).

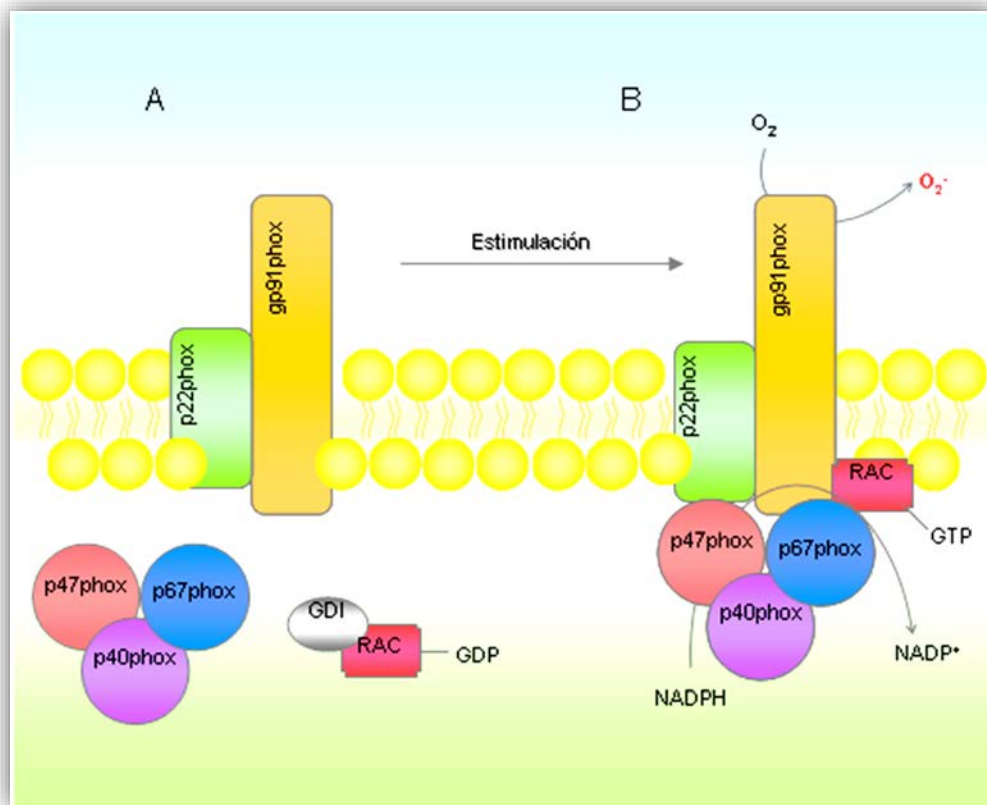


Figura 1. A: En los PMNN en reposo el sistema NADPH oxidasa se encuentra inactivo y las proteínas citosólicas (p47 phox, p67 phox, p40 phox) y RAC se encuentran separadas de las proteínas de membrana gp91 phox y p22 phox. **B:** cuando se presenta un estímulo como un microorganismo, se induce un estado activo del sistema NADPH oxidasa caracterizado por la migración de las proteínas citosólicas hacia la membrana. Lo anterior induce la transferencia de electrones desde el NADPH hacia el fagolisosoma y estos inducen la generación de O₂⁻ y otras ROS a partir del oxígeno molecular. (Modificada de Assari T. Med Immunol. 2006 21;5:4.) (34)

4.3 ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA (EGC)

Cuando se presenta una alteración en alguno de los componentes que hacen parte del sistema NADPH oxidasa, producto de mutaciones que implican una alteración en el gen que codifica para gp91 phox, p22 phox, p47 phox, p67 phox, o p40 phox se produce la Enfermedad Granulomatosa Crónica (EGC). Ésta es una inmunodeficiencia primaria en la cual se presenta una incapacidad en la destrucción de los microorganismos debida a que los neutrófilos no generan superóxido y otras especies

reactivas del oxígeno en los fagosomas intracelulares, aunque realicen quimiotaxis, fagocitosis y degranulación normalmente (8, 11, 35).

Se conoce que los pacientes con EGC pueden presentar infecciones graves a repetición que involucran úlceras crónicas, ganglios linfáticos que drenan y neumonía; además, se pueden afectar otros órganos como hígado, huesos y riñones. Los microorganismos más comúnmente aislados incluyen bacterias especialmente catalasa positiva, como *Staphylococcus aureus* y bacilos Gram-negativos, especies de Nocardia, hongos como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *C. glabrata* y *Pseudallescheria boydii* (36-40). La incidencia mundial de la EGC oscila entre 1 por cada 200 ó 250 mil nacimientos (8) y en América Latina, en estudios realizados en Argentina, Chile, Costa Rica y Uruguay, se estimó una incidencia que está entre 0,72 y 1,26 casos por cada 100 mil nacimientos (41).

La EGC sigue un patrón de herencia que puede estar ligado al cromosoma X, cuando la proteína afectada es la gp91 phox o ser autosómico recesivo en caso que exista alguna alteración en los componentes p47 phox, p22 phox, p67 phox o p40 phox, por lo que se ha establecido una clasificación basada en los defectos moleculares específicos encontrados. El tipo de herencia se define por la letra "A" para los casos autosómicos y "X" para los casos de herencia ligada al sexo. Así mismo, el componente defectuoso del sistema NADPH oxidasa se representa mediante los números "22", "40", "47", "67" o "91" los cuales corresponden a los pesos moleculares de las proteínas afectadas; y los superíndices "0", "+" o "-" representan los niveles de expresión de las proteínas en cuestión, es decir, proteína ausente, presente o de expresión reducida respectivamente (10, 42, 43).

Los tipos de mutaciones que causan la EGC ligada al cromosoma X se asocian con aproximadamente el 70% de los casos (8). El fenotipo X91⁰ es el más frecuente y hace referencia a la ausencia del *flavohemocitocromo b₅₅₈* y actividad NADPH oxidasa nula. El fenotipo X91⁻ es menos frecuente y se refiere a una forma variante de la EGC que se caracteriza por una baja actividad NADPH oxidasa proporcional al nivel de *flavohemocitocromo b₅₅₈* expresado. En el fenotipo X91⁺, el *flavohemocitocromo b₅₅₈* se encuentra en niveles normales, pero su actividad se encuentra disminuida o

ausente. La EGC ligada al cromosoma X se presenta principalmente por deleciones (35,6%), mutaciones con pérdida de sentido “missense” (21,3%), mutaciones sin sentido “nonsense” (14,1%), mutaciones en los sitios de corte y empalme “splicing” (17,6%), inserciones (7,9%), inserción/delección (2,8%) y mutaciones en las regiones promotoras (0,7%) (27).

Las mutaciones autosómicas recesivas corresponden a un 30% de los casos, de las cuales el 20 % se dan por mutaciones en el gen NCF-1, el 5% por mutaciones en el gen CYBA y el otro 5% son por alteraciones en el gen NCF-2 (44-46). Hasta hace algunos años no se conocía bien el papel de la p40 phox dentro del sistema NADPH oxidasa y no se habían reportado mutaciones en el gen que codifica para esta proteína (NCF-4); pero, en 2009 Matute y colabores describieron la primera mutación en un niño de 3 años de edad con colitis granulomatosa en el cual la producción de anión superóxido al interior del fagosoma estaba disminuida (23).

4.4 TRATAMIENTO DE LA EGC

Dado que las infecciones en estos pacientes se presentan a repetición y los PMNN son incapaces de destruir los microorganismos que se encuentran afectando al individuo, el tratamiento consiste principalmente en dar una terapia de sostenimiento con antibióticos como trimetropin/sulfametoxazole y antimicóticos como itraconazol. Al combinar estos tratamientos con IFN γ (50 $\mu\text{g}/\text{m}^2$) con una frecuencia de 3 veces por semana, el riesgo de infecciones graves se reduce hasta en un 70% (47, 48). El mecanismo de acción del IFN γ en estos pacientes aún es desconocido, pero su administración se basa en el efecto que tiene esta citoquina sobre las células fagocíticas, donde se sabe que induce una mayor expresión del complejo NADPH oxidasa con un aumento en la generación de transcritos del gen CYBB (49). Otras alternativas terapéuticas para el manejo de la EGC son la terapia génica o el trasplante de médula ósea que son tratamientos correctivos de la mutación (50, 51).

4.5 TRAMPAS EXTRACELULARES DE LOS NEUTRÓFILOS

En el 2004 fue descrito un nuevo mecanismo microbicida de los neutrófilos llamado Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NET), en el cual se induce la liberación de redes de cromatina en asociación con histonas, proteínas citoplasmáticas, del citoesqueleto o granulares hacia el medio extracelular para atrapar y destruir microorganismos patógenos (52).

En el primer reporte hecho sobre las trampas extracelulares, Brinkmann y colaboradores en 2004 describieron el contenido de las NET utilizando microscopía electrónica de transmisión y microscopía confocal. En sus estudios encontraron que estas redes se componen principalmente de una matriz de ADN con una longitud de 15 a 17 nm sobre la cual se ubican dominios globulares con un diámetro de 25 nm. Así mismo, determinaron que los principales componentes microbicidas son las histonas nucleares (H1, H2A, H2B, H3, H4) y proteínas granulares como elastasa, mieloperoxidasa, catepsina G, lactoferrina, proteínas bactericidas de aumento de la permeabilidad (BPI) y gelatinasa (52). También se ha descrito la presencia de proteínas del citoesqueleto (α -actina, miosina 9, plastina, citoqueratina 10), proteínas del citoplasma (calprotectina, calgrulina), enzimas del peroxisoma (catalasa) y enzimas glicolíticas (α -enolasa, transcetolasa) (53-58).

4.6 NETOSIS

El proceso de liberación de las NET se describe como un proceso que induce la muerte o no del neutrófilo, clasificándose en NETosis lítica y NETosis vital (59-61). La NETosis lítica es aquella donde se libera el ADN mezclado con las diferentes proteínas al medio extracelular a través de la ruptura de la membrana plasmática del neutrófilo (62). Dentro de la NETosis vital se han descrito dos mecanismos: El primero fue descrito en el 2009 por Yousefi y colaboradores quienes reportaron que la estimulación con el factor estimulante de colonia de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y ligandos de

TLR-4 o C5a inducían la liberación NET por neutrófilos viables; estas NET estarían compuestas de ADN mitocondrial y no nuclear (63). Sin embargo, la gran mayoría de artículos reportan la presencia de ADN nuclear e histonas, contradiciendo los resultados de Yousefi, basados en la poca cantidad de mitocondrias presentes en los PMNN, el pequeño tamaño del genoma mitocondrial y por la ausencia de histonas antimicrobianas en estas NET (64). El segundo mecanismo fue descrito por Pilszczek y colaboradores usando *S. aureus*, en este estudio se demostraron que los neutrófilos forman y liberan al medio extracelular vesículas que contienen ADN; las cuales liberan su contenido en forma de red, atrapando y eliminando las bacterias (65).

En otros estudios se describe la NETosis como un mecanismo de muerte celular independiente de apoptosis o necrosis con las siguientes características: (i) La formación de NET se da 10 minutos después de la activación, un tiempo más corto que la presentación de la apoptosis, (ii) Durante la NETosis no ha sido descrita la presencia o activación de caspasas, (iii) No hay fragmentación del ADN y (iv) En el proceso de producción de NET hay pérdida de la integridad de la membrana nuclear mientras que en la necrosis no (53, 66). Sobre el mecanismo molecular que induce la NETosis se conoce que es mediado por el tipo de estímulo y la activación de receptores específicos de los neutrófilos que desencadenan una cascada de señalización en la que intervienen la proteína quinasa C (PKC), la activación del sistema NADPH oxidasa y la formación de ROS, este último paso es indispensable para la liberación de NET (67).

Con respecto a los mecanismos que se presentan en el interior de la célula durante la NETosis se han descrito los siguientes:

- 1. Descondensación de la cromatina:** Se ha evidenciado que la elastasa de los neutrófilos, una serin-proteasa que se encuentra en los gránulos azurófilos o primarios, una vez se inicia un estímulo para la producción de NET, se dirige al núcleo donde degrada las histonas del centro del nucleosoma, lo que permite dicha descondensación. La elastasa también puede actuar en sinergia con la

mieloperoxidasa (MPO) (una hemoproteína lisosomal presente en los gránulos azurófilos) para realizar la descondensación de la cromatina (56, 68, 69).

La citrulinación de las histonas también es un mecanismo importante que participa en la descondensación de la cromatina. La citrulinación consiste en el paso de la arginina a citrulina por acción de una peptidil arginina deaminasa (PAD4). Esta enzima se encarga de la citrulinación de las histonas, que consiste en una reacción en la cual los residuos de arginina se reemplazan por una citrulina, este mecanismo facilita la descondensación de la cromatina (70). Se ha demostrado que la inhibición de PAD4 disminuye la producción de NET, por lo tanto la citrulinación de histonas es un factor importante pero no suficiente para la liberación de NET (64, 71, 72).

2. **Generación de ROS:** La mayoría de compuestos y microorganismos que inducen NET activan el sistema NADPH oxidasa para generar ROS (52). Inhibidores del sistema NADPH oxidasa como el DPI (del inglés *diphenyleneiodonium chloride*) inhiben la liberación de NET luego del estímulo con PMA (del inglés *phorbol myristate acetate*) (53). Así mismo, pacientes con EGC son incapaces de producir NET ante estímulos microbianos o químicos como el PMA, lo que hace a estos individuos más susceptibles de sufrir infecciones crónicas y el desarrollo de granulomas (50). No obstante en los últimos años se ha demostrado que dependiendo del tiempo y tipo de estímulo la liberación de NET puede ser independiente del sistema NADPH oxidasa (65, 69, 73-75).
3. **Autofagia:** Antes de la liberación de las NET hay una masiva vacuolización citoplasmática de los neutrófilos; se cree que esta vacuolización ayuda a la descondensación de la cromatina, pero el mecanismo responsable permanece desconocido (53). Una posible hipótesis de este mecanismo es que las membranas de los retículos endoplásmicos servirían para la formación de los autofagosomas, provocando fugas de Ca^{2+} en este compartimento que permitirían la activación de PAD4 y, por consiguiente, la citrulinación de las histonas; no obstante en individuos con EGC también hay una vacuolización de los neutrófilos luego del estímulo con

PMA, pero sin embargo, no hay descondensación de la cromatina ni citrulinación de histonas (54, 76). Por otra parte, la autofagia en combinación con la producción de ROS son importantes en el bloqueo de las caspasas y por ende la muerte celular por apoptosis, lo cual da paso a la liberación de las NET (76).

4.7 MODELOS DE ESTUDIO PARA EVALUACIÓN DE LAS NET

La producción de NET se ha evaluado utilizando diversos estímulos y diferentes modelos como por ejemplo bacterias, hongos, parásitos y virus (60). En los estudios iniciales realizados por Brinkmann se utilizaron como sustancias activadoras el lipopolisacárido (LPS), el PMA y la interleuquina 8 (IL-8). En dicho estudio también se reportó la producción de NET por parte de los PMNN cuando se utilizaron modelos microbianos como *S. aureus*, *Shigella flexneri* y *Salmonella typhimurium*. En *S. aureus* se observó cómo las NET fueron capaces de degradar la α -hemolisina, mientras que con *S. flexneri* las NET tuvieron actividad sobre el factor de virulencia IpaB. Al adicionar DNAsal o al inhibir farmacológicamente la elastasa en estos neutrófilos, la capacidad microbicida se perdió sugiriendo que la destrucción de los factores de virulencia estaba directamente relacionada con las trampas extracelulares (52).

También se ha demostrado la función de las NET en espiroquetas como *Borrelia burgdorferi*, la causante de la enfermedad de Lyme; *B. burgdorferi* ha desarrollado mecanismos que le permiten evadir la acción microbicida de los neutrófilos, entre ellos la inhibición de la quimiotaxis, fagocitosis y la producción de ROS. Menten y colaboradores en 2012 demostraron que *B. burgdorferi* era atrapada y destruida por acción de las NET; además, no se evidenció producción de nucleasas que le permitieran a la espiroqueta evadir este mecanismo. No obstante encontraron cuerpos redondos (RBs) los cuales son generados por distintas especies de *Borrelia sp* cuando las condiciones no son favorables (77).

A pesar de que las NET tienen alto poder microbicida, algunos microorganismos son capaces de evadir estas redes a través de diferentes mecanismos. Berends y colaboradores en 2012 observaron cómo en infecciones necrotizantes y pulmonares, cepas silvestres de *S. aureus* sintetizaban nucleasas con lo cual se reducía el efecto

microbicida de las NET y de esta forma podrían diseminarse agravando la infección. Por el contrario, al utilizar *in vitro* cepas de *S. aureus* que no expresaban nucleasas, la actividad de las NET permanecía intacta y se producía la destrucción de la bacteria (78). Otras especies bacterianas como *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus* del grupo A, utilizan también las nucleasas para evadir las trampas extracelulares (79); así mismo, las bacterias también pueden evadir las trampas extracelulares gracias a la expresión de la cápsula, que por su carga positiva repelen los péptidos antimicrobianos presentes en las NET (55).

Otros microorganismos no evaden las NET, sino que se benefician de éstas; *Haemophilus Influenzae*, *Mycobacterium abscessus* y *Pseudomonas aeruginosa* utilizan los componentes de las NET para la formación de biopelículas, lo cual les permite resistir al tratamiento y colonizar al hospedero (80, 81). Por otro lado, las proteínas catiónicas presentes en las NET se adhieren a la superficie de *S. flexneri* ocasionando un incremento en la adhesión de la bacteria y un aumento en la invasión de células epiteliales (82).

En modelos con hongos también se ha observado la presencia de NET. Dado que los neutrófilos no pueden fagocitar grandes filamentos utilizan la NETosis como mecanismo de destrucción. Algunos de los estudios se han realizado en *C. albicans*, *Cryptococcus gattii* y diferentes especies de *Aspergillus spp* (83-85). En las NET se ha detectado la presencia de la calprotectina (un heterodímero citoplasmático fijador de calcio, zinc y magnesio, elementos importantes para el crecimiento de hongos), la cual tiene una acción fungicida que permite la eliminación de *C. albicans*, *C. gattii* y *A. fumigatus*. Al hacer la depleción *in vitro* de la calprotectina se pierde la actividad antimicótica, en este caso hay un efecto conjunto entre la calprotectina que actúa como agente microbicida y las NET que atrapan el microorganismo impidiendo su diseminación (57).

En cuanto a los protozoos, el principal modelo de estudio de las NET ha sido el género *Leishmania* incluyendo las especies *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. major*, *L. amazonensis* y *L. donovani* (86-89). En estas especies, la inducción de NET es activada por amastigotes y promastigotes demostrándose que el principal mecanismo

microbicida se encuentra mediado por histonas (87). También se ha estudiado el papel de las NET en la malaria producida por *Plasmodium falciparum*. Es así como en un estudio desarrollado en Nigeria por Baker y colaboradores en 2008, se incluyeron niños menores de 6 años con malaria no complicada por *P. falciparum* y se determinó la presencia de las NET en sangre periférica. El estudio muestra como los trofozoitos del parásito quedan atrapados en estas redes. Sin embargo, no queda claro si en realidad estas estructuras corresponden a NET y si realmente hay destrucción parasitaria a través de este mecanismo (90).

En virus son pocos los estudios en los que se ha investigado el papel de las NET. En el año 2010 Wardini y colaboradores, demostraron que el virus de la leucemia felina afecta la quimiotaxis, la producción de ROS e induce la liberación de NET en PMNN co-estimulados con promastigotes de *Leishmania amazonensis* (86). Luego en 2011, Narasaraju y colaboradores realizaron un estudio con el virus de la Influenza y observaron la presencia de NET en los alvéolos y la inducción de daño pulmonar agudo mediada por este mecanismo (91). Finalmente, en el año 2012, Jenne & Kubes, lograron demostrar que las NET tienen acción directa frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) por medio de la MPO y α -defensina (92).

4.8 ALTERACIONES EN LA PRODUCCIÓN DE NET

Como se ha mencionado anteriormente los PMNN de individuos adultos sanos producen NET como respuesta a un estímulo, al igual que los neonatos a término. Sin embargo, en PMNN de neonatos prematuros hay una inmunodeficiencia fisiológica en la que se presenta un deterioro de la fagocitosis, además de alteraciones en la destrucción de bacterias intracelulares y una disminución en la producción de ROS. Como consecuencia de ello, los PMNN de estos individuos son incapaces de producir NET (93).

También se han reportado defectos en la producción de NET en adultos mayores. En el 2014, Hazeldine y colaboradores realizaron un estudio con PMNN de individuos jóvenes (media de 25 años) e individuos mayores (media de 70 años), donde

demonstraron que la producción de NET en adultos mayores era menor en comparación a la de los individuos jóvenes, luego de que los PMNN fueran pre-activados con TNF- α y luego estimulados con LPS o IL-8. Igualmente evidenciaron que los PMNN de los ancianos producían menos cantidad de ROS en comparación con los individuos jóvenes, por lo tanto, esto podría ser un mecanismo que podría explicar la disminución de las NET en esta población (94).

Otra de las alteraciones que conllevan a un defecto en la producción de NET es la deficiencia de la MPO. Como se ha mencionado, esta enzima participa en la descondensación de la cromatina y participa en la formación de ROS gracias a que cataliza la producción de HClO a través H₂O₂ y Cl⁻. En individuos con deficiencia de MPO no hay producción de NET debido a que no se logra la formación de HClO, este radical oxidante está involucrado en la cloración de las histonas y la posterior descondensación de la cromatina, así como también en la ruptura de la membrana nuclear, lo que permite la salida del ADN hacia el citoplasma donde se mezcla con los gránulos citoplasmáticos para la conformación de las NET (95, 96).

Finalmente, se conoce que las alteraciones en la explosión respiratoria de pacientes con EGC conllevan a un bloqueo en la producción de NET (52, 97) como se explicará en el siguiente apartado.

4.9 NET Y ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA

El papel de las ROS en la inducción de NET ha sido estudiado en los últimos años, demostrando que los PMNN obtenidos de pacientes con EGC no tienen la capacidad de liberar NET. Un ejemplo de esto es el estudio de Fuchs y colaboradores en 2007 donde evidenciaron que al estimular neutrófilos de individuos con EGC con PMA, no se producía NETosis; pero además observaron que dicho efecto se podía revertir al adicionar glucosa oxidasa como fuente productora de H₂O₂ exógeno (53). Igualmente Brinkmann en sus estudios iniciales observó este mismo fenómeno (52). De otro lado, Bianchi y colaboradores en 2011 observaron como un paciente con EGC-X sometido a terapia génica recuperó la actividad del sistema NADPH oxidasa y parcialmente la

producción de NET. La actividad microbicida contra *A. nidulans* y *Candida spp* mejoró notoriamente dado que las NET inhibieron en un 80% la germinación de las conidias y en un 40% el crecimiento de las hifas; estos resultados son concluyentes en cuanto al papel vital que cumplen las ROS y las NET en la inmunidad innata (50, 98).

Se conoce que al tratar con $IFN\gamma$, en los PMNN humanos se induce un aumento en la producción de ROS y en la expresión de genes que responden a dicho estímulo (99). Martinelli y colaboradores en 2004 determinaron el papel del $IFN\gamma$ para la activación de los neutrófilos. Utilizando un ensayo con micromatrices demostraron como los PMNN maduros a diferencia de aquellos en los estadios más inmaduros expresaban una mayor cantidad de genes de respuesta al estímulo con $IFN\gamma$. Igualmente, describieron como los interferones tipo 1 y 2 pre-activaban los PMNN maduros y de esta manera al ser estimulados con el factor del complemento C5a producían NET (100).

Por otra parte, Remijsen y colaboradores en 2011, demostraron como la inducción de NETosis mediante la utilización de PMA se relacionaba con la producción de ROS y con la autofagia, afirmando que ningún mecanismo de forma aislada era capaz de inducir NETosis. Así, la inhibición de la autofagia impide la descondensación de la cromatina e inhibe la NETosis, a pesar de que la producción de O_2^- no se ve afectada, lo cual quiere decir que la actividad del sistema NADPH oxidasa es necesaria pero no suficiente para la inducción de la NETosis. Igualmente demostraron que al inducir autofagia en los PMNN de individuos con alteraciones en la producción de ROS, no se presentaba descondensación de la cromatina, típica de la NETosis (76).

En resumen se han reportado cuatro líneas de evidencia que soportan el papel de las ROS en este mecanismo: [i] Se conoce que el H_2O_2 es un potente inductor de NET en concentraciones fisiológicas. [ii] La inhibición farmacológica del sistema NADPH oxidasa con DPI bloquea la formación de NET, sin embargo, esta acción se puede revertir al inducir la generación de H_2O_2 exógeno por medio de glucosa oxidasa adicionada a los PMNN. [iii] El efecto inductor de NET por medio de H_2O_2 se puede regular negativamente al adicionar catalasa al sistema; este efecto puede ser

restablecido al adicionar un inhibidor de la catalasa (3-amino-1,2,4-triazol), lo cual permite que los PMNN recuperen su capacidad de formar NET. [iv] Se ha demostrado que neutrófilos de individuos con EGC no producen NET (53, 93).

El papel de otras especies reactivas del oxígeno en la formación de NET también se ha demostrado. En el año 2012 Akong-Moore y colaboradores reportaron que la ausencia de cloro (Cl⁻) extracelular (que sirve de sustrato para la MPO) disminuye la producción de NET, mientras que con la adición de HClO se recupera la capacidad de inducir NETosis (95).

Si bien el papel de las ROS es necesario para la NETosis, también se han reportado algunos mecanismos que son independientes de producción de ROS para la liberación de NET. En este sentido, Pilszczek y colaboradores en 2010 describieron como la *Citolisina Panton Valentine Leucocidina* (PVL) de *Staphylococcus aureus* indujo la liberación de NET en un mecanismo independiente de producción de ROS; en este caso se demostró que la liberación del ADN se produce de una forma no lítica, ya que este se almacena temporalmente en vesículas desde el interior del núcleo y de allí se transporta al medio extracelular donde la cromatina se libera y cumple su función microbicida (65). De otro lado, Marcos y colaboradores en 2010 demostraron que la estimulación de PMNN con ligandos de CXCR2 induce la formación de NET un proceso que involucra quinasas de la familia Src pero que es independiente del sistema NADPH oxidasa (101).

También Parker y colaboradores en 2012 demostraron que la ionomicina induce NET independiente del sistema NADPH oxidasa, además, demostraron que los PMNN obtenidos de un paciente con deficiencia de MPO producían NET cuando se estimulan con PMA y *P.aeruginosa*. Con PMA había una disminución en la producción de NET en los PMNN del paciente en comparación con un individuo sano, pero no hubo diferencias en la formación de NET entre las células del individuo sano y las del paciente cuando se estimulaba con *P.aeruginosa*, por tanto concluyen que las NET pueden ser inducidas por diferentes estímulos pero no por un mecanismo común (69).

La producción de NET a través de mecanismos independientes del oxígeno también fue reportada en 2013 por Byrd y colaboradores en un modelo de *Candida albicans*. En este estudio se demostró como el reconocimiento del β -glucano a través del receptor CR3 conlleva a una rápida liberación de NET (antes de 30 minutos) siempre y cuando los neutrófilos estén en contacto con el β -glucano y componentes de la matriz extracelular (73).

Finalmente en el 2014, Arai y colaboradores investigaron el efecto del ácido úrico en la formación de NET. Encontraron que bajas concentraciones de ROS inhiben la formación de NET dependiente del sistema NADPH oxidasa; sin embargo, altas concentraciones de ácido úrico más que inhibir las NET inducían su formación de una manera independiente de NADPH oxidasa, este hallazgo fue confirmado cuando se realizaron los experimentos con PMNN de pacientes con EGC (74).

Teniendo en cuenta que diferentes estudios reportan la ausencia de producción de NET en los pacientes con EGC debido a su incapacidad para producir ROS (50, 52, 53, 76, 102) y que en algunos de estos pacientes el tratamiento con IFN γ induce una mejora clínica (48, 99, 103), nos propusimos investigar cual era el efecto de esta citoquina sobre la producción de NET en PMNN en estos pacientes y en individuos sanos. Adicionalmente, evaluamos la liberación de NET a través de una vía independiente del oxígeno estimulando las células con ionomicina y finalmente evaluamos si había NETosis tratando las células con LPS, un estímulo bacteriano al cual los pacientes se ven enfrentados constantemente debido a sus infecciones a repetición.

5 HIPÓTESIS

El $\text{IFN}\gamma$ induce la formación de NET en PMNN de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo General:

Evaluar el efecto del IFN γ sobre la producción de NET en células de pacientes con EGC.

6.2 Objetivos Específicos:

1. Evaluar la formación de NET *in-vitro* en neutrófilos de pacientes con EGC antes y después de la estimulación con IFN γ .
2. Determinar si existe un efecto dosis dependiente en la concentración de IFN γ para producir NET en neutrófilos de pacientes con EGC.
3. Evaluar la formación de NET en neutrófilos de pacientes con EGC mediante un mecanismo independiente del oxígeno.
4. Evaluar la formación de NET en neutrófilos inducida por LPS y su modulación por IFN γ en pacientes con EGC.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 MUESTRA DE ESTUDIO

Los pacientes evaluados en este estudio fueron incluidos a través del servicio de asistencia del Grupo de Inmunodeficiencias Primarias con diagnóstico bioquímico de Enfermedad Granulomatosa Crónica y ya venían recibiendo el esquema de tratamiento con IFN γ , accedieron de forma voluntaria, mediante la firma de un consentimiento informado aprobado previamente por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. Los experimentos fueron realizados de acuerdo con las recomendaciones de la declaración de Helsinki, el informe de Belmont y la resolución Nacional 8430 de 1993 del ministerio de salud título II artículo 11.

7.2 PURIFICACIÓN DE NEUTRÓFILOS

La obtención de células se hizo a partir de sangre venosa periférica tomada en tubos con EDTA. Los neutrófilos fueron purificados por gradiente de densidad por medio del estuche comercial (Polymorphprep™ AXIS-SHIELD, Norway). Para este procedimiento se adicionaron en un tubo de 15 mL, 4 mL del Polymorphprep, posteriormente se agregaron 4 mL de sangre lentamente por la pared del tubo en una relación 1:1. La mezcla se centrifugó a 500g por 40 min a temperatura ambiente, con freno y aceleración de 1. Posteriormente, se separó la capa de neutrófilos de acuerdo a las indicaciones del fabricante y se llevaron a un tubo nuevo de 15 mL. Las células se lavaron con buffer HBSS a 400g por 10 min. Luego se descartó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de RPMI. A partir de esta solución se determinó la viabilidad celular para realizar los diferentes procedimientos.

7.3 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

Para la medición de la producción de especies reactivas del oxígeno fueron incluidos un total de 10 individuos sanos y 4 pacientes con EGC. La medición de la explosión respiratoria de los neutrófilos se hizo a través de citometría de flujo mediante la técnica de oxidación de la dihidrorrodamina 123 (DHR) (104). Mediante esta técnica es posible determinar la cantidad de ROS producida en las células. Cuando los PMNN se encuentran sin estímulo hay una intensidad media de la fluorescencia disminuida que corresponde a los niveles basales de producción de ROS; sin embargo, cuando las células son estimuladas, en este caso con PMA 50 nM, hay un aumento en la producción de ROS ya que se oxida la DHR 1,2,3 y se transforma en la molécula rodamina 1,2,3 que es fluorescente y por tanto hay un aumento en la intensidad media de la fluorescencia (IMF).

Este procedimiento se hizo a partir de 400.000 neutrófilos, los cuales se incubaron en tubos de citometría con $\text{IFN}\gamma$ 100 UI/mL durante dos horas. Pasado este tiempo se agregaron 400 μL de la solución que contenía buffer HBSS, 3,6 μL de DHR 29mM (Invitrogen, Eugene, OR) y 10 μL de una solución de catalasa (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma, St. Louis, MO) y se incubó a 37°C por 5 min. Para la activación de las células se usaron 10 μL de PMA a una concentración final 50nM (Sigma) y se incubó nuevamente por 14 min a 37°C. La determinación de la fluorescencia generada por la oxidación de la DHR 123, se realizó en un citómetro de flujo FACSCanto (Becton Dickinson, BD, San Jose, CA).

7.4 CUANTIFICACIÓN DEL ADN EXTRACELULAR

La cuantificación de la liberación de ADN de los neutrófilos hacia el medio extracelular se hizo a través de fluorimetría en 9 individuos sanos y 4 pacientes con EGC. Los ensayos se realizaron en platos oscuros de 96 pozos (Greiner bio-one). Para los

ensayos fueron cultivadas 200.000 células por pozo, de los individuos sanos y pacientes. Los estímulos utilizados para determinar la producción de NET fueron: PMA 50 nM (Sigma), ionomicina 5 µg/mL (Sigma) y LPS 0127:B8 5 µg/mL (Sigma). Las células fueron incubadas con cada estímulo por 3 horas a 37°C.

Con el fin de determinar el efecto del IFN γ en la producción de NET, los PMNN de controles y de pacientes fueron incubados con esta citoquina en dos concentraciones diferentes (100 UI/mL o 250 UI/mL). La incubación se hizo durante 2 horas para pre-activar las células y posteriormente las células fueron tratadas durante 3 horas con PMA, Ionomicina o LPS a las concentraciones indicadas. Con el fin de verificar que las células estaban liberando ADN extracelular, se utilizó como control la DNAsal 100 UI/mL (Thermo Scientific). Luego de la incubación se agregó en cada pozo Sytox Green 2,5 uM por 30 minutos. La lectura se hizo en un espectrofluorómetro (Spectra Max Gemini – Molecular devices) y para la detección de la fluorescencia se utilizó una longitud de onda 485/535 nm.

7.5 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La liberación de NET se observó mediante microscopia de fluorescencia (microscopio invertido Axio Vert.A1 – Carl Zeiss). El ensayo se realizó en platos de 24 pozos, en cada uno de los pozos se colocó una laminilla redonda (Cover slip round 12mm diameter chemglass) y sobre ella se adicionaron 250.000 células, las cuales estaban diluidas en RPMI. Para inducir la adhesión de los neutrófilos a las laminillas, éstos fueron incubados a 37°C durante 30 min; posteriormente se adicionó el IFN γ a una concentración de 100 UI/mL o 250 UI/mL y se incubaron nuevamente durante dos horas. Finalmente se les adicionaron los estímulos: PMA 50 nM, ionomicina 5 µg/mL o LPS 5 µg/mL y se incubaron durante 3 horas. Adicionalmente, se realizó un control positivo con DNAsal 100 UI/mL. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y almacenadas a 4°C hasta el momento de la tinción.

Previo al proceso de la tinción celular las células fueron lavadas con PBS para eliminar los restos de paraformaldehído. Posteriormente, los neutrófilos fueron permeabilizados con Triton X-100 al 0,5% por 5 min. Se hizo un bloqueo con suero bovino fetal al 10 % durante 1 hora. Como marcador de la producción de NET se utilizó un anticuerpo anti-elastasa (Abcam ab21595) en una dilución 1:250, y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Se utilizaron anticuerpos secundarios anti-rabbit (Sigma) acoplados a Alexa fluor 488 en una dilución 1:500 e incubados por 1 hora a temperatura ambiente y protegidos de la luz. El ADN fue teñido con Hoeschst (H-3570 Life technologies). Finalmente, las laminillas se colocaron sobre portaláminas que contenían una gota de FluorSave™ Reagent (Cat 345789 CALBIOCHEM), para la conservación de las placas.

7.6 CUANTIFICACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE NET MEDIANTE ANÁLISIS DE IMÁGENES

La determinación de la formación de trampas extracelulares en los PMNN a través de imágenes se realizó de acuerdo a la metodología de Mejía y colaboradores (105). Para la cuantificación se hicieron capturas fotográficas de diferentes campos de observación con un objetivo de 20X. A partir de estas imágenes se cuantificó la fluorescencia total presente en cada campo, posteriormente se seleccionaron las NET individualmente y de la sumatoria de las mismas se calculó el porcentaje de área de las NET. El análisis se hizo a través del software ImageJ version 1.48. Los datos obtenidos fueron almacenados en el programa Microsoft Excel 2010 y posteriormente analizados con el software Graphpad Prism 6.

7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos fueron realizados en el programa Graphpad Prism 6. Después de hacer las pruebas de normalidad estadística los resultados de la citometría de flujo y la fluorometría se analizaron mediante T-test pareado o test de Wilcoxon mientras

que los análisis de imágenes se evaluaron con T-test o *Mann-Whitney* según la prueba de normalidad, teniendo en cuenta una $p < 0,01$.

8 RESULTADOS

8.1 PRODUCCIÓN DE NET EN PACIENTES CON EGC

8.1.0.1 Producción de NET después de la estimulación con PMA

En este trabajo se estudió la producción de trampas extracelulares de neutrófilos mediante un mecanismo dependiente de la producción de ROS. Para esto las células fueron estimuladas durante 3 horas con PMA 50 nM, el cual es un potente inductor de la explosión respiratoria en PMNN. Las células sin estímulo se observaron con la morfología típica del neutrófilo, con su núcleo multilobulado tanto en pacientes como en individuos sanos (Fig. 2). Luego del estímulo con PMA, en los pacientes con EGC se observó una producción de NET muy baja en comparación con individuos sanos y esto se pudo determinar mediante microscopía de fluorescencia (Fig. 3).

Como marcador para la identificación de las NET se utilizó un anticuerpo anti-elastasa. Como se mencionó anteriormente, la elastasa es una proteasa que se ubica en los gránulos primarios de los PMNN y es liberada de la célula durante procesos inflamatorios para la eliminación de microorganismos. Cuando los PMNN se encuentran en reposo, la elastasa se puede observar en el citoplasma, alrededor del núcleo (Fig. 4); una vez la célula es estimulada, en este caso con PMA, la cromatina se descondensa y se mezcla con el contenido citoplasmático, incluyendo la elastasa, así cuando el ADN es expulsado al exterior de la célula en forma de NET, la elastasa sigue el mismo patrón del ADN. De esta forma fue posible evidenciar que a pesar que la liberación de cromatina hacia el medio extracelular era menor en los pacientes con EGC, efectivamente esas estructuras correspondían a NET (Fig. 4).

Con el fin de cuantificar las imágenes tomadas a través de la microscopía de fluorescencia se realizó un análisis de imágenes a través del software ImageJ, la cual fue una de las herramientas, además de la fluorimetría, para la medición de la liberación de las NET. En nuestro estudio hicimos un análisis de 10 diferentes imágenes tomadas al azar a partir de cada estímulo, tanto en el control como en los pacientes y a partir de los datos obtenidos se calculó el porcentaje de área ocupado por las NET.

El porcentaje de área de las NET en las células de los pacientes estimuladas con PMA fue muy bajo en comparación con las células del control sano; sin embargo, al comparar las células sin estímulo con respecto a las células estimuladas con PMA encontramos una diferencia significativa en la producción de NET tanto en individuos sanos como en los pacientes 1, 2 y 3 (Fig. 5).

Adicionalmente, se realizó la cuantificación de la liberación del ADN a través de fluorimetría. Con esta metodología es posible dar un valor semicuantitativo de la cantidad de ADN extracelular en unidades de fluorescencia relativa (UFR). Después de 3 horas de estimulación con PMA, en los individuos sanos se observó un aumento significativo en las UFR con respecto a las células sin estímulo. Es de resaltar que la liberación de ADN de las células estimuladas de los pacientes está disminuida al compararla con las células de los individuos sanos (Fig. 6).

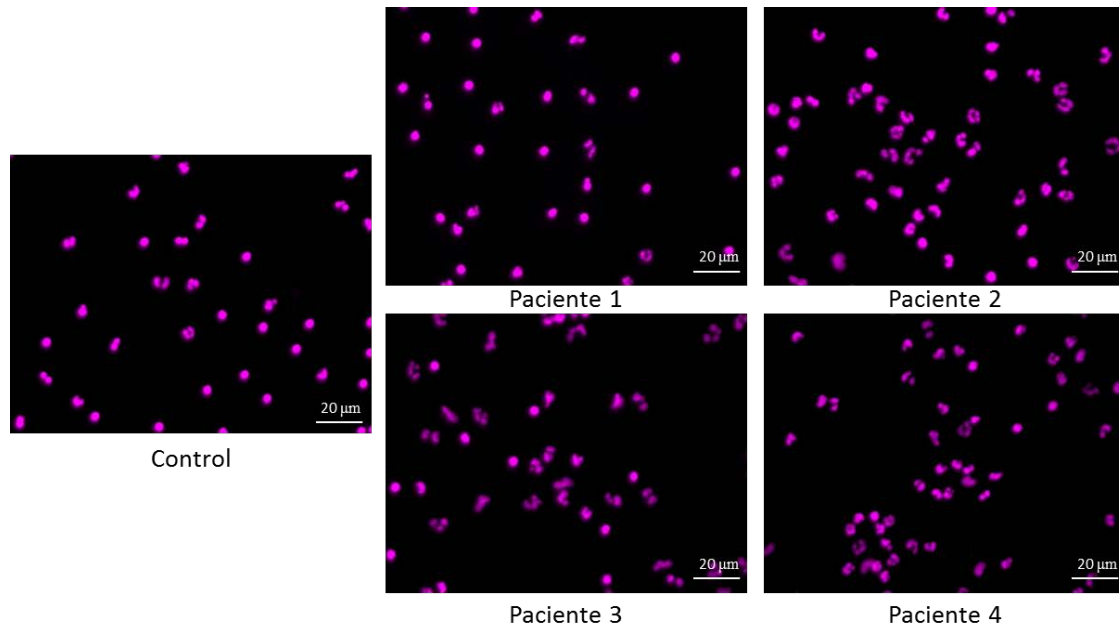


Figura 2. Microscopía de fluorescencia en neutrófilos de individuos sanos y pacientes con EGC. Células de un individuo sano (control) y 4 pacientes con EGC sin estímulo fueron teñidas con Hoeschst. Después de 3 horas las células mostraron la morfología típica de los neutrófilos. Las imágenes fueron tomadas en un aumento de 63X.

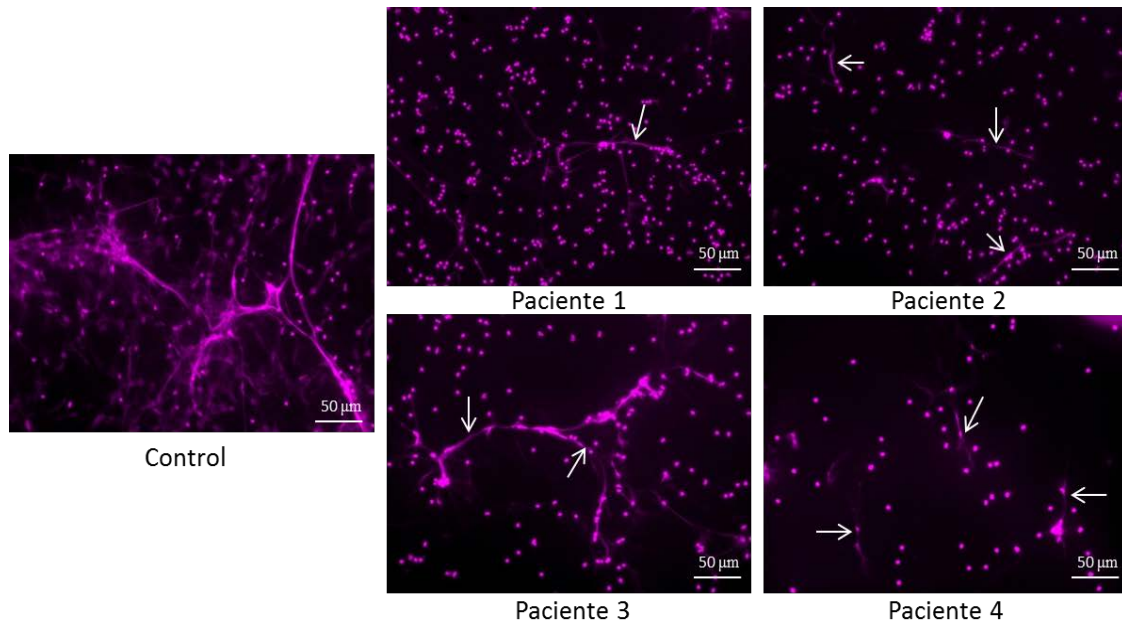


Figura 3. Microscopía de fluorescencia en neutrófilos de individuos sanos y pacientes con EGC estimulados con PMA. En la Figura se presentan las células de un individuo sano (control) y los pacientes incluidos en el estudio, los PMNN fueron teñidos con Hoeschst. Después de 3 horas de estimulación con PMA 50 nM las células del control se observan con una alta producción de NET con respecto a los pacientes, sin embargo los PMNN de los pacientes liberan una baja cantidad de NET. Las imágenes son representativas del total de los campos vistos. Las flechas en las imágenes corresponden a las NET. Las imágenes fueron tomadas en un aumento de 20X.

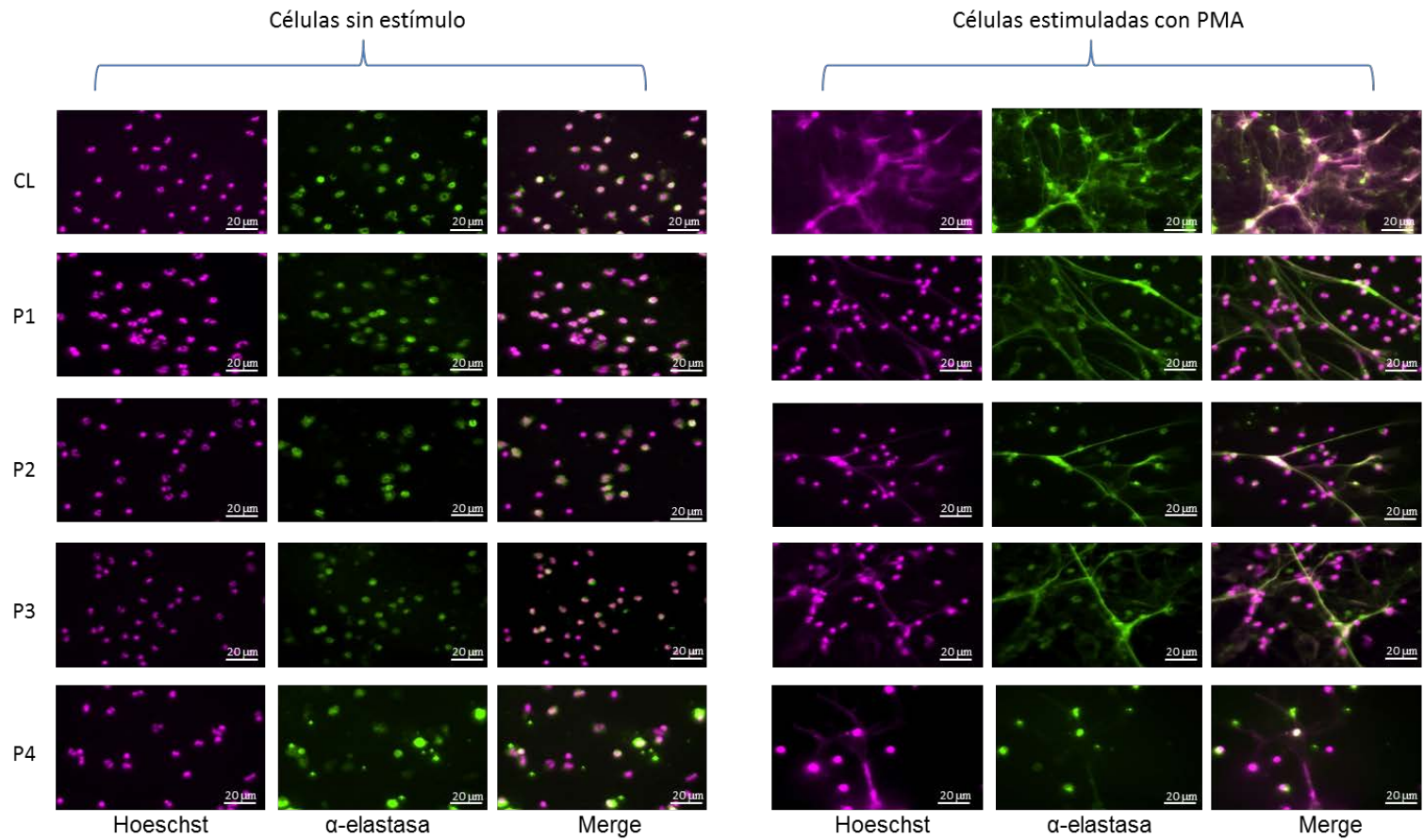


Figura 4: Identificación de NET mediante anticuerpos anti-elastasa en neutrófilos estimulados con PMA. Después de 3 horas de estímulo con PMA 50 nM se observa liberación de NET en las células de los pacientes con EGC. La primera columna corresponde a las células teñidas con Hoeschst (violeta) el cual tiñe el ADN. La segunda columna corresponde a células marcadas con el anticuerpo anti-elastasa acoplado a Alexafluor 488 (verde). La última corresponde a la superposición de las imágenes y allí se puede observar que el anticuerpo anti-elastasa sigue el mismo patrón que el ADN lo cual es característico de las NET. Las imágenes fueron tomadas en un aumento de 63X.

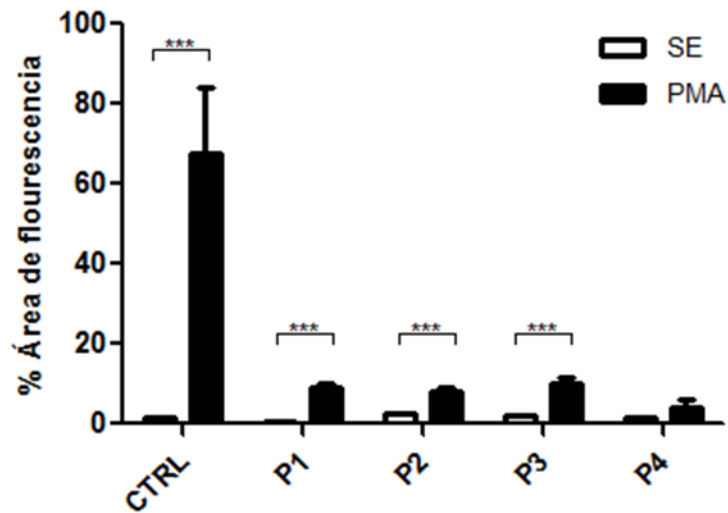


Figura 5: Determinación de la formación de NET a través de la cuantificación del porcentaje de área de fluorescencia. Después de 3 horas de estimulación de los PMNN con PMA 50 nM, se tomaron 10 imágenes de diferentes campos de observación en un aumento de 20X y a partir de estas imágenes se determinó el porcentaje de área de fluorescencia. La gráfica muestra un incremento estadísticamente significativo en la liberación de NET tanto en el individuo sano (control) como en los pacientes 1, 2 y 3, sin embargo al comparar cada uno de los pacientes con el individuo sano (control) la producción de NET es menor. $p < 0,0001$ (***). SE: Células sin estímulo, PMA: Células estimuladas con PMA, P1-P4: Pacientes 1 a 4, CTRL: Control

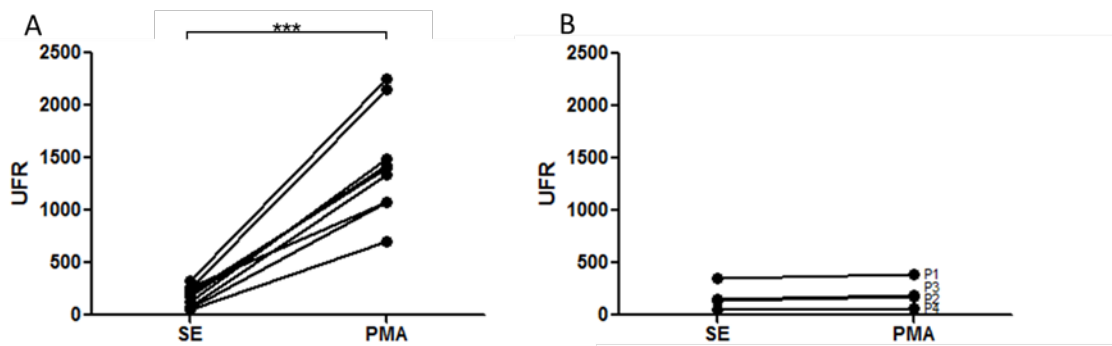


Figura 6: Cuantificación de la liberación de ADN mediante fluorimetría. En la gráfica se observan las UFR después de la estimulación de los neutrófilos con PMA 50 nM durante 3 horas. **A.** En las células de individuos sanos (controles) se observó un aumento en la producción de NET cuando son estimulados con PMA en relación a las células sin estímulo. **B.** En los pacientes hubo una baja producción de NET con respecto a los individuos sanos (controles). El ADN fue teñido con Sytox Green 2.5 μ M y leído en un rango de excitación/emisión de 485/535 nm. $p < 0,0001$ (***). UFR: unidades de fluorescencia relativa

8.2 EFECTO DEL IFN γ EN LA PRODUCCIÓN DE NET

8.2.0.1 Medición de la explosión respiratoria en neutrófilos de pacientes con EGC mediante citometría de flujo.

La explosión respiratoria DHR se midió a través de la intensidad media de la fluorescencia (IMF) y el índice de estimulación (IE). Este índice se obtiene de dividir la IMF de las células estimuladas con la IMF de las células sin estímulo. Mediante el análisis por citometría de flujo, observamos que en los individuos sanos hubo aumento estadísticamente significativo de la producción de especies reactivas del oxígeno cuando se hace una pre-estimulación de los neutrófilos con IFN γ 100 UI/mL y posterior activación con PMA 50 nM, comparado con los neutrófilos tratados solamente con PMA 50 nM (Fig. 7A). En los pacientes hay una tendencia al aumento, cuando se hace la pre-activación con IFN γ 100 UI/mL y estimulación con PMA 50 nM, no obstante al comparar la producción de ROS de los pacientes con los individuos sanos se puede concluir que hay una disminución en la explosión respiratoria (Fig. 7B). Los datos de las citometrías de flujo se encuentran consignados en la tabla 2 y en esta se observa el aumento en la producción de ROS en los PMNN que fueron tratadas con IFN γ 100 UI/mL + PMA 50 nM, con respecto a las células que solo fueron tratadas con PMA 50 nM.

La Figura 8 es una gráfica representativa del comportamiento de las células de un individuo sano (control) y un paciente con EGC estimuladas con PMA 50 nM. Se observa que en las células sin estímulo hay una IMF baja, lo cual corresponde a los niveles basales de producción de ROS en los PMNN, tanto en el paciente como en el individuo sano (Fig. 8A), pero cuando las células son estimuladas con PMA 50 nM hay un aumento significativo en la producción de ROS en el individuo sano (Fig. 8B). El paciente muestra un leve aumento en la IMF con respecto a las células sin estímulo, sin embargo al comparar este valor con el control, la IMF es muy baja (Fig. 8B, Tabla 2). El IFN γ por sí solo no induce la producción de especies reactivas del oxígeno (Fig. 8C), pero al hacer la pre-activación con IFN γ 100 UI/mL y posterior estimulación con

PMA hubo un aumento en la IMF con respecto a las células que solo fueron tratadas con PMA tanto en pacientes como en individuos sanos (Fig. 8D, Tabla 2).

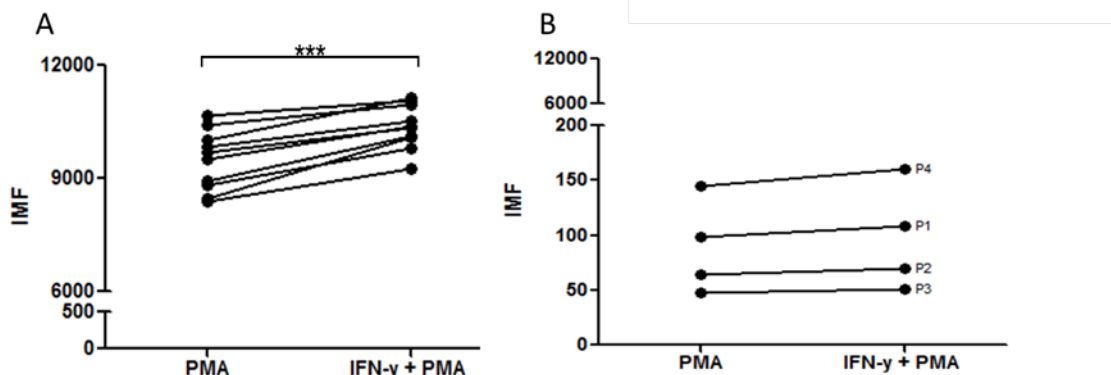


Figura 7. Explosión respiratoria de los PMNN estimulados con PMA 50 nM con respecto a neutrófilos pre-activados con IFN γ 100 UI/mL y estimulados con PMA 50 nM. A: PMNN de individuos sanos en los que se observa un aumento estadísticamente significativo cuando los neutrófilos son tratados con IFN γ 100 UI/mL + PMA 50 nM. **B:** PMNN de pacientes con EGC, en este caso se observa un leve incremento liberación de ROS en todos los pacientes tratados con IFN γ 100 UI/mL + PMA 50 nM. $p < 0.0001$ (***)

Tabla 2. Citometría de flujo por DHR de pacientes e individuos sanos

	Individuos Sanos (n=10)		Pacientes con EGC (n=4)	
	Índice de estimulación	IMF	Índice de estimulación	IMF
PMNN sin estímulo	1	86.80	1	48
PMNN + IFN γ 100 UI/mL	1,11	95.20	1,03	48,75
PMNN + PMA 50 nM	127,05	9476.6	1,83	89
PMNN + IFN γ 100 UI/mL + PMA 50 nM	139,7	10369,6	2,01	97,25

Tabla 2. Índice de estimulación e IMF de pacientes e individuos sanos. En ambos casos se observa el aumento en la producción de ROS en los PMNN que fueron tratados con IFN γ 100 UI/mL + PMA 50 nM, con respecto a las células que solo fueron tratadas con PMA 50 nM. El índice de estimulación es el resultado de la división de la IMF de las células estimuladas sobre las células sin estímulo.

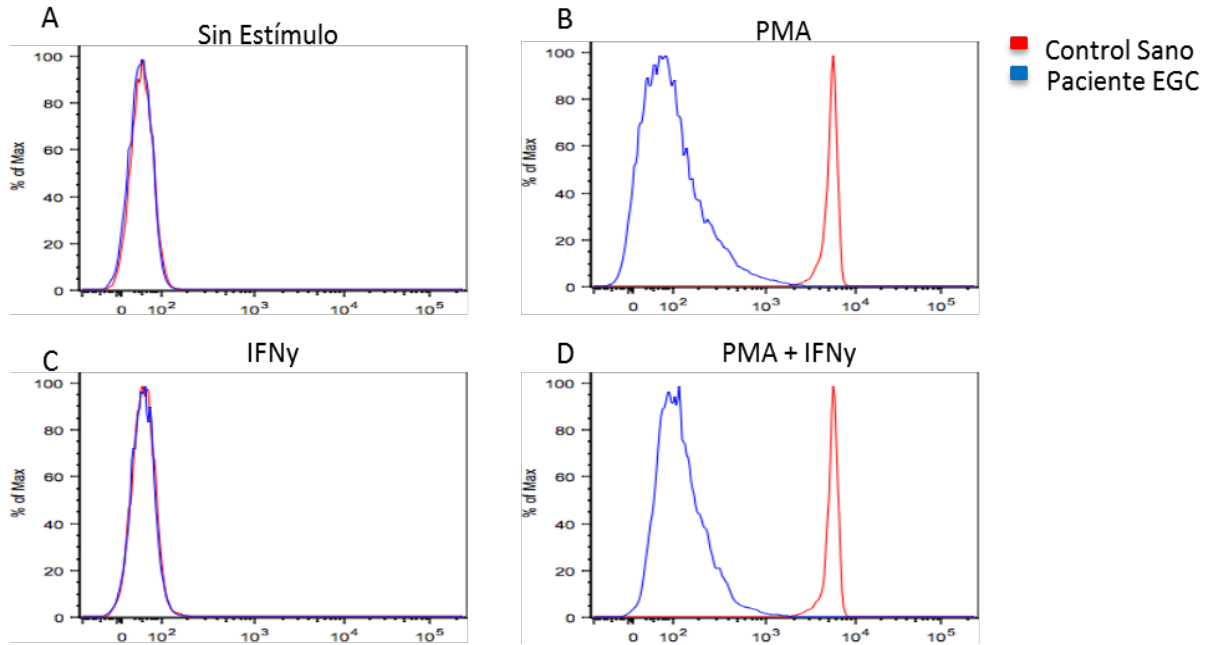


Figura 8. Gráfica representativa del comportamiento de los PMNN de pacientes con EGC y los individuos sanos en una citometría de flujo con dihidrorodamina (DHR). Los histogramas corresponden a la población de neutrófilos de un paciente con EGC (línea azul) y un individuo sano (línea roja). La estimulación de las células con PMA 50 nM genera un incremento en la intensidad media de la fluorescencia en la población de neutrófilos que producen ROS. **A. Sin estímulo:** IMF en individuo sano y paciente con EGC. **B. PMA:** Hay un incremento en la intensidad media de la fluorescencia del individuo sano mientras que en el paciente con EGC se observa la deficiencia en la actividad oxidativa de los neutrófilos confirmando así el diagnóstico de EGC. **C. IFN γ :** El IFN γ por sí solo no aumenta la explosión respiratoria tanto en individuos sanos como en los pacientes con EGC. **D. PMA + IFN γ :** La pre-activación con IFN γ y posterior estimulación aumenta levemente la producción de ROS tanto en pacientes como individuos sanos

8.2.0.2 Efecto del IFN γ en la producción de NET

Teniendo en cuenta los reportes que indican que el IFN γ tiene un efecto sobre los PMNN de pacientes con EGC induciendo una mayor producción de ROS, estudiamos este efecto sobre la producción de las NET en individuos sanos y pacientes.

En individuos sanos se observó una alta producción de NET cuando las células fueron estimuladas con PMA 50 nM, igualmente después de la pre-activación con IFN γ 100 UI/mL o 250 UI/mL y posterior activación con PMA 50 nM, la liberación de ADN no presentó ninguna variación (Fig. 9). En los pacientes 1, 2 y 4 después de la pre-activación con IFN γ 100 UI/mL y la estimulación con PMA 50 nM se observó un leve aumento en la producción de NET tanto para la concentración de 100 UI/mL y la de 250 UI/mL (Fig. 10, 11 y 13). En el paciente 3 cuando se comparan las imágenes no se observó diferencia en la liberación de ADN después de la pre-activación con interferón en las concentraciones de 100 UI/mL y la de 250 UI/mL (Fig. 12). Tanto en las células de pacientes como en los PMNN, el ADN fue degradado por la DNAsal lo que confirmó que efectivamente las estructuras que observamos correspondían a NET (Fig. 9 – Fig. 14).

Al observar el porcentaje de área de las NET cuando las células fueron pre-estimuladas con IFN γ 100 UI/mL o IFN γ 250 UI/mL y activadas con PMA 50 nM se observan diferencias estadísticamente significativas con respecto a los PMNN que solo están estimulados con PMA 50 nM, estas diferencias se evidencian en los pacientes 1, 2 y 4 (Fig. 14). Teniendo en cuenta que uno de nuestros objetivos era evaluar si había efecto dosis dependiente en la concentración de IFN γ para la producción de NET en los PMNN de pacientes con EGC, comparamos la liberación de ADN después de la pre-activación con IFN γ 100 UI/mL o 250 UI/mL y no encontramos diferencias estadísticamente significativas (Fig. 14).

En relación a la cuantificación del ADN extracelular mediante fluorimetría no se observaron cambios significativos en los PMNN de individuos sanos pre-activados con IFN γ 100 UI/mL o 250 UI/mL y posteriormente estimulados con PMA 50 nM, comparado con las células que solo fueron tratadas con PMA 50 nM (Fig. 15A). La

cuantificación de la producción de NET mediante fluorimetría no reveló cambios en las células pre-activadas con IFN γ 100 UI/mL o IFN γ 250 UI/mL (Fig. 15B).

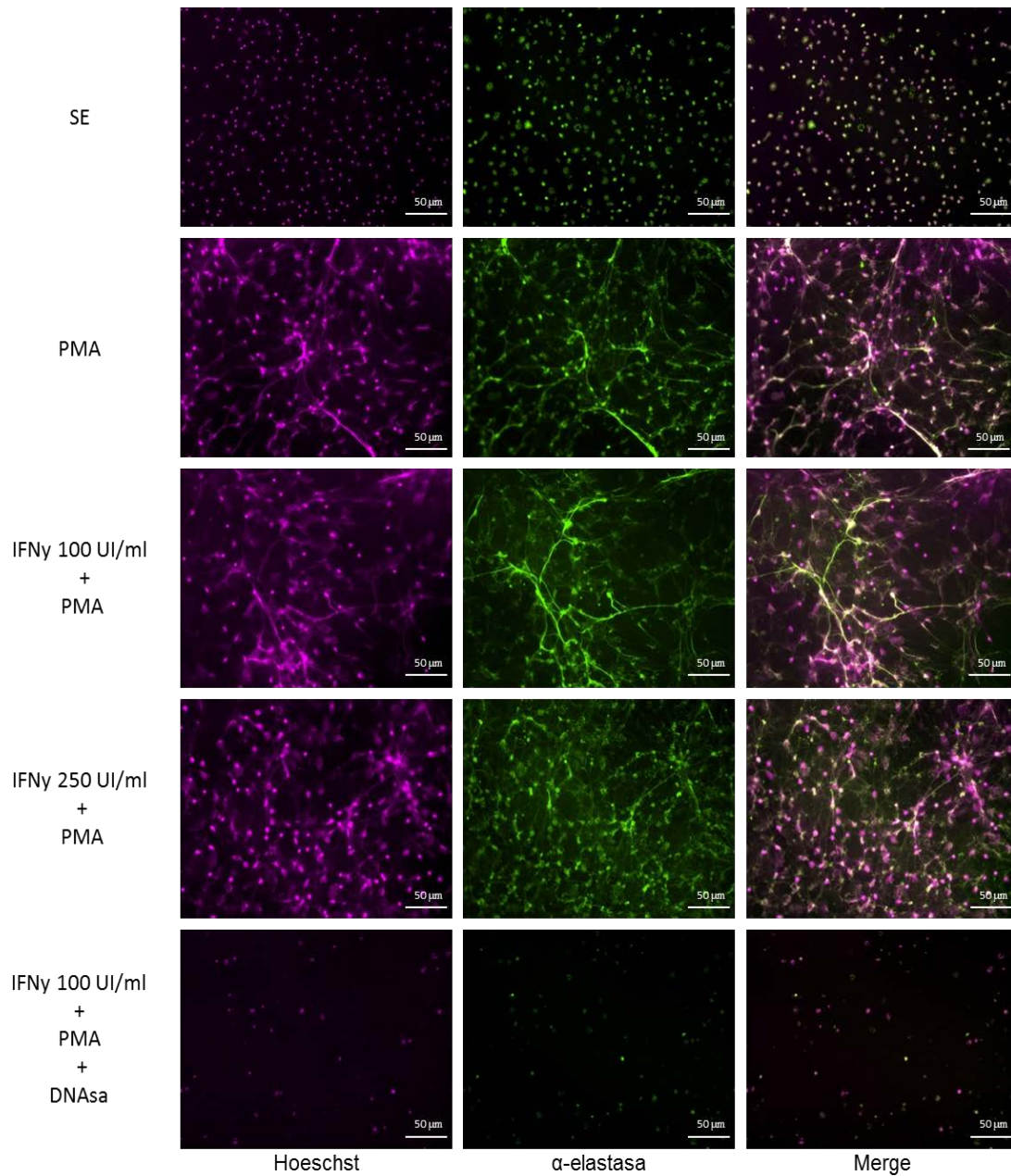


Figura 9. Producción de NET en un Individuo sano. Los PMNN fueron pre-activados a concentraciones de IFN γ 100 UI/mL o 250 UI/mL seguido de la activación con PMA 50 nM. En la imagen se observa una alta producción de NET tanto en las células que están pre-activadas con IFN γ como en las que no lo están, por lo cual no hay diferencias en la producción de NET. El ADN liberado por las células es degradado por acción de la DNAsa. Las imágenes fueron tomadas en un aumento de 20X.

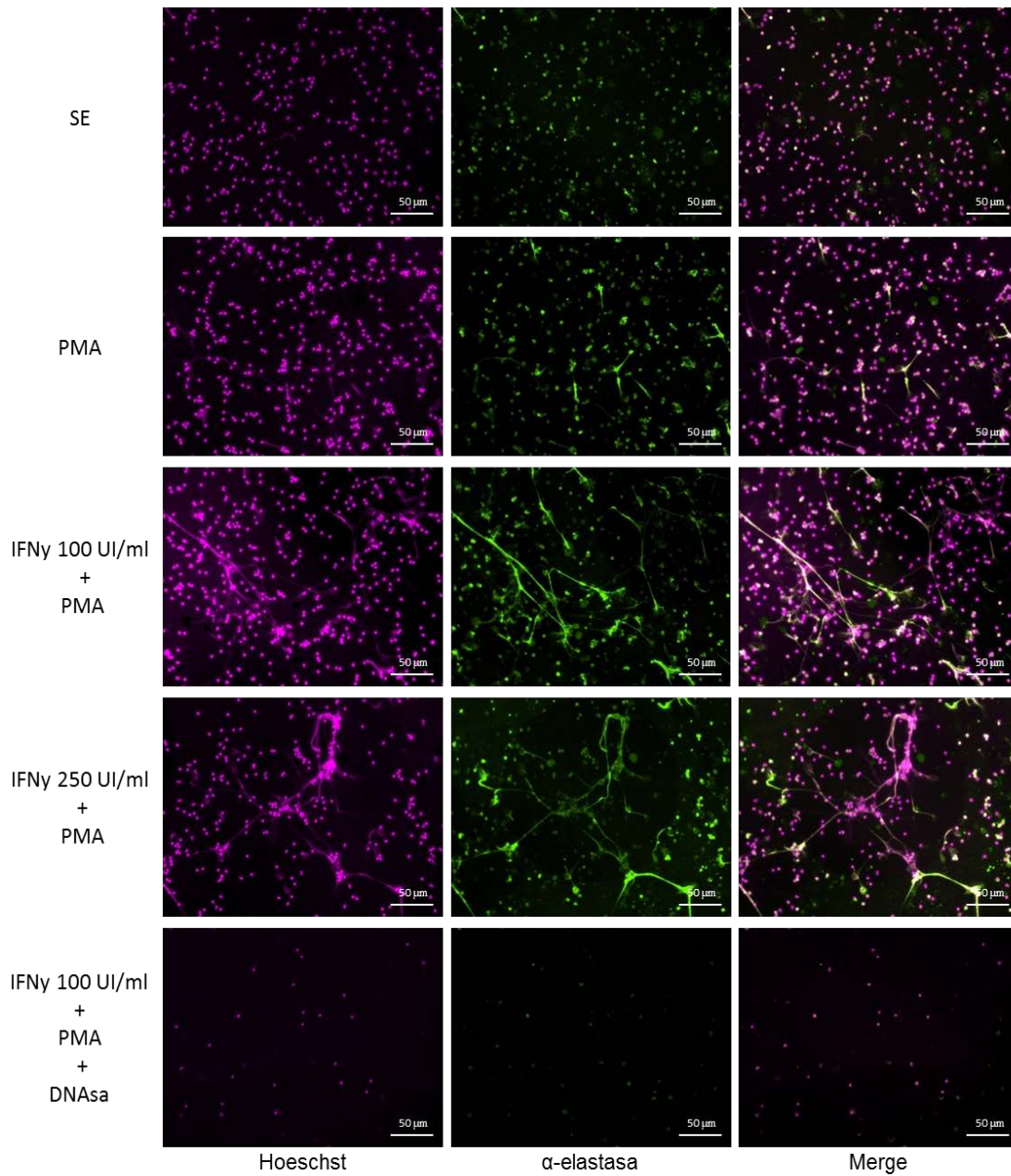


Figura 10. Producción de NET en el paciente 1 después de la pre-activación con IFN γ y posterior activación con PMA. Los PMNN fueron pre-activados a concentraciones de IFN γ 100 UI/mL o 250 UI/mL seguido de la activación con PMA 50 nM. Al hacer la pre-activación con IFN γ 100 UI/mL o 250 UI/mL hay un leve incremento en la liberación de ADN. El ADN liberado por las células es degradado por acción de la DNAsa. Las imágenes fueron tomadas en un aumento de 20X.

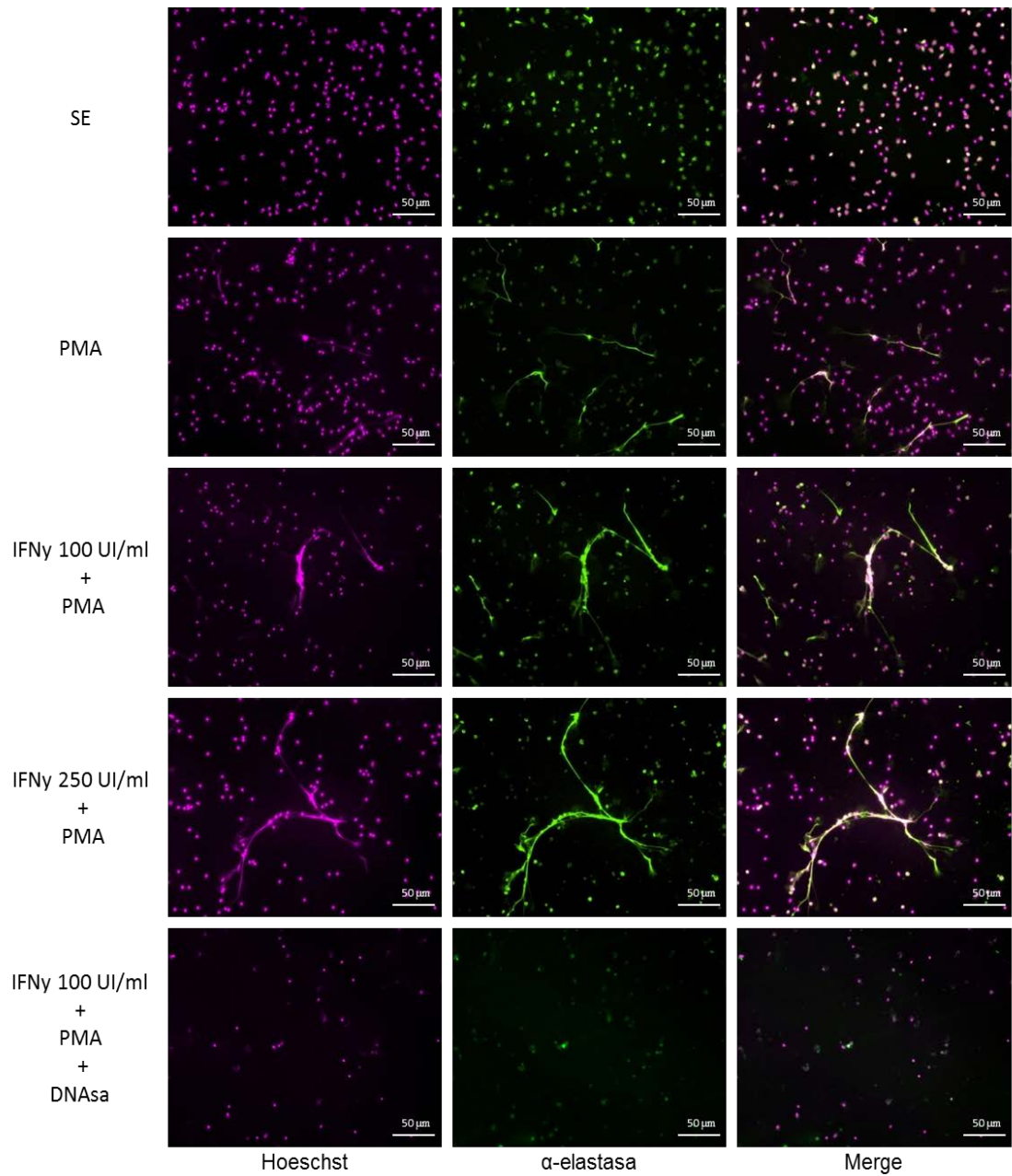


Figura 11. Producción de NET en el paciente 2 después de la pre-activación con IFN γ y posterior activación con PMA. En este paciente se observó una baja producción de NET en las células estimuladas con PMA 50 nM. Al hacer la pre-activación con IFN γ 100 UI/mL o 250 UI/mL hay un leve incremento en la liberación de ADN. El ADN liberado por las células es degradado por acción de la DNAsa. Las imágenes fueron tomadas en un aumento de 20X.

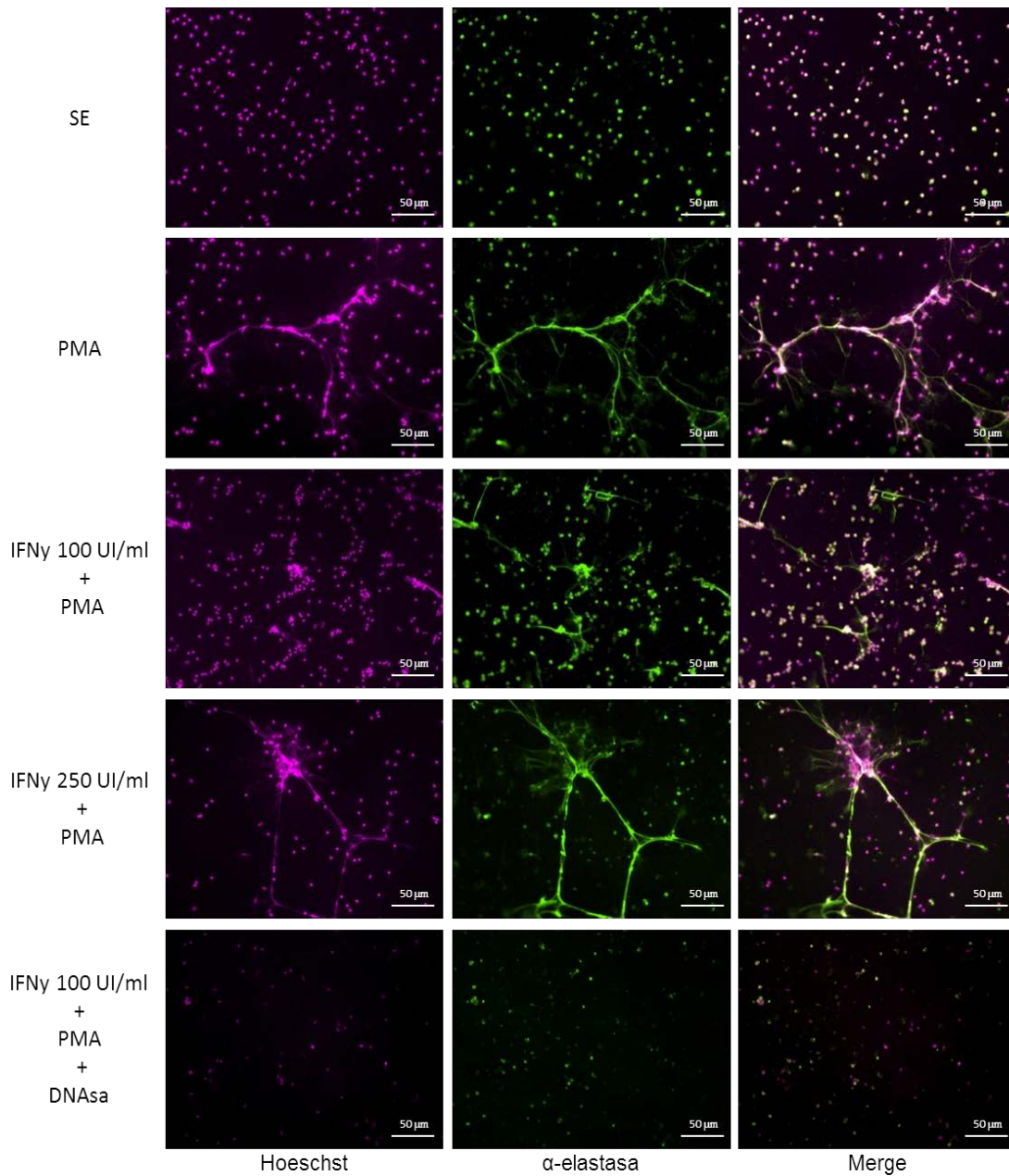


Figura 12. Producción de NET en el paciente 3 después de la pre-activación con IFN γ y posterior activación con PMA. En este paciente se observó producción de NET similar en las células estimuladas con PMA 50 nM con respecto a las células que fueron pre-activadas con IFN γ 100 UI/mL o 250 UI/mL y posteriormente tratadas con el PMA. El ADN liberado por las células es degradado por acción de la DNAsa. Las imágenes fueron tomadas en un aumento de 20X.

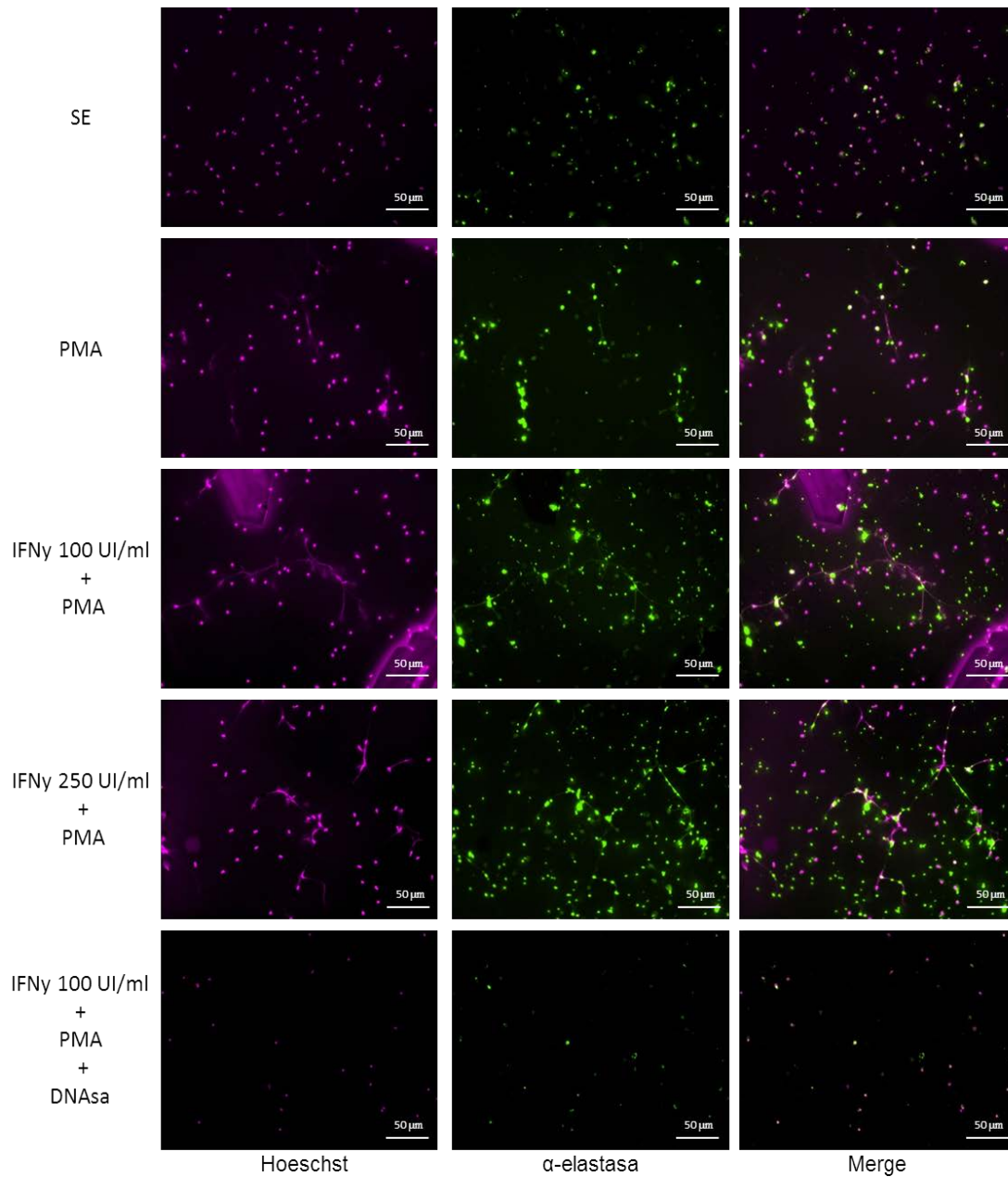


Figura 13. Producción de NET en el paciente 4 después de la pre-activación con IFN γ y posterior activación con PMA. En este paciente se observó producción de NET similar en las células estimuladas con PMA 50 nM con respecto a las células que fueron pre-activadas con IFN γ 100 UI/mL o 250 UI/mL y posteriormente tratadas con el PMA. El ADN liberado por las células es degradado por acción de la DNAsa. Las imágenes fueron tomadas en un aumento de 20X.

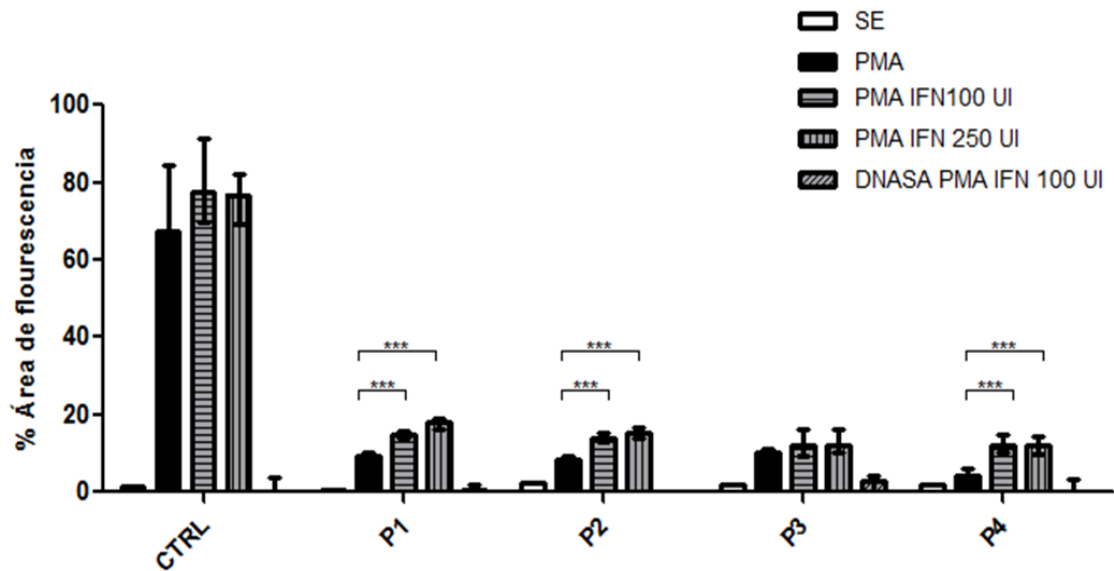


Figura 14: Determinación de la formación de NET a través del porcentaje de área en células pre-activadas con IFN γ . Después de la pre-estimulación de los PMNN con IFN γ 100 UI/mL o 250 UI/mL y posterior estimulación con PMA 50 nM se observó un incremento estadísticamente significativo en la liberación de NET en los pacientes 1, 2 y 4. Las células del paciente 3 no mostraron cambios al ser incubadas con IFN γ . El ADN liberado por las células es degradado por acción de la DNAsaI, tanto en las células del control como en los PMNN de los pacientes. $p < 0,0001$ (***)

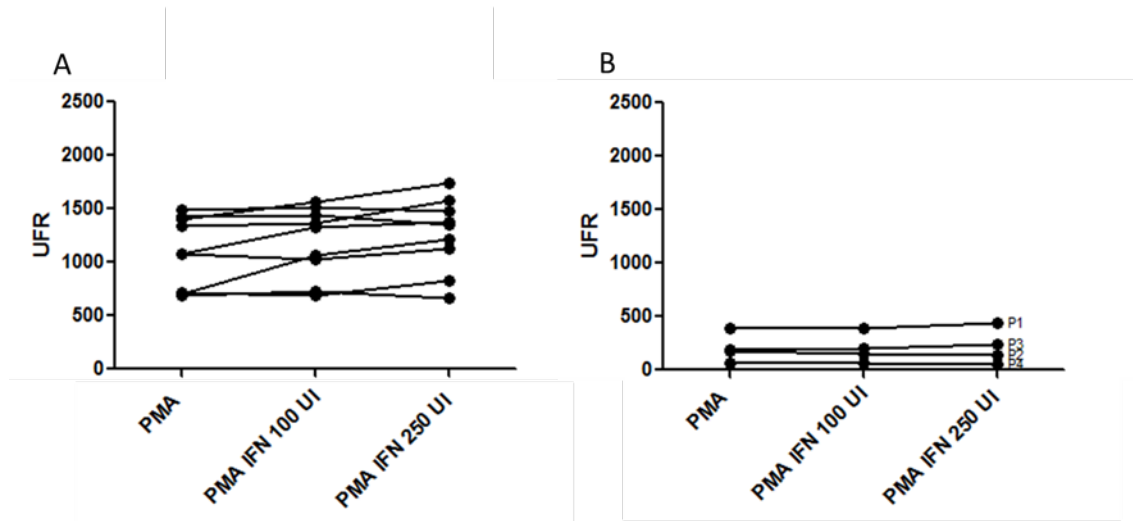


Figura 15. Determinación de la producción de NET mediante fluorometría en células pre-activadas con $IFN\gamma$. **A.** No se observaron cambios estadísticamente significativos en la liberación de NET en los PMNN de los individuos sanos pre-activados con $IFN\gamma$ 100 UI/mL o $IFN\gamma$ 250 UI/mL y estimulados con PMA 50 nM, en comparación con los PMNN estimulados solamente con PMA 50 nM. **B.** La cuantificación de la liberación de ADN de los pacientes no muestra cambios en las células pre-activadas con $IFN\gamma$ 100 UI/mL o $IFN\gamma$ 250 UI/mL y tratados con PMA

8.3 PRODUCCIÓN DE NET A TRAVÉS DE UN MECANISMO INDEPENDIENTE DEL OXÍGENO

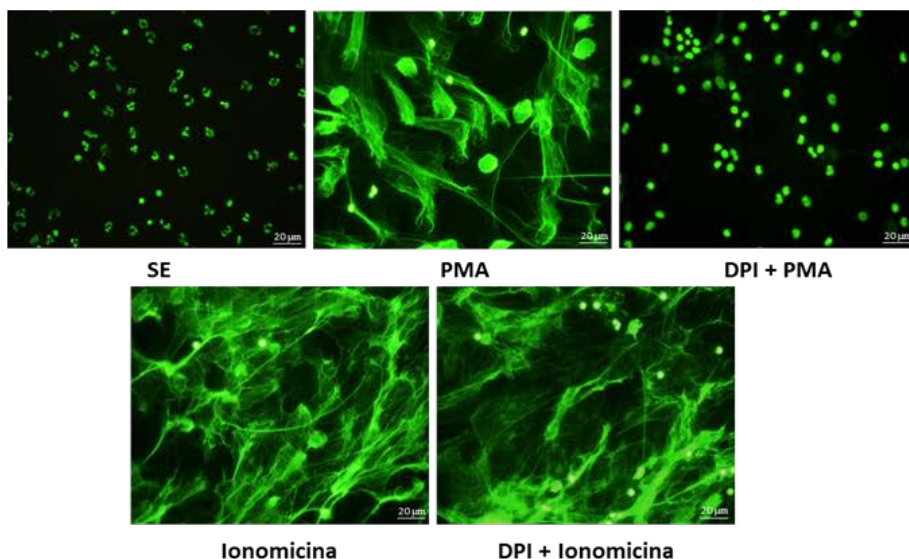
Teniendo en cuenta que la formación de NET se puede producir a través de mecanismos independientes del oxígeno, se evaluó este fenómeno en los pacientes incluidos en nuestro estudio. Inicialmente se determinó cómo era la formación de NET en individuos sanos. Para esto se utilizó DPI, un potente inhibidor del sistema NADPH oxidasa y posteriormente las células fueron estimuladas con PMA 50 nM o Ionomicina 5 µg/mL. En las células tratadas con DPI 10 µM y posteriormente estimuladas con PMA se observó descondensación del núcleo pero no hubo liberación de NET (Fig. 16 A). Sin embargo cuando las células fueron tratadas con DPI y estimuladas con ionomicina no se observó inhibición en la liberación de NET, lo cual sugiere que la NETosis después del tratamiento con este ionóforo se produce por una vía independiente del oxígeno (Fig. 16 A). La cuantificación mediante el análisis de imágenes en las células estimuladas con ionomicina reveló un aumento estadísticamente significativo en la liberación de ADN en comparación con las células sin estímulo, esta producción de NET se mantiene en las células incubadas con DPI y activadas con ionomicina (Fig. 16 B).

A partir de los resultados anteriores se podría inferir que los PMNN de los pacientes con EGC al entrar en contacto con la ionomicina probablemente harían NETosis. El resultado fue que efectivamente al estimular las células con este ionóforo de calcio, presentó un incremento en la producción de NET en las células de los pacientes en niveles comparables a las del individuo sano, este resultado fue confirmado por la presencia de elastasa en las NET (Fig. 17); además la cuantificación del porcentaje de área de fluorescencia permitió ver el incremento en la producción de NET después del estímulo con ionomicina 5 µg/mL (Fig. 18).

Mediante la cuantificación del ADN a través de fluorimetría se encontró que en los PMNN de los individuos sanos estimulados con ionomicina hay un aumento significativo en la liberación de NET con respecto a las células sin estímulo (Fig. 19A). En los PMNN de los pacientes se observó un aumento en la producción de NET en proporciones similares a las células de los individuos sanos (Fig. 19B). Estos

resultados son similares a los observados en la cuantificación de la liberación de NET
través del análisis de imágenes (Fig 18).

A



B

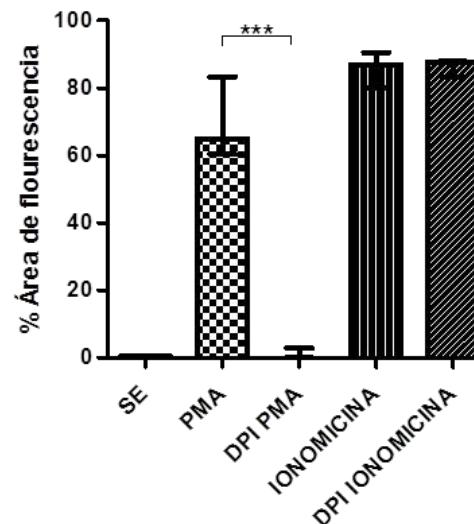


Figura 16: Producción de NET a través de un mecanismo independiente del sistema NADPH oxidasa. El sistema NADPH oxidasa fue inhibido con la adición de DPI 10 μ M a los PMNN de un individuo sano, posteriormente estas células fueron estimuladas con PMA 50 nM o ionomicina 5 μ g/mL y se realizó una tinción nuclear con Sytox Green 2,5 μ M. **A.** Las células sin estímulo (SE) se observaron con la morfología nuclear multilobulada. Al ser estimuladas con PMA hay liberación de NET, sin embargo al utilizar DPI las células pierden la capacidad de liberar las NET. Cuando las células son inhibidas con DPI y estimuladas con Ionomicina la liberación de NET permanece intacta lo cual indica que la producción de NET se presenta por un mecanismo independiente del oxígeno. **B.** En la determinación del porcentaje de área de fluorescencia se observó que hay una reducción en la producción de NET en presencia de DPI en células estimuladas con PMA, contrario a lo que ocurre cuando las células son activadas con ionomicina. Las imágenes fueron tomadas en un aumento de 63X. $p < 0,0001$ (***)

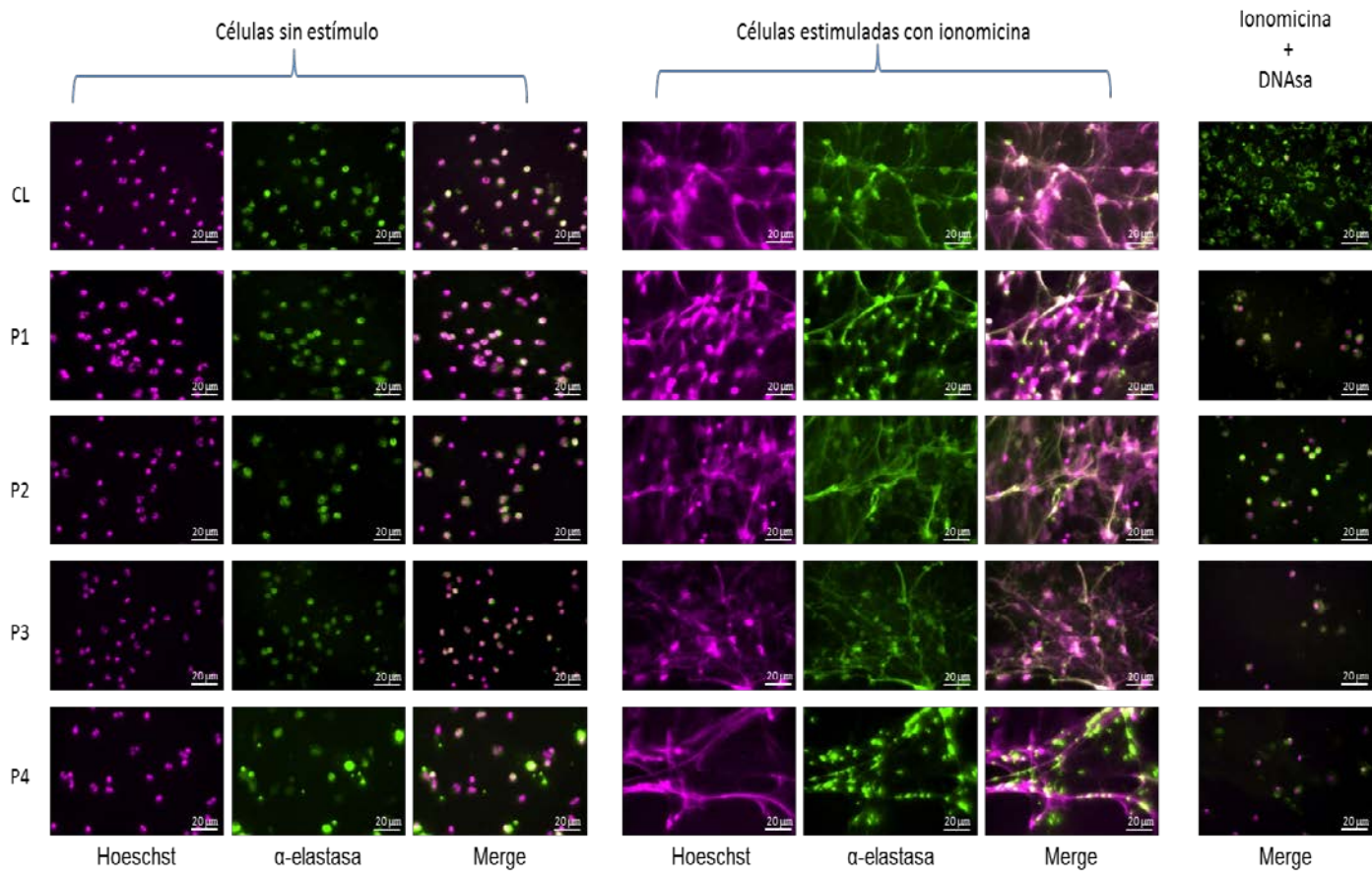


Figura 17. Identificación de NET mediante anticuerpos anti-elastasa en neutrófilos estimulados con ionomicina. Después de 3 horas de estímulo con ionomicina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó liberación de NET en las células de los pacientes con EGC. Al comparar la producción de NET de los pacientes con respecto al control se observa que la liberación de NET es similar en ambos casos. La primera columna corresponde a las células teñidas con Hoeschst (violeta) el cual tiñe el ADN, la segunda columna corresponde a células marcadas con el anticuerpo anti-elastasa acoplado a Alexafluor 488 (verde), la tercera corresponde a la superposición de las imágenes y allí se puede observar que el anticuerpo anti-elastasa sigue el mismo patrón que el ADN lo cual es característico de las NET y en la última columna se puede apreciar como el ADN liberado por las células es degradado por acción de la DNAsa. Las imágenes fueron tomadas en un aumento de 63X.

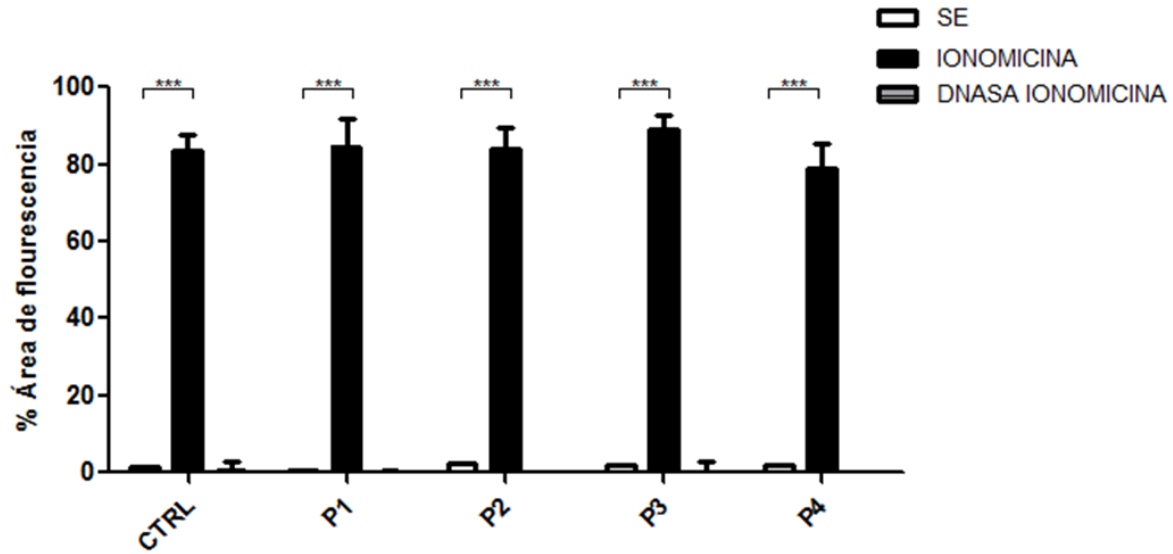


Figura 18: Determinación de la formación de NET a través del porcentaje de área en células estimuladas con ionomicina. Después de 3 horas de estimulación de los PMNN con ionomicina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se tomaron 10 imágenes de diferentes campos en un aumento de 20X y a partir de estas imágenes se determinó el porcentaje de área de fluorescencia. La gráfica muestra una alta producción de NET en los PMNN de los pacientes (P₁-P₄) a niveles comparables con las células del individuo sano (control). Después de que las células activadas con ionomicina, fueron tratadas con DNAsaI, el ADN presente en las NET fue degradado. $p < 0,0001$ (***)

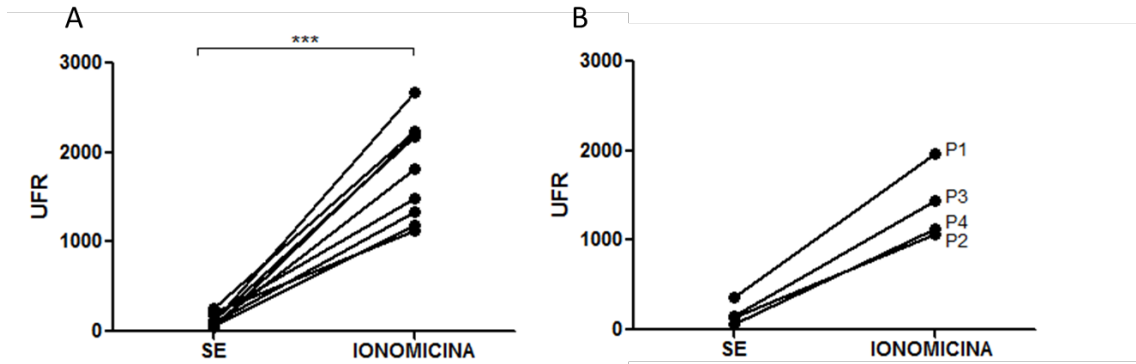


Figura 19: Cuantificación de la liberación de ADN mediante fluorimetría en neutrófilos estimulados con ionomicina durante 3 horas. A. PMNN de individuos sanos estimulados con ionomicina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en los que se observó un aumento significativo en la liberación de NET con respecto a las células sin estímulo. **B.** Los PMNN de los pacientes con EGC liberan NET de manera similar a las células de los individuos sanos. El ADN fue teñido con Sytox Green 2,5 μM y leído en un rango de excitación/emisión de 485/535 nm. $p < 0,0001$ (***)

8.4 PRODUCCIÓN DE NET DESPUÉS DE LA ESTIMULACIÓN CON LPS

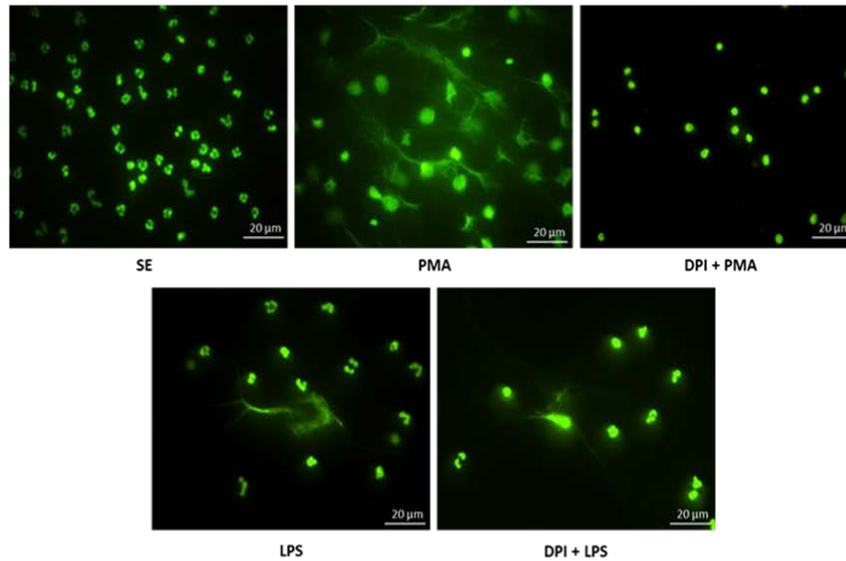
Con el fin de saber cómo respondían las células frente a un estímulo al que normalmente están expuestos estos pacientes, los PMNN fueron puestos en contacto con LPS. Inicialmente evaluamos la producción de NET a través de un mecanismo independiente del oxígeno en PMNN de un individuo sano. El resultado permitió concluir que hubo producción de NET después del estímulo con LPS 5 µg/mL (Fig. 20 A) y ésta, fue más baja en comparación con las células tratadas con PMA (Fig. 20 B). Adicionalmente, concluimos que en PMNN tratados con DPI 10 µM y posteriormente estimulados con LPS 5 µg/mL, no se afectó la liberación de ADN y la NETosis se dio a través de un mecanismo independiente del sistema NADPH oxidasa (Fig. 20 A). En la cuantificación de las imágenes no se observaron diferencias significativas cuando las células fueron inhibidas con DPI y posteriormente estimuladas con LPS en comparación con las células que solo fueron tratadas con LPS (Fig. 20 B).

Los neutrófilos de los pacientes con EGC y los individuos sanos fueron estimulados durante 3 horas con LPS 5 µg/mL y se determinó la producción de NET mediante microscopía. Se observó que los PMNN de los individuos sanos (controles) y de pacientes con EGC tuvieron un aumento en la producción de NET (Fig. 21). En la cuantificación a través de fluorimetría de los PMNN de los pacientes con EGC estimulados con LPS, se vio un aumento en la producción de NET y estos resultados fueron similares a los obtenidos en las células de los individuos sanos (Fig. 22).

Al igual que ocurrió en la células estimuladas con ionomicina 5 µg/mL, el LPS 5 µg/mL indujo un incremento significativo en el porcentaje de área de las NET con respecto a las células sin estímulo. Adicionalmente, quisimos evaluar el efecto del IFN γ a una concentración estándar de 100 UI/mL y posterior activación con LPS 5 µg/mL. Las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de las células del individuo sano y pacientes pre-estimuladas con IFN γ 100 UI/mL y posteriormente estimuladas con LPS, no mostraron ningún cambio con respecto a las células que solo estaban estimuladas con LPS (Fig. 23 – Fig. 27). La cuantificación a través del análisis de imágenes de la NETosis en PMNN estimulados con LPS, dio como resultado la producción de NET en células de pacientes con EGC en niveles similares a los PMNN

del individuo sano (Fig. 28). Al estimular las células con $\text{IFN}\gamma$ 100 UI/mL + LPS 5 $\mu\text{g/mL}$ no se observaron diferencias en la producción de NET con respecto a los PMNN que solo fueron activados con LPS (Fig. 28). Al hacer la cuantificación mediante la flurometría no se observaron cambios significativos en las células pre-estimuladas con $\text{IFN}\gamma$ 100 UI/mL tanto en los PMNN de los individuos sanos como los de pacientes con EGC (Fig. 29).

A



B

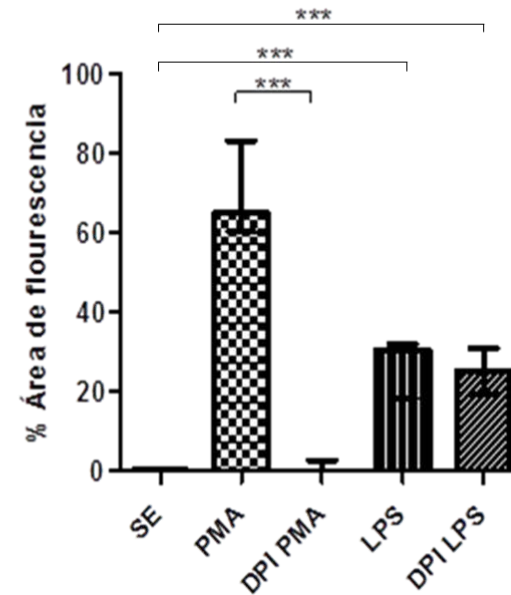


Figura 20: Producción de NET a través de un mecanismo independiente del NADPH oxidasa. Para la determinación de la producción de NET mediante un mecanismo independiente del oxígeno se siguió el mismo procedimiento utilizado en los ensayos con ionomicina 5 µg/mL (Fig. 16) **A.** Las células sin estímulo de un individuo sano se observan con la morfología nuclear multilobulada. Al ser estimuladas con PMA 50 nM hay liberación de NET, sin embargo al utilizar DPI 10 µM las células pierden la capacidad de liberar las NET. Cuando las células son inhibidas con DPI y estimuladas con LPS liberan las NET a través de un mecanismo independiente del oxígeno. **B.** La determinación del porcentaje de área de fluorescencia permite concluir que hay una reducción en la producción de NET en presencia de DPI en células estimuladas con PMA, contrario a lo que ocurre cuando las células son activadas con LPS 5 µg/mL Las imágenes fueron tomadas en un aumento de 63X. $p < 0,0001$ (***)

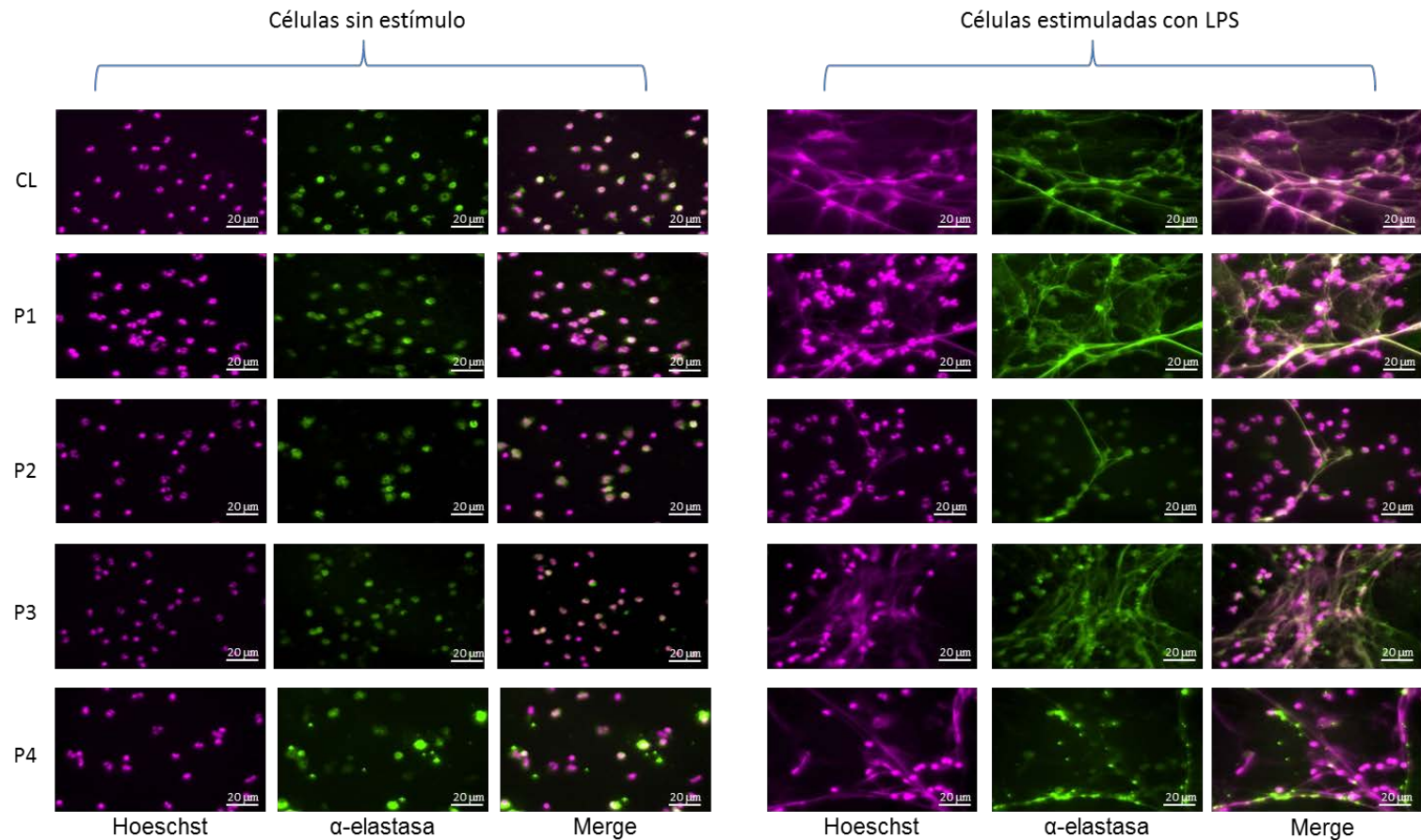


Figura 21. Identificación de NET mediante anticuerpos anti-elastasa en neutrófilos después del estímulo con LPS. Después de 3 horas de estímulo con LPS 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó la liberación de NET en las células de los pacientes con EGC. Al comparar la producción de NET de los pacientes con respecto al individuo sano (control) se observó que la liberación de NET es similar en ambos casos. La primera columna corresponde a las células teñidas con Hoeschst (violeta) el cual tiñe el ADN, la segunda columna corresponde a células marcadas con el anticuerpo anti-elastasa acoplado a Alexafluor 488 (verde), la última corresponde a la superposición de las imágenes y allí se puede observar que el anticuerpo anti-elastasa sigue el mismo patrón que el ADN lo cual es característico de las NET. Las imágenes fueron tomadas en un aumento de 63X.

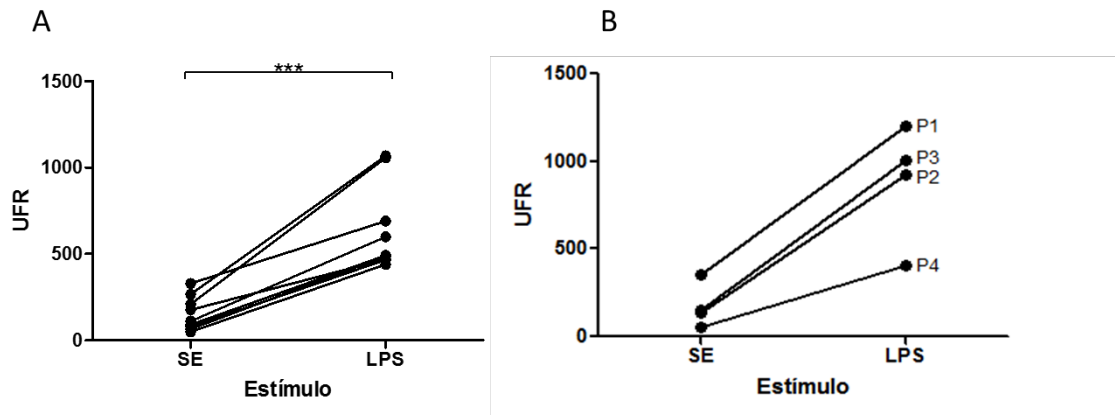


Figura 22: Cuantificación de la liberación de ADN mediante fluorimetría en neutrófilos estimulados con LPS durante 3 horas. A. PMNN de individuos sanos (controles) estimulados con LPS 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ donde se ve un aumento significativo en la liberación de NET con respecto a las células sin estímulo. **B.** Los PMNN de los pacientes con EGC liberan NET en un nivel comparable a las células de los controles sanos. El ADN fue teñido con Sytox Green 2,5 μM y leído en un rango de excitación/ emisión de 485/535 nm. $p < 0,0001$ (***)

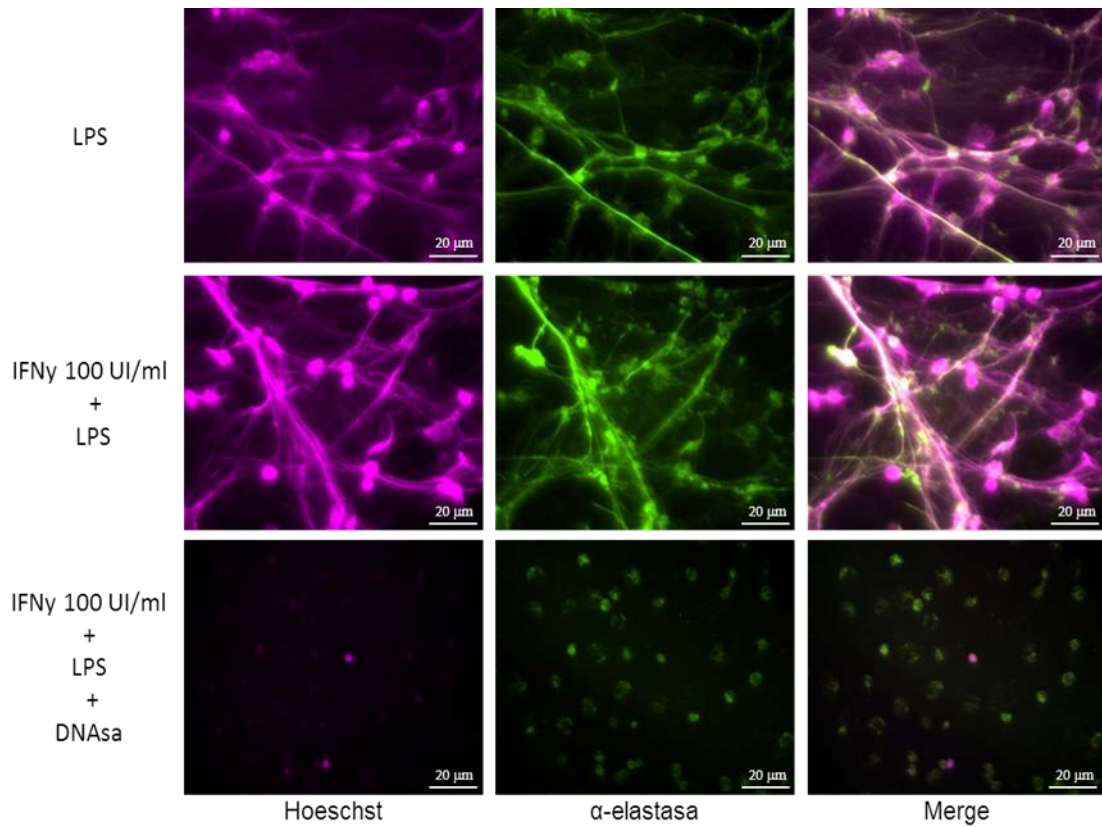


Figura 23. Producción de NET por PMNN de un individuo sano después de la pre-estimulación con IFN γ y posterior activación con LPS. Los PMNN fueron pre-estimulados con IFN γ 100 UI/mL seguido de la activación con LPS 5 μ g/mL. La imagen revela una alta producción de NET en las células estimuladas con LPS, este resultado no presentó variaciones al hacer la pre-activación con IFN γ 100 UI/mL. El ADN liberado por las células es degradado por acción de la DNAsa. Las imágenes fueron tomadas en un aumento de 63X.

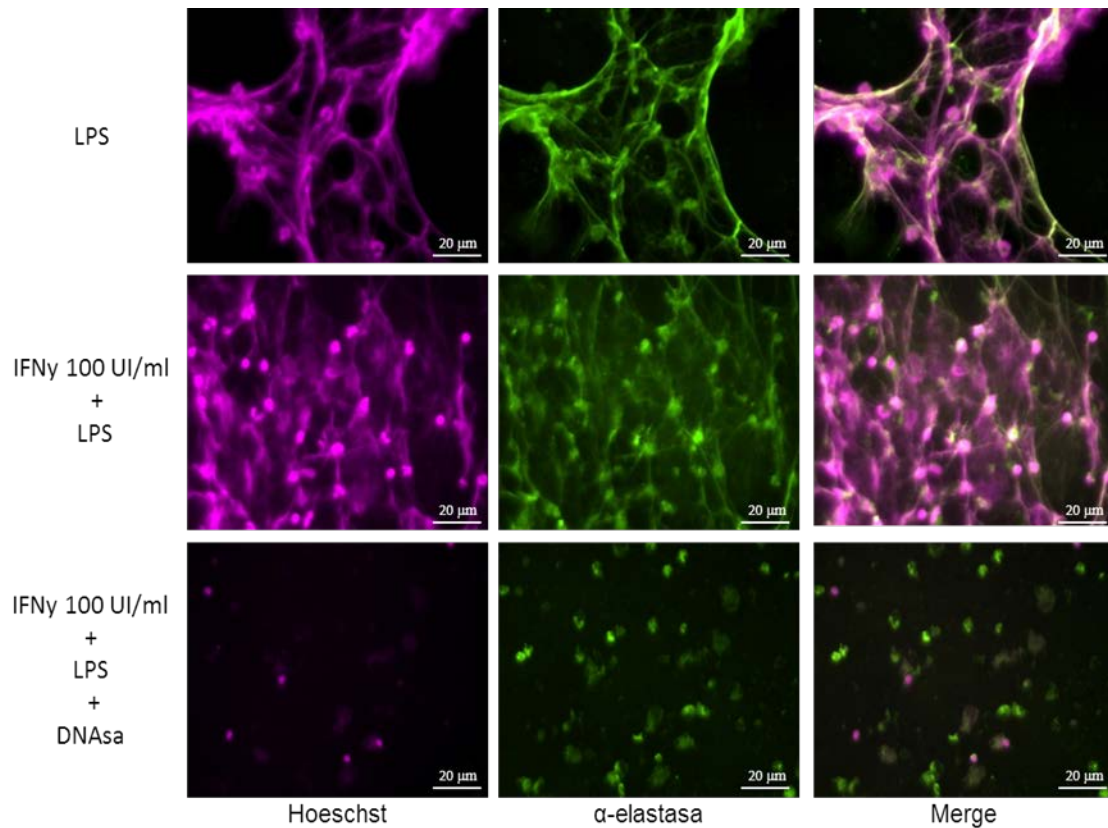


Figura 24. Producción de NET por PMNN del paciente 1 con EGC después de la pre-estimulación con IFN γ y posterior activación con LPS. Los PMNN fueron pre-estimulados con IFN γ 100 UI/mL seguido de la activación con LPS 5 μ g/mL. La imagen revela una alta producción de NET en las células estimuladas con LPS, este resultado no presentó variaciones al hacer la pre-activación con IFN γ 100 UI/mL. El ADN liberado por las células es degradado por acción de la DNAsa. Las imágenes fueron tomadas en un aumento de 63X.

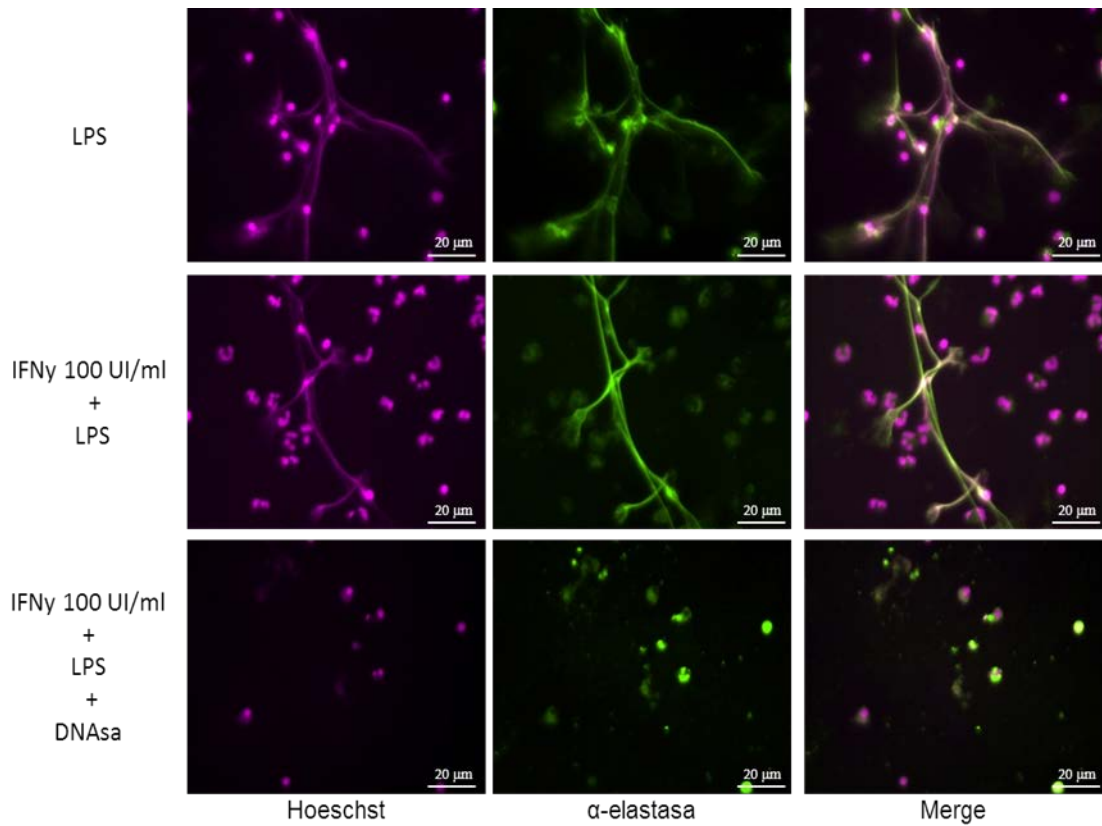


Figura 25. Producción de NET por PMNN del paciente 2 con EGC después de la pre-estimulación con IFN γ y posterior activación con LPS. Los PMNN fueron pre-estimulados con IFN γ 100 UI/mL seguido de la activación con LPS 5 μ g/mL. La imagen revela una alta producción de NET en las células estimuladas con LPS, este resultado no presentó variaciones al hacer la pre-activación con IFN γ 100 UI/mL. El ADN liberado por las células es degradado por acción de la DNAsa. Las imágenes fueron tomadas en un aumento de 63X.

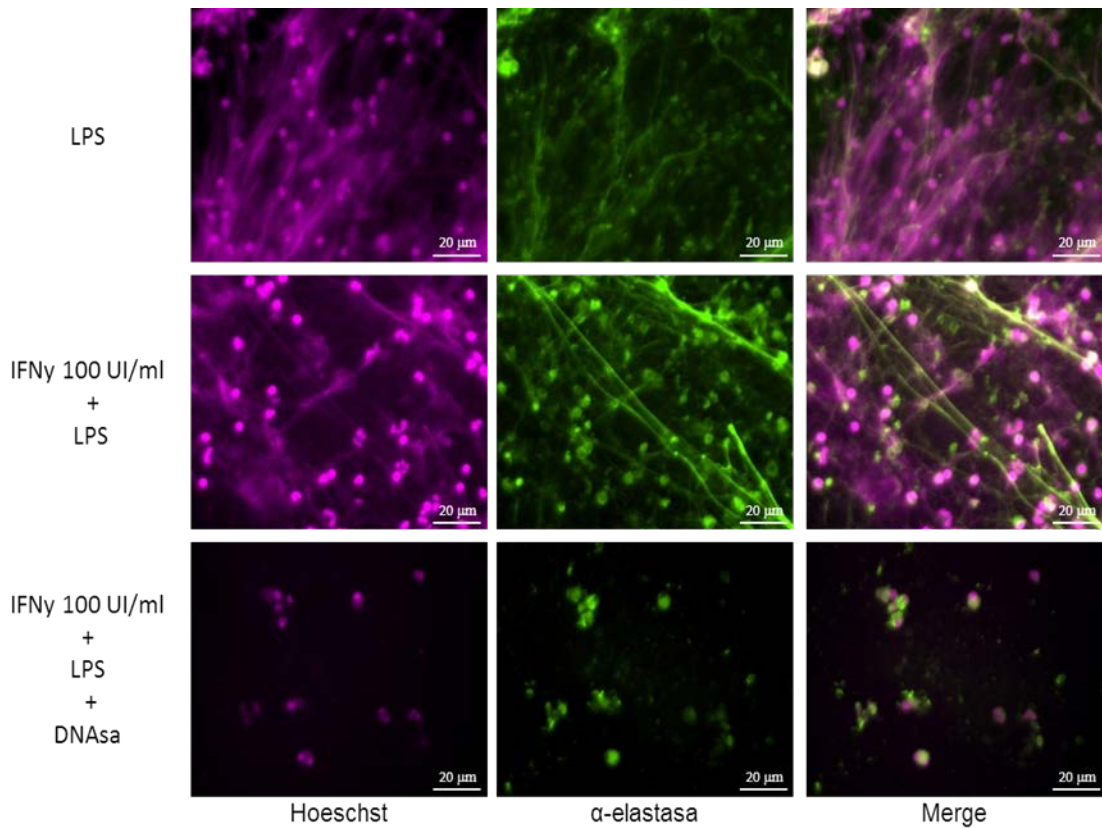


Figura 26. Producción de NET por PMNN del paciente 3 con EGC después de la pre-estimulación con IFN γ y posterior activación con LPS. Los PMNN fueron pre-estimulados con IFN γ 100 UI/mL seguido de la activación con LPS 5 μ g/mL. La imagen revela una alta producción de NET en las células estimuladas con LPS, este resultado no presentó variaciones al hacer la pre-activación con IFN γ 100 UI/mL. El ADN liberado por las células es degradado por acción de la DNAsa. Las imágenes fueron tomadas en un aumento de 63X.

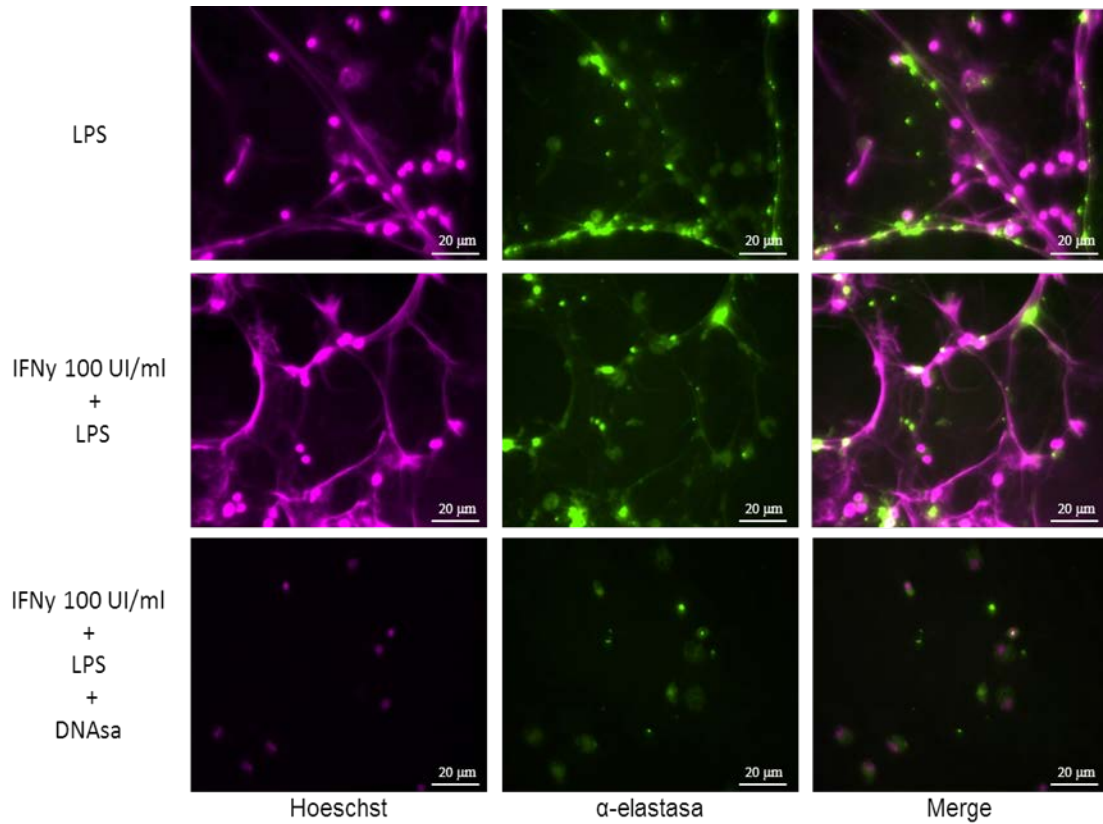


Figura 27. Producción de NET por PMNN del paciente 4 con EGC después de la pre-estimulación con IFN γ y posterior activación con LPS. Los PMNN fueron pre-estimulados con IFN γ 100 UI/mL seguido de la activación con LPS 5 μ g/mL. La imagen revela una alta producción de NET en las células estimuladas con LPS, este resultado no varió al hacer la pre-activación con IFN γ 100 UI/mL. El ADN liberado por las células es degradado por acción de la DNAsa. Las imágenes fueron tomadas en un aumento de 63X.

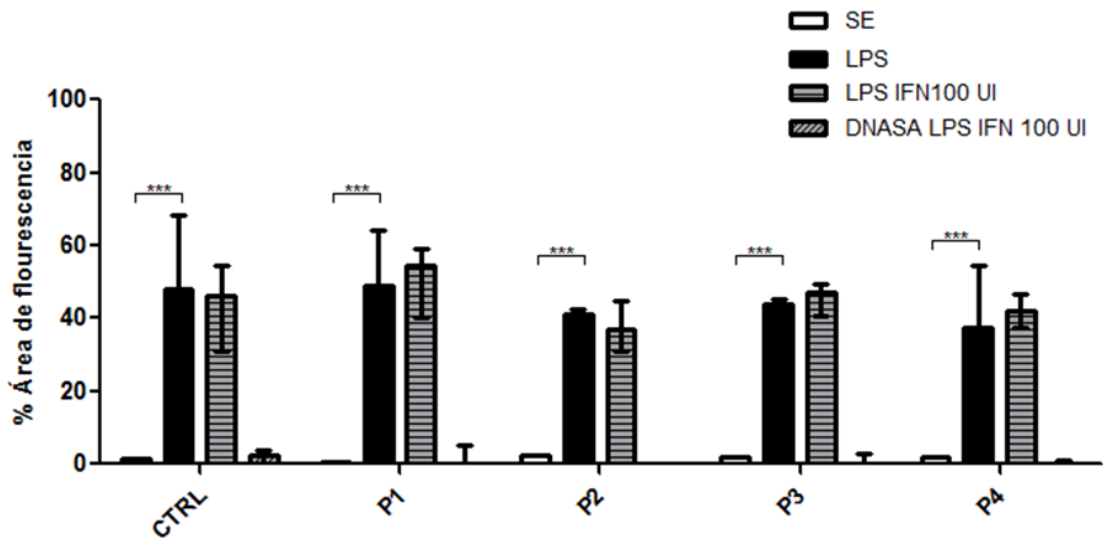


Figura 28: Determinación de la formación de NET a través del porcentaje de área en células estimuladas con LPS. La estimulación de los PMNN con LPS 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aumentó de manera estadísticamente significativa la liberación de NET en los pacientes (P₁-P₄) y el individuo sano (control) respecto a las células sin estímulo. Después de la pre-estimulación de los PMNN con IFN γ 100 UI/mL y posterior activación con LPS no se observan cambios en la producción de NET. $p < 0,0001$ (***)

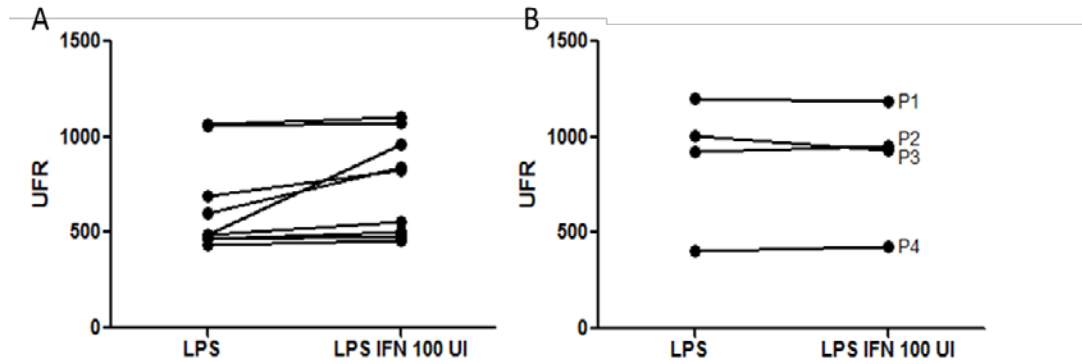


Figura 29. Producción de NET en pacientes e individuos sanos después de la pre-estimulación con IFN γ y posterior activación con LPS. A. No se observan cambios estadísticamente significativos en la liberación de NET en PMNN de controles sanos estimulados con IFN γ 100 UI/mL + LPS 5 μ g/mL en comparación con los PMNN estimulados solamente con LPS 5 μ g/mL. **B.** La cuantificación de la liberación de ADN de los pacientes muestra que las células liberan ADN después del estímulo con LPS sin embargo no se observan cambios cuando los PMNN fueron pre-activados con IFN γ 100 UI/mL.

9 DISCUSIÓN

A partir del descubrimiento de las NET, estas estructuras han sido ampliamente estudiadas en diferentes modelos y se ha logrado establecer que la NETosis se presenta como un mecanismo de muerte celular independiente a la apoptosis y a la necrosis (53). A pesar de que aún no se conocen todos los eventos moleculares que permiten que se lleve a cabo la NETosis, se sabe que tanto la autofagia como la producción de ROS son indispensables para la descondensación de la cromatina y que se lleve a cabo la liberación de las NET (76). La actividad microbicida de los componentes de las NET ha sido bien caracterizada, pues se sabe que las proteínas nucleares como histonas o enzimas como la elastasa y la mieloperoxidasa tienen alto poder bactericida lo que contribuye a la eliminación de agentes patógenos (52). La estructura de las NET también es importante ya que funciona como una red que atrapa el microorganismo e impide su diseminación.

Uno de los aspectos que ha ido evolucionando después de los primeros reportes acerca de las NET, fue la manera de identificar y cuantificar estas estructuras. La cuantificación a través de fluorimetría con el uso de intercalantes del ADN es uno de los métodos más utilizados. Sin embargo, este método puede llevar a confusión cuando el ADN cuantificado corresponde a células necróticas; además, métodos como el Picogreen tienen baja sensibilidad cuando son pocas las células liberan NET (menos del 20% de células liberando NET después de una hora de estimulación) (106). Teniendo en cuenta la necesidad de unificar la forma en que se reporta la cuantificación de NET, en el año 2012 Brinkmann y colaboradores desarrollaron un método para dicha medición mediante el uso de microscopía de fluorescencia, en el cual a partir de diferentes campos de observación se cuantifican las NET individualmente y a través de un software se genera un valor numérico que permite su medición (107). Adicionalmente, en 2015 Coelho y colaboradores proponen una metodología para optimizar ese método a través de la sistematización para hacer el método menos engorroso (106). Con base en lo anterior, en nuestros ensayos se tuvieron en cuenta dos metodologías diferentes para la cuantificación de las NET, la fluorimetría y el análisis de imágenes a través del software ImageJ lo cual nos permitió

tener una mayor precisión en nuestros resultados, además de identificar como las dos metodologías se complementan.

Con base en los reportes que indican que la producción de NET es efectiva al tratar los PMNN con un activador del sistema NADPH (52, 53, 108), en este trabajo quisimos verificar si había liberación de ADN en células tanto de individuos sanos como de pacientes con EGC al utilizar como estímulo el PMA. Contrario a lo que se puede observar en las células de un individuo sano, en los pacientes con EGC hubo una baja producción de NET y esto se pudo determinar mediante microscopia de fluorescencia (Fig. 2 – Fig. 6). Estos resultados difieren con lo ya reportado en la literatura en donde se describe que en estos pacientes no hay producción de NET al ser estimulados con PMA (50, 52, 53, 63, 96). En 2007 Fuchs y colaboradores estimularon PMNN de individuos con EGC adicionando PMA y confirmando que no hay NETosis (53); igualmente, Brinkmann en sus estudios iniciales observó este mismo fenómeno (52). Es importante anotar que estos estudios reportan que las células de los pacientes con EGC liberan normalmente NET cuando se ponen en contacto con una fuente exógena de radicales oxidantes como la glucosa oxidasa, es decir los pacientes tienen la capacidad de producir NET, pero nuestros resultados muestran una baja producción de NET debido a la escasa cantidad de especies reactivas del oxígeno (Fig. 7, Fig. 8, Tabla 2). En la Figura 3 se pudo observar la baja producción de NET en las células de los pacientes con EGC en comparación con un individuo sano; las células fueron marcadas con Hoeschst y observadas en microscopía de fluorescencia en un objetivo de 20X, este objetivo de bajo aumento permite tener una perspectiva mayor de los campos y de esta forma se pueden contrastar los resultados con respecto a la producción de NET en un individuo sano.

Dado que se conocen gran parte de los componentes de las NET tales como histonas, mieloperoxidasa o elastasa y que hay un gran contenido de cromatina, para la identificación de las NET se han descrito diferentes marcadores celulares (52, 57, 109); por tanto, es común el uso de fluorocromos intercalantes del ADN, tales como Sytox Green, Hoeschst, DAPI, etc. En nuestro estudio, como marcador para la identificación de las NET se utilizó un anticuerpo anti-elastasa, el cual sigue el mismo

patrón del ADN en las células que liberan NET (68). De esta forma fue posible evidenciar que a pesar que la liberación de ADN hacia el medio extracelular es menor en los pacientes con EGC, efectivamente esas estructuras corresponden a NET (Fig. 4).

De otro lado, con el fin de determinar el efecto del $\text{IFN}\gamma$ en los PMNN de los pacientes con EGC utilizamos dos estrategias diferentes: Inicialmente quisimos observar el efecto del $\text{IFN}\gamma$ sobre la explosión respiratoria y por otra parte determinar el efecto de esta citoquina en la producción de NET mediante la observación por microscopía de fluorescencia convencional.

Como ya se ha mencionado la aplicación de $\text{IFN}\gamma$ vía subcutánea conlleva a la mejoría clínica de algunos de los pacientes con EGC (48, 110, 111). Si bien el mecanismo de acción mediante el cual se presenta la mejoría clínica de estos pacientes aún se desconoce, se ha reportado que la actividad del $\text{IFN}\gamma$ es mediada por una cascada de señalización donde JAK1-2 y STAT1- α intervienen en la regulación de la transcripción del gen *CYBB* y posterior exportación de transcritos desde el núcleo hacia el citoplasma (112). También se ha demostrado que el $\text{IFN}\gamma$ puede intervenir en la modulación del “splicing” alternativo, lo cual corrige de manera parcial la actividad oxidativa de PMNN de individuos con EGC con mutaciones asociadas a los sitios de corte y empalme (103). Así mismo, se ha observado que estimula células progenitoras, lo que favorece la aparición de una población de fagocitos con un incremento en su función oxidativa hasta 28 días después del estímulo inicial (110).

Nuestros resultados mostraron que después de la pre-activación con $\text{IFN}\gamma$ 100 UI/mL y posterior estimulación con PMA 50 nM los PMNN aumentaron la producción de ROS con respecto a las células que solo fueron tratadas con PMA 50 nM (Fig. 7, Tabla 2). Además, se observó que el $\text{IFN}\gamma$ por sí solo no induce la producción de especies reactivas del oxígeno ni de NET (Tabla 2, Anexo 2). Yamashita K y colaboradores reportaron que las células de los pacientes con EGC presentan un leve incremento en los niveles de ROS después del estímulo con esta citoquina (99). En nuestro estudio observamos que efectivamente las células presentaron un leve incremento en la

producción de ROS; sin embargo, estos niveles son muy bajos al compararlos con la actividad oxidativa de los controles sanos (Fig. 7, Tabla 2). Es de anotar que mediante la medición de la explosión respiratoria a través de citometría de flujo se confirmó el diagnóstico bioquímico de EGC (Anexo 1). En el año 2015 Filiz y colaboradores midieron el efecto del IFN γ 100 UI/mL sobre la producción de ROS en PMNN de pacientes con EGC a través de DHR, encontrando que, si bien el IE aumentaba después del pre-estímulo con IFN γ 100 UI/mL ese incremento era muy bajo en comparación con el IE en los controles sanos (113), resultados que son similares a nuestros hallazgos (Tabla 2). En otro estudio realizado en ratones, se muestra la importancia del IFN γ para combatir las infecciones por *S. pneumoniae* activando la NETosis. En este trabajo se muestra que en ratones IFN $\gamma^{-/-}$ hay una disminución significativa en la producción de NET, este mismo fenómeno fue observado en un modelo de ratones con EGC que carecían de gp91 phox (114).

Adicionalmente, nuestros resultados de microscopía mostraron en las células de los pacientes con EGC un aumento estadísticamente significativo en la producción de NET después de la pre-estimulación con IFN γ 100 UI/mL o 250 UI/mL y posterior estimulación con PMA (Fig. 9 – Fig. 14). En el control sano no se presentaron diferencias significativas después de la pre-activación con IFN γ , pues tan solo con la estimulación con PMA la producción de NET fue elevada (Fig. 9, Fig. 14), es necesario resaltar que tanto en los pacientes como en los controles sanos la DNAsal degradó el ADN presente en el medio lo cual permitió confirmar que había presencia de NET (Fig. 9 – Fig. 14). En la cuantificación mediante fluorimetría no se observaron diferencias significativas en la liberación de NET cuando las células fueron pre-estimuladas con IFN γ 100 UI/mL o 250 UI/mL en los PMNN de los pacientes (Fig. 15), este resultado podría explicarse por la baja sensibilidad de la fluorimetría cuando pocas células liberan ADN (107).

Es importante mencionar que no se esperaba una producción de NET comparable con el control sano, ya que se sabe que si bien el IFN γ puede aumentar la producción de ROS en los pacientes con EGC (99), este incremento es muy leve y esto se vio reflejado en la producción de NET que es muy baja en los pacientes con EGC que

incluimos en nuestro estudio. Uno de los sesgos que no se pudo controlar fue el hecho que al momento de tomar la muestra de sangre de los 4 pacientes, ya se les había aplicado la dosis de $\text{IFN}\gamma$, por lo tanto los PMNN de sangre periférica ya venían con un pre-estímulo de $\text{IFN}\gamma$. Sin embargo los riesgos en caso de no aplicarse esta dosis son altos, razón por la cual la toma de muestra se hizo aun sabiendo la condición en la que se encontraban las células.

Teniendo en cuenta que uno de nuestros objetivos era determinar la producción de NET mediante un mecanismo independiente del oxígeno, determinamos la producción de NET mediante la estimulación con ionomicina. La ionomicina es un ionóforo de Ca^{2+} que induce la liberación de NET mediante un mecanismo independiente de ROS, lo cual fue descrito por Parker en 2012 (69).

En nuestros ensayos observamos como aun después de inhibir el sistema NADPH oxidasa con DPI y estimular con Ionomicina hubo producción de NET (Fig. 16), lo cual coincide con varios estudios que indican que la NETosis también se presenta por un mecanismo independiente de la producción de ROS (63, 69, 74). Posteriormente, al utilizar como estímulo la ionomicina en los pacientes con EGC, observamos que en todos la producción de NET fue similar a lo observado en las células del control sano y estos resultados fueron similares tanto en el análisis de imágenes como en la fluorometría (Fig. 17 – Fig. 19), lo cual confirmaba nuestra hipótesis que en las células de los pacientes con EGC estimuladas con ionomicina hubiera liberación de NET a pesar de su incapacidad de producir ROS. Al igual que en el ensayo hecho con PMA 50 nM, la DNAsa sirvió como control para confirmar que las estructuras liberadas eran NET.

La producción de NET mediante el estímulo de ionóforos de calcio como la ionomicina se debe a los aumentos de Ca^{2+} intracelular que conlleva la activación de la enzima peptidilarginina deaminasa 4 (PAD4) (70, 72). Se ha demostrado que el papel de PAD4 en la formación de NET es esencial. Varios estímulos activan PAD 4 entre estos las ROS y la ionomicina (70, 115); sin embargo, en ausencia de ROS al interior de la célula, la PAD 4 puede ser activada por altas concentraciones de Ca^{2+} (70), este probablemente sea el fenómeno que se presente en las células de los pacientes con

EGC que tienen una producción de ROS deficiente, pero al ser estimuladas con ionomicina la concentración de Ca^{2+} intracelular activa PAD4 lo cual permite la descondensación de la cromatina y posterior liberación de NET (Fig. 30).

Por último, considerando que el LPS es una molécula a la que comúnmente están enfrentadas las células de los pacientes con EGC, dado las infecciones recurrentes que presentan, quisimos saber cómo respondían las células de los pacientes frente al LPS. Inicialmente evaluamos en células de controles sanos la producción de NET en PMNN tratados con DPI y posteriormente estimulados con LPS y observamos que la NETosis, al igual que en el caso de la ionomicina, se estaba presentando por una vía independiente del oxígeno (Fig. 20).

En los pacientes con EGC los resultados revelaron que había un aumento en la producción de NET en los PMNN estimulados con LPS con respecto a las células sin estímulo, tanto en la cuantificación como en la fluorometría (Fig. 21, Fig. 22, Fig. 28). Este hallazgo es interesante puesto que estaría mostrando un indicio de que los neutrófilos de los pacientes podrían responder a ciertas infecciones bacterianas, mediante la liberación de NET. A diferencia de lo observado en los PMNN de los pacientes pre-estimulados con $\text{IFN}\gamma$ y tratados con PMA, donde hubo un incremento en la producción de NET, el $\text{IFN}\gamma$ no tuvo ningún efecto sobre la producción de NET cuando las células fueron tratadas con LPS (Fig. 23 – Fig. 29) El mecanismo mediante el cual se presenta la NETosis después del estímulo con LPS está relacionado con la citrulinación de las histonas ya que el LPS, al igual que la ionomicina, lleva al aumento del Ca^{+} intracelular que induce la activación de PAD4 y de esta forma se descondensa la cromatina lo que permite la liberación de las NET (Fig. 30) (70, 115, 116).

De acuerdo a nuestros resultados podemos concluir que después de la pre-estimulación con $\text{IFN}\gamma$ 100 UI/mL y posterior activación con PMA 50 nM hubo un incremento en la producción de ROS en los PMNN de pacientes con EGC. Este hallazgo sugiere que el incremento en la actividad oxidativa de los PMNN podría conllevar a una mejoría clínica en los pacientes. Adicionalmente observamos que los PMNN de los pacientes con EGC producen una baja cantidad de NET al ser estimulados con PMA 50 nM y esta producción incrementa levemente cuando las

células son pre-estimuladas con $\text{IFN}\gamma$ 100 UI/mL o 250 UI/mL y posteriormente activadas con PMA 50 nM, sin embargo no hubo diferencias entre las dosis utilizadas de esta citoquina. El hecho de que en las células de los pacientes se presente un leve incremento en la producción de ROS es importante ya que estos pequeños cambios conllevan a una mejoría clínica y una disminución en la presentación de infecciones graves (117, 118).

Por otra parte pudimos determinar que el aumento en la producción de NET después de la estimulación con ionomicina está relacionado con un mecanismo independiente del oxígeno. Finalmente, la liberación de trampas extracelulares en células estimuladas con LPS 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ indica que tal vez los PMNN podrían responder frente algunas bacterias a través de la NETosis. Es necesario plantear estudios adicionales donde se establezca cuáles son los mecanismos a través de los cuales se da la producción de NET en las células de los pacientes con EGC cuando son estimuladas con LPS o con ionóforos del calcio que permitan desarrollar estrategias terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad.

A pesar de los diversos estudios que se han realizado con el fin de dilucidar el efecto del $\text{IFN}\gamma$ sobre las células de individuos con EGC, aún se desconocen los eventos moleculares que conllevan a una mejoría clínica en algunos de estos pacientes. La mayoría de los estudios se han centrado en la actividad oxidativa de las células fagocíticas después de la aplicación subcutánea del $\text{IFN}\gamma$. En nuestro estudio presentamos otra alternativa en la que proponemos que el $\text{IFN}\gamma$ podría estar induciendo una mayor liberación de NET. A partir de estos resultados sería interesante evaluar el efecto microbicida de las NET producidas por los pacientes con EGC después del estímulo con $\text{IFN}\gamma$ en modelos bacterianos y de hongos. Igualmente el hecho de conocer que los PMNN de estos pacientes hacen NETosis después del estímulo con ionomicina o LPS, podría servir de base para la búsqueda de inmunomoduladores que contribuyan con el tratamiento de la enfermedad.

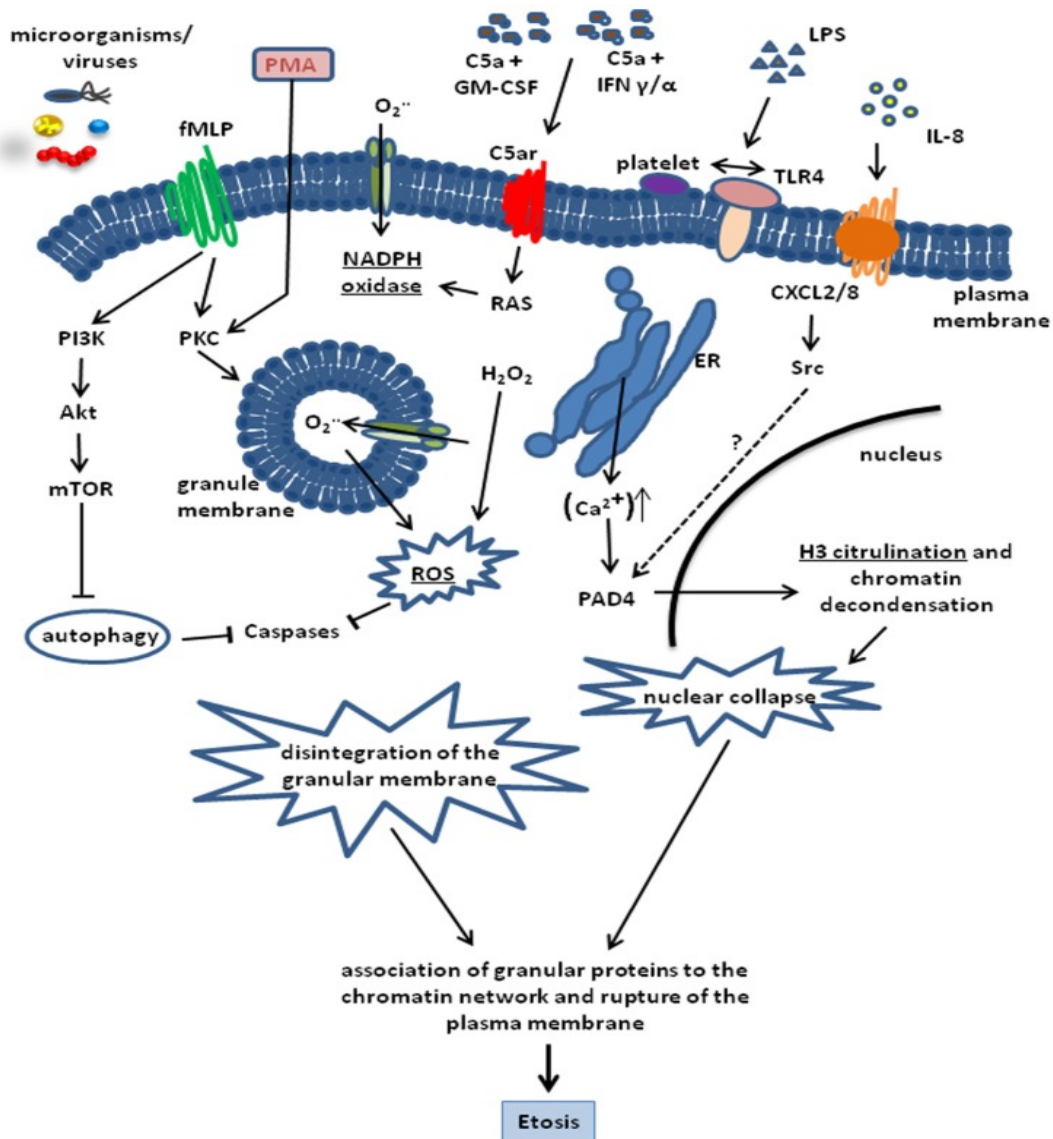


Figura 30. Representación de diferentes vías celulares que conllevan a la producción de NET. En el esquema se observan algunas moléculas y microorganismos que desencadenan la NETosis. En nuestro estudio nos centramos en tres de los estímulos representados en la figura, el PMA, la ionomicina y LPS. En individuos sanos después de la estimulación con PMA se activa el sistema NADPH oxidasa lo cual induce la producción de NET a través de un mecanismo dependiente del oxígeno; En el caso de los pacientes con EGC, la producción de NET por esta vía se encuentra alterada y por esto nuestros resultados mostraron una baja liberación de DNA al medio extracelular, sin embargo pueden producir NET a través de un mecanismo independiente del oxígeno después de la estimulación con ionomicina o LPS que activan la enzima PAD4, la cual participa en la citrulinación de las histonas y subsecuente descondensación de la cromatina que desemboca finalmente en la liberación de trampas extracelulares. (Tomada de: Goldmann O, Medina E. Front Immunol. 2012; 3: 420.) (116).

10 PERSPECTIVAS

La ejecución de esta propuesta ha permitido la consolidación de nuestra línea de investigación en células fagocíticas, que se desarrolla en dos frentes, el estudio de los mecanismos de muerte celular de las células fagocíticas y el diagnóstico bioquímico y genético-moléculas de pacientes con EGC

Con respecto al estudio de las NET, sería interesante investigar la capacidad microbicida de estas estructuras una vez las células de los pacientes con EGC sean retadas con diferentes modelos microbianos, ya sean hongos o bacterias.

La idea con nuestro trabajo de investigación es sentar la base para futuros proyectos que se enfoquen en la búsqueda de inmuno-moduladores que contribuyan a diseñar nuevos tratamientos para este tipo de enfermedades consideradas como huérfanas, las cuales necesitan ser investigadas para ofrecer una mejor calidad de vida a los pacientes que acceden al Grupo de Inmunodeficiencias Primarias.

11 APORTES CIENTÍFICOS DE LA INVESTIGACIÓN

Nuestro trabajo de investigación se enfocó en el estudio de la liberación de NET en las células de los pacientes con EGC bajo diferentes estímulos. En este estudio pudimos observar que el IFN γ , que actualmente se utiliza como tratamiento de esta enfermedad, potencia la liberación de NET en los pacientes. Así mismo nuestros resultados revelaron que los pacientes pueden producir NET a niveles comparables a los de individuos sanos, a través de un mecanismo independiente del oxígeno

Los productos de investigación derivados de esta propuesta son:

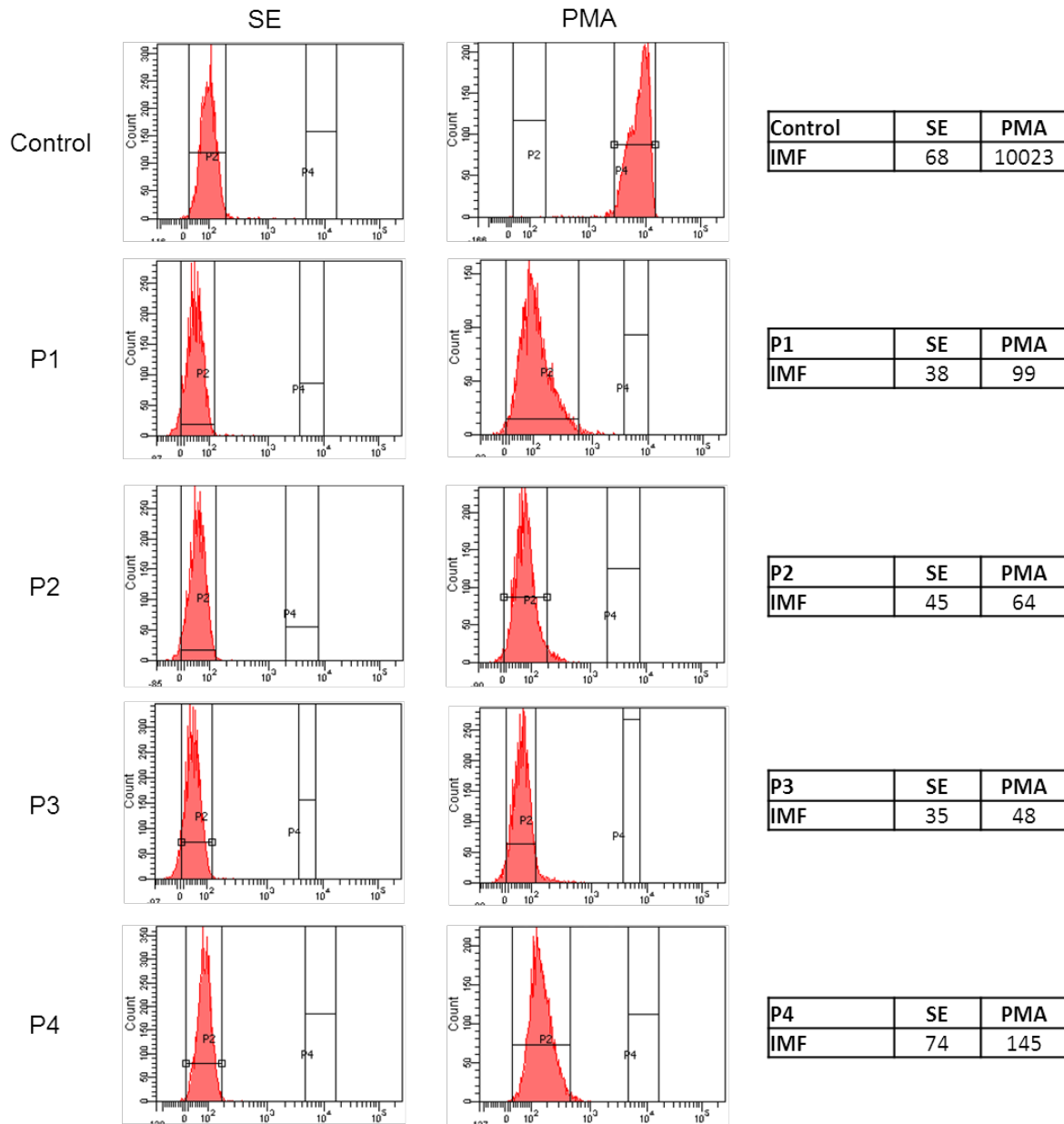
1. Artículo de revisión publicado en la **Revista Cubana de Hematología Inmunología y Hemoterapia (Anexo 4):**

Vélez-Tobón G, Rocha Y, Arias A, López J. Función del sistema NADPH oxidasa en la formación de trampas extracelulares de los neutrófilos (NET). Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia [revista en Internet]. 2015; 32(1) Disponible en:<http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/369>

2. Presentación en modalidad poster: **IX congreso de Asma Alergia e inmunología. Bogotá, Colombia 2013**
3. Presentación oral: **III LASID Meeting Santiago de Chile 2013**
4. Presentación en modalidad poster: **XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología y 4 Congreso Colombiano de Microbiología. Cartagena, Colombia 2014.**
5. Presentación en modalidad poster: **INMUNOCOLOMBIA 2015. 11th Congress of the Latin American Association of Immunology – ALAI. 10th Colombian Congress of Allergy, Asthma and Immunology - ACAAi**
6. Presentación en modalidad poster: **I LASID Meeting FAIC SAI Buenos Aires, Argentina 2015**

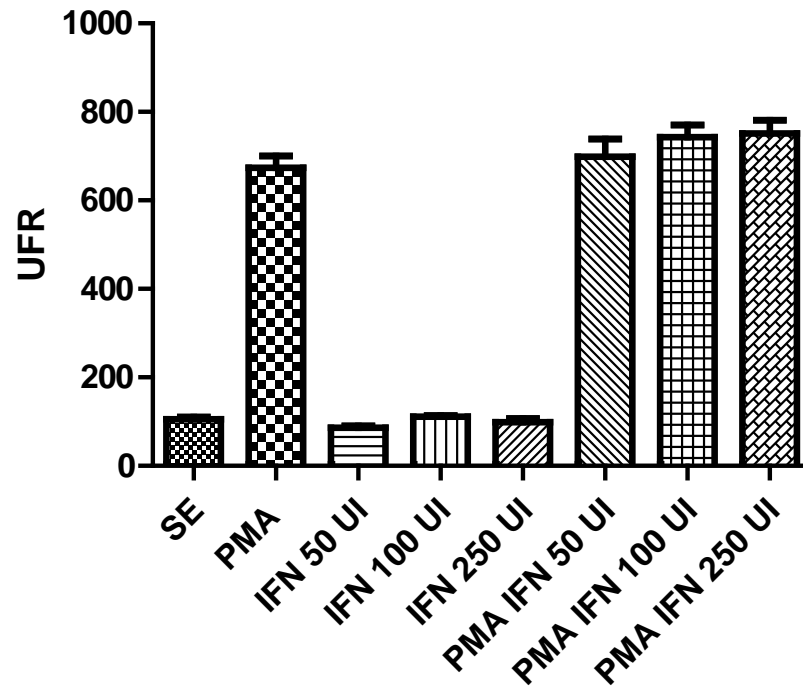
12 ANEXOS

ANEXO 1. Diagnóstico bioquímico de EGC mediante citometría de flujo



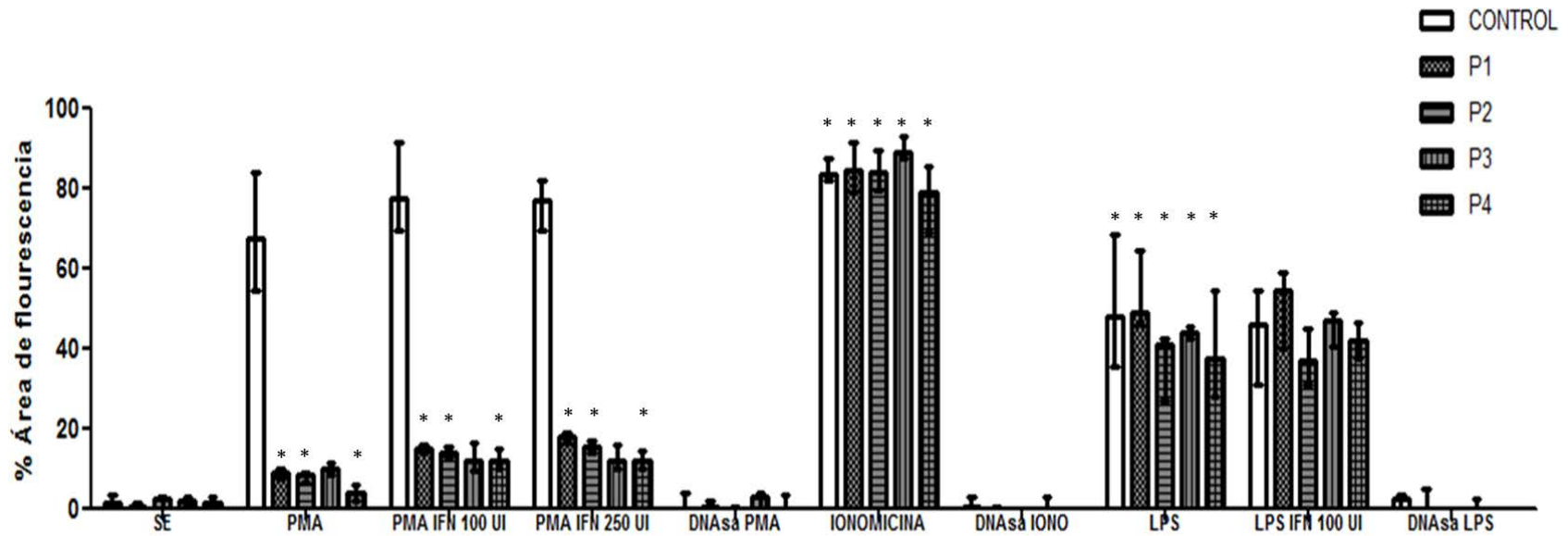
Cuantificación de la producción de especies reactivas del oxígeno por medio de citometría de flujo Los histogramas corresponden a la población de neutrófilos de un individuo sano y los 4 pacientes con EGC estudiados. La estimulación de las células con PMA 50 nM genera un incremento en la producción de ROS lo cual a su vez genera un aumento en la intensidad media de la fluorescencia debido a la oxidación de la molécula fluorescente DHR 1,2,3. En las células de los controles sanos hubo un aumento en la IMF e IE mientras que en los 4 pacientes con estos valores permanecieron disminuidos después de la estimulación con PMA 50 nM lo cual permite confirmar el diagnóstico de EGC.

ANEXO 2. Efecto de la dosis del IFN γ sobre la producción de trampas extracelulares



Determinación de la producción de NET mediante fluorimetría en células de individuos sanos pre-activadas con diferentes dosis de IFN γ . La gráfica corresponde a las células de 3 diferentes individuos sanos. Los PMNN fueron estimulados con 3 diferentes dosis de IFN γ y no se observan diferencias en la producción de trampas extracelulares. Igualmente se observa que el IFN γ por sí solo no induce la producción de NET.

ANEXO 3. Consolidado de la cuantificación de la producción de NET mediante análisis de imágenes



Cuantificación de la liberación de NET mediante análisis de imágenes. La gráfica corresponde al porcentaje de área ocupada por los NET después de someter a las células a varios estímulos. Cuando las células de los pacientes fueron estimuladas con PMA 50 nM hubo un incremento estadísticamente significativo con respecto a las células sin estímulo, sin embargo la producción es muy baja con respecto a los PMNN de los controles estimulados con PMA. Después de la pre-estimulación de los PMNN de los pacientes 1,2 y 4 con IFN γ 100 UI/mL o 250 UI/mL y posterior activación con PMA se observa una diferencia significativa con respecto a las células que solo fueron estimuladas con PMA. Cuando los PMNN de pacientes y controles fueron estimulados con ionomicina o LPS se observaron diferencias significativas con respecto a las células sin estímulo. $p < 0,01$ (*)

ANEXO 4. Artículo publicado en la Revista Cubana de Hematología Inmunología y Hemoterapia

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Función del sistema NADPH oxidasa en la formación de trampas extracelulares de los neutrófilos (NETs)

Role of nadph oxidase system in the neutrophil extracellular Traps (NETs) formation

Gabriel Jaime Vélez Tobón, Yermis Carolina Rocha Arrieta, Andrés Augusto Arias Sierra, Juan Álvaro López Quintero

Grupo de Inmunodeficiencias Primarias. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

RESUMEN

Las trampas extracelulares de los neutrófilos son estructuras fundamentalmente compuestas de cromatina y proteínas granulares, que una vez liberadas constituyen un mecanismo de defensa que tiene la capacidad de atrapar y destruir microorganismos patógenos. El proceso que libera estas estructuras es conocido como NETosis y en el caso que provoque muerte celular, esta es diferente a la apoptosis y a la necrosis. Si bien no se conocen todos los eventos moleculares involucrados en la formación de las NETs, se sabe que dependiendo del estímulo, las especies reactivas del oxígeno son esenciales para que ocurra la descondensación de la cromatina y se lleve a cabo el proceso de NETosis.

Palabras clave: trampas extracelulares de neutrófilos, NETs, enfermedad granulomatosa crónica, EGC.

ABSTRACT

Neutrophil extracellular traps (NETs) are structures mainly composed of chromatin and granule proteins that once released constitute a defense mechanism due to their ability to trap and destroy pathogen microorganisms. The process by which these structures are released is known as NETosis and in case this may lead to cell death is different to apoptosis and necrosis. Although all the molecular events involved in the formation of NETs are poorly understood, it is known that depending on the stimulus, reactive oxygen species (ROS) are essential to the chromatin decondensation and subsequent NETs formation.

Keywords: neutrophil extracellular traps, NETs, chronic granulomatous disease, CGD.

INTRODUCCIÓN

Los polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) son células que actúan como mediadores primarios ante una respuesta inflamatoria y realizan una función esencial en la defensa innata del hospedero frente a agentes patógenos. Uno de los principales mecanismos de destrucción de estas células es la fagocitosis de microorganismos y partículas extrañas que logran atravesar las barreras primarias de defensa, como piel y mucosas.^{1,2} Una vez que el microorganismo es fagocitado y se encuentra dentro del fagolisosoma, se inicia su destrucción mediante sustancias proteolíticas contenidas en los gránulos citoplasmáticos y por la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Estas últimas se generan a través de un proceso conocido como "explosión respiratoria", llevado a cabo por el complejo multienzimático NADPH oxidasa (del inglés, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*).³

El sistema NADPH oxidasa está localizado en la membrana celular y de los gránulos secundarios de los fagocitos y se compone de proteínas de membrana y citosólicas codificadas por genes independientes (tabla).⁴ El componente de membrana está conformado por las proteínas gp91^{phox} ("phox" del inglés *phagocyte oxidase*) y p22^{phox}, las cuales conforman el centro catalizador de la oxidasa conocido como *flavoheemocitocromo b₅₅₈*. En el citosol se encuentran las subunidades p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} y las proteínas reguladoras Rac1 y Rac2.³

La gp91^{phox} (conocida también como NOX2) es una glicoproteína de 91 kDa responsable de unir NADPH, FAD y grupos hemo, importantes para la transferencia de electrones hacia el oxígeno molecular que se encuentra en la vacuola fagocítica y la inducción de la producción de anión superóxido (O₂⁻). La proteína p22^{phox} (22 kDa), posee una región rica en prolina (PRR) que interactúa con un dominio de homología de las Src (SH3) que se encuentra en p47^{phox},⁵ esta proteína es la que permite que la gp91^{phox} se acople con las subunidades citosólicas y se inicie la producción de ROS.⁶

La p47^{phox} (47 kDa) interactúa con los demás componentes citosólicos del sistema oxidasa a través de dos dominios SH3, un PRR y un dominio PX, este último importante para su interacción con la membrana celular.⁷

Otro de los componentes citosólicos, la proteína p67^{phox} (67kDa), posee un dominio de activación esencial para la transferencia de electrones a través del centro reductor del *flavoheemocitocromo b₅₅₈*.⁸ Igualmente, la p67^{phox} posee dos dominios SH3 importantes para la interacción con p47^{phox}, un dominio de repeticiones tetratricopépticas (TPR) que facilita la interacción con la proteína Rac,⁹ y un dominio PB1 (*Px-phox* y *Bem1*) importante para la interacción entre p67^{phox} y p40^{phox}.¹⁰

Finalmente, se encuentra la proteína p40^{phox} (40 kDa), en la que se han

identificado tres dominios: PX, SH3 y PB1. La función de esta proteína en humanos es mantener acoplado el sistema oxidasa durante la activación y la producción de anión superóxido (O_2^-).¹¹

Como componentes reguladores de este complejo enzimático se encuentran las proteínas Rac1 y Rac2, las cuales, para estimular la producción de ROS, pasan de una forma inactiva unida a GDP a la forma activa unida a GTP.^{12,13}

ACTIVACIÓN DEL SISTEMA NADPH OXIDASA

Durante la fagocitosis o por la acción de agentes microbianos, citocinas o quimiocinas, se induce la activación del sistema NADPH oxidasa y la posterior producción de ROS. Este mecanismo comienza con la migración de las proteínas citosólicas (p47^{phox}, p67^{phox} y p40^{phox}) hacia la membrana citoplasmática o la membrana del fagolisosoma para unirse con el *flavohemocitocromo b₅₅₈*.

Durante esta activación, p47^{phox} es fosforilada mediante la acción de fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) y la proteína quinasa C (PKC). En este evento la participación de Rac es fundamental para la formación de un complejo enzimáticamente activo.^{4,14}

Una vez activo el sistema NADPH oxidasa, el *flavohemocitocromo b₅₅₈* transfiere electrones al oxígeno molecular (O_2) a partir de la molécula NADPH y gener el O_2^- (figura 1). Esta molécula puede transformarse por dismutación espontánea para generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2); o bien, esta reacción puede ser catalizada por la enzima superóxido dismutasa. Cuando reacciona el H_2O_2 con el O_2^- se da la formación de oxígeno "singlete" y radicales hidroxilo (HO); asimismo, el H_2O_2 le sirve de sustrato a la enzima mieloperoxidasa (MPO) para la formación, en presencia de cloro (Cl^-), de ácido hipocloroso (HClO).^{15,16} En consecuencia, debido a la formación de todos estos compuestos (conocidos como ROS), en el interior del fagolisosoma se crea un ambiente altamente tóxico para los microorganismos, lo que ocasiona su destrucción.¹⁶

ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA (EGC)

Cuando se presentan mutaciones en uno de los genes que codifican para las proteínas del sistema NADPH oxidasa, se produce la enfermedad granulomatosa crónica (EGC). Esta inmunodeficiencia primaria se caracteriza por la incapacidad que tienen los fagocitos como los PMNs, de producir ROS que conlleve a la eliminación de algunos microorganismos dentro del fagolisosoma.¹⁷ La EGC se presenta aproximadamente en 1 de cada 200 000 a 250 000 nacidos vivos¹⁸ y se caracteriza porque los pacientes presentan infecciones recurrentes causadas por *S aureus*, *Nocardiasp*, *A fumigatus*, *C albicans*, *C glabrata* y *P boydii*, que ocasionan úlceras crónicas, linfadenitis y neumonía; además se pueden afectar otros órganos como hígado, huesos, riñones, bazo y cerebro.^{17,19,20}

El patrón de herencia de la EGC puede estar ligado al cromosoma X (EGC-X) cuando se presentan mutaciones en el gen *CYBB* que codifica para gp91^{phox}; cuando los defectos están en los genes que codifican para los demás componentes del sistema oxidasa, el patrón de herencia es autosómico recesivo^{4,18,21}(tabla 1). Aproximadamente el 70 % de los casos de EGC son por mutaciones en el gen *CYBB*, que pueden ser causadas por deleciones (35,6 %), mutaciones con cambio de sentido (21,3 %), mutaciones sin sentido (14,1 %), mutaciones en los sitios de corte y empalme a nivel intrónico (17,6 %),

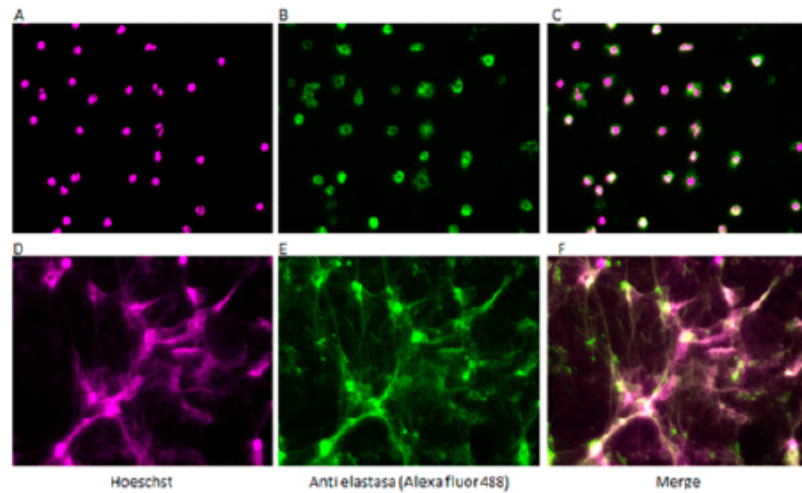
inserciones (7,9 %), inserción/delección (2,8 %) y mutaciones en las regiones promotoras (0,7 %).²²

Por otra parte, el 30 % corresponde a mutaciones autosómicas recesivas, de las cuales el 20 % se presentan en el gen *NCF1*, el 5 % por mutaciones en el gen *CYBA* y el otro 5 % es por alteraciones en el gen *NCF2*.^{18,23-25} Con respecto al gen *NCF4*, solo se han reportado defectos en un paciente que presentaba colitis granulomatosa y tenía defectos exclusivamente en la producción de O₂⁻ en el interior del fagosoma.¹²

El tratamiento de la EGC se basa en una terapia profiláctica con antibióticos y antimicóticos. Al combinar los anteriores tratamientos con el inmunomodulador interferón gamma (IFN γ) recombinante, el riesgo de infecciones graves puede reducirse hasta en el 70 %.^{26,27} El mecanismo de acción del IFN γ en estos pacientes aún no se conoce completamente; sin embargo, su administración se basa en el efecto que esta citocina tiene sobre las células fagocíticas, donde induce una mayor actividad del sistema NADPH oxidasa, debido posiblemente a un aumento de la generación de transcritos del gen *CYBB*.^{28, 29} No obstante, a pesar de la terapia antimicrobiana y el uso del IFN γ , los pacientes con EGC continúan presentando altas tasas de morbi-mortalidad, por lo que la única terapia curativa es el trasplante de células madre hematopoyéticas.^{17,30} Aunque se ha propuesto la terapia génica como una opción curativa para la EGC, esta ha tenido pobres resultados porque la recuperación en la producción de ROS por las células fagocíticas ha sido transitoria; además de la problemática en el desarrollo de un vector seguro que no genere efectos adversos como síndromes mielodisplásicos o cáncer.^{31,32}

TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS

En el 2004 fue descrito un nuevo mecanismo microbicida de los neutrófilos llamado trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), en el cual se induce la liberación de redes de cromatina en asociación con histonas, proteínas citoplasmáticas, del citoesqueleto o proteínas granulares hacia el medio extracelular para atrapar y destruir microorganismos patógenos.³³ Estructuralmente, las NETs se componen principalmente de una matriz de DNA con una longitud de 15 a 17 nm, sobre la cual se ubican dominios globulares con un diámetro de 25 nm. Se determinó que los principales componentes microbicidas son las histonas nucleares (H1, H2A, H2B, H3, H4) y proteínas granulares como elastasa (figura 2), MPO, catepsina G, lactoferrina, proteínas bactericidas de aumento de la permeabilidad (BPI), gelatinasa, defensina, catelicidina, pentraxina 3, lisozima C.³⁴ También se ha descrito la presencia de proteínas del citoesqueleto (α -actina, miosina 9, plastina, citoqueratina 10), del citoplasma (calprotectina, calgrulina), enzimas del peroxisoma (catalasa) y glicolíticas (α -enolasa, transcetolasa).³⁴⁻³⁸



(Las fotos corresponden a estudios realizados en nuestro laboratorio y son originales e inéditas de esta publicación.)

Fig. 2. Liberación de NETs en PMNs de un individuo sano estimulados con PMA. (*phorbolmyristateacetate*). (A-C) PMNs sin estímulo. (D-F) PMNs estimulados con PMA 50 nM durante 2 horas, en estas imágenes se observa como la elastasa (de color verde) sigue el mismo patrón que el DNA (color violeta) lo cual indica que estas proteínas se mezclan con la cromatina para cumplir su función microbicida.

El proceso de liberación de NETs se describe como un proceso que induce la muerte del neutrófilo o no la provoca, y se clasifica en NETosis lítica y NETosis vital.³⁹ La NETosis lítica es aquella donde se libera el ADN mezclado con las diferentes proteínas al medio extracelular a través de la ruptura de la membrana plasmática del neutrófilo. Dentro de la NETosis vital se han descrito dos mecanismos: el primero, descrito en el 2009 por Yousefi y col, plantea que la estimulación con factor estimulante de colonia de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y ligandos de TLR-4 o C5a, inducen la liberación NETs por neutrófilos viables; estas NETs están compuestas de ADN mitocondrial y no nuclear⁴⁰. Sin embargo, la gran mayoría de artículos de NETs reportan la presencia de ADN nuclear e histonas y contradicen los resultados de este artículo, por la poca cantidad de mitocondrias en los PMNs, por el pequeño tamaño del genoma mitocondrial y por la ausencia de histonas antimicrobianas en estas NETs.⁴¹ El segundo mecanismo fue descrito con *S aureus*, donde los neutrófilos forman y liberan al medio extracelular vesículas que contienen ADN; en ese medio se explotan y liberan su contenido en forma de red que atrapa y elimina las bacterias.⁴²

Cuando la NETosis ocasiona la muerte del neutrófilo, esta es diferente, tanto de la apoptosis como de la necrosis y presenta las siguientes características:

- La formación de NETs se da 10 minutos después de la activación, un tiempo más corto que la presentación de la apoptosis;
- durante la NETosis no se ha descrito la activación o participación de caspasas;
- no hay fragmentación del ADN, ni exposición de fosfatidilserina; y
- en el proceso de producción de NETs hay pérdida de la integridad de la

membrana nuclear mientras que en la necrosis no la hay.³⁸

Se conoce que el mecanismo molecular que induce la NETosis es mediado por el tipo de estímulo y la activación de receptores específicos de los neutrófilos que desencadena una cascada de señalización mediada por la PKC, la vía Raf- MEK- ERK, la activación del sistema NADPH oxidasa y la formación de ROS. Este último paso es indispensable para la liberación de NETs inducida por ciertos estímulos.⁴³

ALTERACIONES EN LA PRODUCCION DE NETs

En los PMNs de neonatos prematuros hay una inmunodeficiencia fisiológica en la que se presenta un deterioro de la fagocitosis, alteraciones en la destrucción de bacterias intracelulares y una disminución en la producción de ROS. Como consecuencia de lo anterior y en relación con el defecto en la producción de ROS, las células de estos individuos son incapaces de producir NETs, comparados con los PMNs de neonatos a término o adultos sanos.⁴⁴ También se han reportado defecto en la producción de NETs, en el otro extremo de la vida, los ancianos.

En el 2014, Hazeldine y col realizaron un estudio con PMNs de individuos jóvenes (media de edad 25 años) e individuos ancianos (media de edad 70 años), y demostraron que la producción de NETs en individuos ancianos era menor en comparación con la de los individuos jóvenes, luego de que los PMNs fueran preactivados con factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y posteriormente estimulados con lipopolisacárido (LPS) o interleucina 8 (IL-8). Igualmente, evidenciaron que los PMNs de los ancianos producían menos cantidad de ROS comparado con los individuos jóvenes y que, por tanto, este podía ser un mecanismo que explicara la reducción de las NETs en esta población.⁴⁵

Otra de las alteraciones que conduce a un defecto en la producción de NETs es la deficiencia de la MPO. Como se ha mencionado, esta enzima participa en la descondensación de la cromatina y en la formación de ROS, gracias a que cataliza la producción de HClO a partir del H₂O₂ y Cl⁻. En individuos con deficiencia absoluta de MPO no hay producción de NETs debido a que no se logra la formación del HClO; este radical oxidante está involucrado en la cloración de las histonas y la posterior descondensación de la cromatina, como también en la ruptura de la membrana nuclear, lo que permite la salida del ADN hacia el citoplasma, donde se mezcla con los gránulos citoplasmáticos para la formación de las NETs.^{16,46}

Finalmente, se conoce que las alteraciones en la explosión respiratoria de pacientes con EGC conducen a un bloqueo en la producción de NETs, como se explicará en el siguiente apartado.^{33,47}

NETs, SISTEMA NADPH OXIDASA Y ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA

La función de los ROS en la inducción de NETs ha sido motivo de controversia en los últimos años. Por un lado, varios estudios han demostrado que los neutrófilos obtenidos de pacientes con EGC no tienen la capacidad de liberar NETs; un ejemplo de esto es el estudio de Fuchs y col, donde se demostró que al estimular con ésteres de forbol (*PMA, phorbolmyristateacetate*) neutrófilos de individuos con EGC, no se producía NETosis. Además, en el mismo estudio se observó que dicho efecto se podía revertir al adicionar glucosa oxidasa (GO) como fuente productora de H₂O₂ exógeno.³⁸ Igualmente, Brinkmann observó

este mismo fenómeno en sus estudios iniciales.³³ Asimismo, Bianchi y col observaron cómo un paciente con EGC-X sometido a terapia génica recuperó la actividad del sistema NADPH oxidasa y parcialmente la producción de NETs. La actividad microbicida contra *A nidulans* y *Candida spp* mejoró notoriamente, dado que las NETs inhibieron en el 80 % la germinación de las conidias, y en el 40 %, el crecimiento de las hifas; estos resultados son contundentes en cuanto a la función vital que cumplen las ROS y las NETs en la inmunidad innata.⁴⁷

Se conoce que al tratar con IFN γ a los PMNs humanos se induce un aumento en la producción de ROS, un perfil génico diferencial; es decir, se expresan genes que responden al estímulo con IFN γ . Martinelli y col determinaron la función del IFN γ para la activación de los neutrófilos. Utilizando un ensayo con micromatrices se demostró cómo los PMNs maduros, a diferencia de aquellos en los estadios más inmaduros, expresaban una mayor cantidad de genes de respuesta al estímulo con IFN γ . Igualmente, describió cómo los interferones tipo 1 y 2 preactivaban los PMNs maduros y de esta manera, al ser estimulados con el factor del complemento C5a, producían NETs.⁴⁸

La actividad del IFN γ es mediada por una cascada de señalización donde la JAK1-2 y STAT1- α (cuyas funciones están relacionadas con la regulación de la expresión génica) intervienen en la regulación de la transcripción del gen *CYBB* y posterior exportación de transcritos desde el núcleo hacia el citoplasma.⁴⁹ También se ha demostrado que el IFN γ puede intervenir en la modulación del *splicing* alternativo, lo cual corrige de manera parcial la actividad oxidativa de PMNs de individuos con EGC.⁵⁰ Se ha observado que estimula células progenitoras, lo que favorece la aparición de una población de fagocitos con un incremento en su función oxidativa hasta 28 días después del estímulo inicial con esta citosina.⁵¹ En otro estudio realizado en ratones, se muestra la importancia del IFN γ para combatir las infecciones por *S pneumoniae*, al activar la NETosis. En cepas IFN $\gamma^{-/-}$ hay una disminución significativa en la producción de NETs; este mismo fenómeno fue observado en un modelo de ratones de EGC que carecían de gp91^{phox}.⁵²

Por otra parte, Remijsen y col demostraron cómo la inducción de NETosis mediante la utilización de PMA se relacionaba con la producción de ROS y con la autofagia, y afirmaron que ningún mecanismo era capaz de inducir NETosis de forma aislada. Así, la inhibición de la autofagia impide la descondensación de la cromatina e inhibe la de la NETosis, a pesar de que la producción de O $_2^-$ no se ve afectada, lo cual quiere decir que la actividad del sistema NADPH oxidasa es necesaria pero no suficiente para la inducción de la NETosis. Igualmente, demostraron que al inducir autofagia en los PMNs de individuos con alteraciones en la producción de ROS, no se presentaba descondensación de la cromatina, típica de la NETosis.⁵³

En resumen, se han reportado cuatro líneas de evidencia que soportan el papel de las ROS en este mecanismo.

1. Se conoce que el H $_2$ O $_2$ es un potente inductor de NETs en concentraciones fisiológicas y a diferencia del O $_2^-$, es permeable a la membrana celular y tiene una vida media más prolongada, lo que sugiere que el H $_2$ O $_2$ exógeno también podría estar involucrado en la generación de NETs.
2. La inhibición farmacológica del sistema NADPH oxidasa con difenilyodonio (DPI) bloquea la formación de NETs; sin embargo, esta acción se puede revertir

al inducir la generación de H₂O₂ exógeno por medio de GO adicionada a los PMNs.

3. El efecto inductor de NETs por medio de H₂O₂ se puede regular negativamente al adicionar catalasa al sistema; este efecto puede ser restablecido al adicionar un inhibidor de la catalasa (3-amino-1, 2,4-triazol), lo cual permite que los PMNs recuperen su capacidad de formar NETs.

4. Se ha demostrado que neutrófilos de individuos con EGC no producen NETs.^{38,42}

La función de otras ROS en la formación de NETs también se ha demostrado; se ha encontrado que la ausencia de cloro (Cl⁻) extracelular disminuye la producción de NETs, mientras que con la adición de HClO se recupera la capacidad de inducir NETosis.¹⁶

En el año 2010, Pilszczek y col describieron cómo la *citolisina panton valentine leucocidina* (PVL) de *Staphylococcus aureus* indujo la liberación de NETs en un mecanismo independiente de producción de ROS; en este caso se demostró que la liberación del DNA se produjo de una forma no lítica a través de vesículas, como anteriormente se mencionó.⁴² En este mismo año, Marcos V y col demostraron que la estimulación de PMNs con ligandos de CXCR2 induce la formación de NETs, un proceso que involucra quinasas de la familia Src pero que es independiente del sistema NADPH oxidasa.⁵⁴

En el 2012, Parker y col demostraron que la ionomicina, un ionóforo de calcio, induce NETs independiente del sistema NADPH oxidasa. También demostraron que los PMNs obtenidos de un paciente con deficiencia de MPO produjeron NETs cuando se estimularon con PMA y *P aeruginosa*. Con PMA se produjo menos NETs en los PMNs del paciente, en comparación con un individuo sano, pero no hubo diferencias en la formación de NETs entre las células del individuo sano y las del paciente cuando se estimulaba con *P aeruginosa*; por tanto, concluyeron que las NETs pueden ser inducidas por diferentes estímulos pero no por un mecanismo común.⁵⁵

La producción de NETs a través de mecanismos independientes del oxígeno también fue reportada en 2013 por Byrd y col en un modelo de *C albicans*. En este estudio se demostró cómo el reconocimiento del β-glucano a través del receptor CR3 conduce a una rápida liberación de NETs (antes de 30 minutos), siempre y cuando los neutrófilos estén en contacto con el β-glucano y componentes de la matriz extracelular.⁵⁶

En el 2014, Arai y col investigaron el efecto del ácido úrico en la formación de NETs. Ellos encontraron que bajas concentraciones de ROS inhiben la formación de NETs dependiente de Nox; sin embargo, altas concentraciones de ácido úrico, más que inhibir las NETs inducen su formación de una manera independiente de Nox. Este hallazgo fue confirmado cuando se realizaron los experimentos con PMNs de pacientes con EGC.⁵⁷

A partir del descubrimiento de la producción de NETs, estas estructuras han sido ampliamente estudiadas en diferentes modelos y se ha logrado establecer como un mecanismo de muerte celular independiente de la apoptosis y la necrosis. A pesar de que aún no se conocen todos los eventos moleculares que permiten que se lleve a cabo la NETosis, se sabe que tanto la autofagia, la producción de ROS, como la descondensación de la cromatina, permiten la liberación de las NETs. La actividad microbicida de los componentes de las NETs ha sido bien

caracterizada, pues se sabe que las proteínas nucleares como histonas o enzimas como la elastasa y la MPO, tienen alto poder microbicida, lo que contribuye a la eliminación de agentes patógenos. La estructura de la NET también es importante, ya que funciona como una red que atrapa el microorganismo e impide su diseminación.

A pesar del desarrollo en la investigación de los mecanismos de destrucción que utilizan los PMNs en la respuesta inmune, aún se debe ampliar el estudio de los mecanismos de destrucción de estas células y su comportamiento en ciertas enfermedades. En el caso de la EGC, el sistema NADPH oxidasa y sus defectos genéticos han sido ampliamente estudiados, sin llegar a conocerse todos los aspectos moleculares que rodean esta inmunodeficiencia. Si bien se han logrado importantes avances en las alternativas terapéuticas, el mecanismo del IFN γ todavía no está claro.

Actualmente no hay reportes que relacionen directamente el efecto del IFN γ en PMNs de pacientes con EGC en los que se esperaría ver una recuperación parcial en la capacidad de producir NETs. Asimismo, el descubrimiento de la NETosis genera un campo de acción en el que se podrían estudiar mecanismos inmunorreguladores que potencien la actividad de las células fagocíticas frente a microorganismos patógenos o que regulen su producción con el fin de evitar efectos adversos de la NETosis. Aunque la EGC es una enfermedad de baja incidencia, se debe profundizar en la investigación de los factores asociados con la explosión respiratoria y la NETosis, lo cual contribuiría a dilucidar aspectos relacionados con mejores alternativas terapéuticas y consejería genética.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de interés en la publicación de este artículo.

FINANCIACIÓN

Este artículo fue posible gracias a la financiación del Departamento Administrativo de Ciencia Tecnología e Innovación COLCIENCIAS al proyecto 111554531412.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010;33(5):657-70.
2. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(3):159-75.
3. de Oliveira-Junior EB, Bustamante J, Newburger PE, Condino-Neto A. The human NADPH oxidase: primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. *Scand J Immunol*. 2011;73(5):420-7.
4. Arango JC, Gámez LY, López JÁ. Sistema NADPH oxidasa: nuevos retos y perspectivas. *Iatreia*. 2010;23(4):362-72.
5. Ueyama T, Tatsuno T, Kawasaki T, Tsujibe S, Shirai Y, Sumimoto H, et al. A regulated adaptor function of p40phox: distinct p67phox membrane targeting by p40phox and by p47phox. *Mol Biol Cell*. 2007;18(2):441-54.
6. Tahara T, Shibata T, Wang F, Nakamura M, Sakata M, Nakano H, et al. A

genetic variant of the p22PHOX component of NADPH oxidase C242T is associated with reduced risk of functional dyspepsia in Helicobacter pylori-infected Japanese individuals. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2009;21(12):1363-8.

7. Xu W, Ma L, Li W, Brunson TA, Tian X, Richards J, et al. Functional pseudogenes inhibit the superoxide production. *Precis Med.*[En línea] 2015 [citado el 02 de mayo de 2015];1(1). Disponible en: http://www.smartscitech.com/index.php/pm/article/view/745/pdf_7

8. Streeter J, Schickling BM, Jiang S, Stanic B, Thiel WH, Gakhar L, et al. Phosphorylation of Nox1 regulates association with NoxA1 activation domain. *Circ Res.* 2014;115(11):911-8.

9. Brennan AM, Suh SW, Won SJ, Narasimhan P, Kauppinen TM, Lee H, et al. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat Neurosci.* 2009;12(7):857-63.

10. Roesler J, Segerer F, Morbach H, Kleinert S, Thieme S, Rösen-Wolff A, et al. P67-phox (NCF2) lacking exons 11 and 12 is functionally active and leads to an extremely late diagnosis of chronic granulomatous disease (CGD). *PLoS One.* [En línea] 2012 [Citado el 12 de enero de 2015];7(4). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3326000/pdf/pone.0034296.pdf>

11. Matute JD, Arias AA, Dinauer MC, Patiño PJ. p40phox: the last NADPH oxidase subunit. *Blood Cells Mol Dis.* 2005;35(2):291-302.

12. Matute JD, Arias AA, Wright NA, Wrobel I, Waterhouse CC, Li XJ, et al. A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood.* 2009;114(15):3309-15.

13. Miyano K, Sumimoto H. Role of the small GTPase Rac in p22phox-dependent NADPH oxidases. *Biochimie.* 2007;89(9):1133-44.

14. Brandes RP, Weissmann N, Schröder K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med.* 2014;76:208-26.

15. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(3):181-9.

16. Akong-Moore K, Chow OA, von Köckritz-Blickwede M, Nizet V. Influences of chloride and hypochlorite on neutrophil extracellular trap formation. *PLoS One.* [En línea] 2012 [Citado el 18 de febrero de 2015] ;7(8). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3418225/pdf/pone.0042984.pdf>

17. Holland SM. Chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2013;27(1):89-99.

18. Roos D, de Boer M. Molecular diagnosis of chronic granulomatous disease. *Clin Exp Immunol.* 2014;175(2):139-49.

19. Blumental S, Mouy R, Mahlaoui N, Bougnoux ME, Debré M, Beauté J, et al. Invasive mold infections in chronic granulomatous disease: a 25-year retrospective survey. *Clin Infect Dis.* 2011;53(12):159-69.

20. Song E, Jaishankar GB, Saleh H, Jithpratuck W, Sahni R, Krishnaswamy G. Chronic granulomatous disease: a review of the infectious and inflammatory complications. *Clin Mol Allergy.* [En línea] 2011 [Citado el 04 de marzo de 2015];9(1):10. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3128843/pdf/1476-7961-9-10.pdf>

21. Battersby AC, Cale AM, Goldblatt D, Gennery AR. Clinical manifestations of disease in X-linked carriers of chronic granulomatous disease. *J Clin Immunol*. 2013;33(8):1276-84.
22. Roos D, Kuhns DB, Maddalena A, Roesler J, Lopez JA, Ariga T, et al. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update). *Blood Cells Mol Dis*. 2010;45(3):246-65.
23. Jakobsen MA, Katzenstein TL, Valerius NH, Roos D, Fisker N, Mogensen TH, et al. Genetical analysis of all Danish patients diagnosed with chronic granulomatous disease. *Scand J Immunol*. 2012;76(5):505-11.
24. Martel C, Mollin M, Beaumel S, Brion JP, Coutton C, Satre V, et al. Clinical, Functional and Genetic Analysis of Twenty-Four Patients with Chronic Granulomatous Disease - Identification of Eight Novel Mutations in CYBB and NCF2 Genes. *J Clin Immunol*. 2012;32(5):942-58.
25. Ramírez-Vargas NG, Berrón-Ruiz LR, Berrón-Pérez R, Blancas-Galicia L. [Chronic granulomatous disease diagnosis: Patients and carriers]. *Rev Alerg Mex*. 2011;58(2):120-5.
26. Errante PR, Frazão JB, Condino-Neto A. The use of interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2008;3(3):225-30.
27. Smith NL, Denning DW. Clinical implications of interferon- γ genetic and epigenetic variants. *Immunology*. 2014;143(4):499-511.
28. Filiz S, Uygun DF, Köksoy S, Şahin E, Yeğın O. In vitro interferon γ improves the oxidative burst activity of neutrophils in patients with chronic granulomatous disease with a subtype of gp91phox deficiency. *Cent Eur J Immunol*. 2015;40(1):54-60.
29. Condino-Neto A, Newburger PE. Interferon-gamma improves splicing efficiency of CYBB gene transcripts in an interferon-responsive variant of chronic granulomatous disease due to a splice site consensus region mutation. *Blood*. 2000;95(11):3548-54.
30. Kang EM, Marciano BE, DeRavin S, Zarembek KA, Holland SM, Malech HL. Chronic granulomatous disease: overview and hematopoietic stem cell transplantation. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(6):1319-26.
31. Seger RA. Chronic granulomatous disease: recent advances in pathophysiology and treatment. *Neth J Med*. 2010;68(11):334-40.
32. Segal BH, Veys P, Malech H, Cowan MJ. Chronic granulomatous disease: lessons from a rare disorder. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(1 Suppl):S123-31.
33. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5.
34. 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*. [En línea] 2009 [Citado el 13 de marzo de 2015];5(10). Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1083879110003885>
35. Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Wardini AB, Pinto-da-Silva LH, Saraiva EM. ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death. *J Parasitol*

Res.[En línea] 2012[Citado el 06 de marzo de 2015];2012. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3321301/pdf/JPR2012-929743.pdf>

36. Medina E. Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host. *J Innate Immun.* 2009;1(3):176-80.
37. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol.* 2012;198(5):773-83.
38. 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.
39. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood.* 2013;122(16):2784-94.
40. Yousefi S, Mihalache C, Kozłowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2009;16(11):1438-44.
41. Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ.* 2011;18(4):581-8.
42. Pilsczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 2010;185(12):7413-25.
43. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(8):577-82.
44. Yost CC, Cody MJ, Harris ES, Thornton NL, McInturff AM, Martinez ML, et al. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood.* 2009;113(25):6419-27.
45. Hazeldine J, Harris P, Chapple IL, Grant M, Greenwood H, Livesey A, et al. Impaired neutrophil extracellular trap formation: a novel defect in the innate immune system of aged individuals. *Aging Cell.* 2014;13(4):690-8.
46. 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.
47. Bianchi M, Niemiec MJ, Siler U, Urban CF, Reichenbach J. Restoration of anti-*Aspergillus* defense by neutrophil extracellular traps in human chronic granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-dependent. *J Allergy Clin Immunol.* [En línea] 2011 [Citado el 08 de marzo de 2015];127(5). Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674911000662>
48. Martinelli S, Urosevic M, Daryadel A, Oberholzer PA, Baumann C, Fey MF, et al. Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation. *J Biol Chem.* 2004;279(42):44123-32.
49. Contursi C, Wang IM, Gabriele L, Gadina M, O'Shea J, Morse HC, et al. IFN consensus sequence binding protein potentiates STAT1-dependent activation of IFN γ -responsive promoters in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(1):91-6.
50. Newburger PE, Ezekowitz RA, Whitney C, Wright J, Orkin SH. Induction of phagocyte cytochrome b heavy chain gene expression by interferon γ .

Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(14):5215-9.

51. Ezekowitz RA, Sieff CA, Dinauer MC, Nathan DG, Orkin SH, Newburger PE. Restoration of phagocyte function by interferon-gamma in X-linked chronic granulomatous disease occurs at the level of a progenitor cell. *Blood*. 1990;76(12):2443-8.

52. Yamada M, Gomez JC, Chugh PE, Lowell CA, Dinauer MC, Dittmer DP, et al. Interferon- γ production by neutrophils during bacterial pneumonia in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(10):1391-401.

53. Remijsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, et al. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res*. 2011;21(2):290-304.

54. Marcos V, Zhou Z, Yildirim AO, Bohla A, Hector A, Vitkov L, et al. CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nat Med*. 2010;16(9):1018-23.

55. Parker H, Dragunow M, Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J Leukoc Biol*. 2012;92(4):841-9.

56. Byrd AS, O'Brien XM, Johnson CM, Lavigne LM, Reichner JS. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *J Immunol*. 2013;190(8):4136-48.

57. Arai Y, Nishinaka Y, Arai T, Morita M, Mizugishi K, Adachi S, et al. Uric acid induces NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;443(2):556-61.

Recibido: mayo 07, 2015.

Aceptado: septiembre 10, 2015.

Gabriel Jaime Vélez Tobón . Grupo Inmunodeficiencias Primarias – IDP. Centro Jeffrey Modell para Diagnóstico e Investigación JMCN. Calle 62 # 52-59 Sede de investigación Universitaria SIU. Medellín - Colombia. Teléfono: 57-4-219647
Email: gjvelez@gmail.com