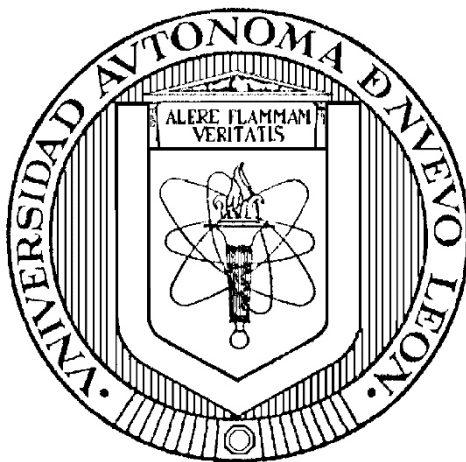


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“BÚSQUEDA DE MOLÉCULAS INDUCTORAS DE TRAMPAS
EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETs) EN AISLADOS
CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* PROVENIENTES DE PACIENTES
CON FIBROSIS QUÍSTICA”**

PRESENTA

Q.F.B. SAIRA ROCÍO MARTÍNEZ ALEMÁN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA
MÉDICA**

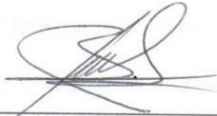
AGOSTO 2016

**“BÚSQUEDA DE MOLÉCULAS INDUCTORAS DE TRAMPAS
EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETs) EN AISLADOS
CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* PROVENIENTES DE PACIENTES
CON FIBROSIS QUÍSTICA”**

Aprobación de la Tesis:



Dr. C. Alejandro Sánchez González
Director de Tesis



Dr. C. Romel Hernández Bello
Co-director de Tesis



Dr. C. José Prisco Palma Nicolás
Miembro de la comisión



Dr. med. Raquel Garza Guajardo
Subdirectora de Estudios de Posgrado

**“BÚSQUEDA DE MOLÉCULAS INDUCTORAS DE TRAMPAS
EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETs) EN AISLADOS
CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* PROVENIENTES DE PACIENTES
CON FIBROSIS QUÍSTICA”**

Presentado por: Q.F.B. Saira Rocío Martínez Alemán

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bacteriología del centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRCEI) adscrito al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Alejandro Sánchez González.



Dr. C. Alejandro Sánchez González
Director de Tesis

"La ciencia y la vida no pueden ni deben estar separadas. Para mí la ciencia da una explicación parcial de la vida. Tal como es, se basa en los hechos, la experiencia y los experimentos. Estoy de acuerdo en que la fe es fundamental para tener éxito en la vida, pero no acepto tu definición de fe, la creencia de que hay vida tras la muerte. En mi opinión, lo único que necesita la fe es el convencimiento de que esforzándonos en hacer lo mejor que podemos nos acercaremos al éxito, y que el éxito de nuestros propósitos, la mejora de la humanidad de hoy y del futuro, merece la pena de conseguirse".

Rosalind Franklin

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado con Amor a
Mi hijo Mateo y a los niños con Fibrosis Quística

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Dios por no dejarme sola, por guiar mis pasos y darme la salud y sabiduría que necesito para obtener el éxito que sin él no sería posible.

A mis queridos padres Agustina y Ernesto por cuidar a mi hijo Mateo y apoyar mis decisiones, aunque eso implique vivir lejos de ellos. Gracias por el amor infinito y el apoyo incondicional que siempre me han brindado.

A mi esposo Raúl por el amor, apoyo y comprensión que me proporcionó durante esta etapa, por no dejarme caer y animarme todos los días para lograr mis metas.

A toda mi familia por apoyarme y echarme porras desde el inicio de esta aventura y por creer en mí.

A la Dra. Gloria González por la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado en el departamento de Microbiología.

A mi comisión de tesis: el Dr. Alejandro por su apoyo incondicional, por ayudarme tanto en lo profesional como en lo personal, por creer en mis capacidades y brindarme todo su conocimiento. Al Dr. Romel Hernández y Dr. José Palma por sus consejos y apoyo para la realización de este proyecto.

A mis profesores del departamento de Microbiología, al Dr. Miguel Becerril y la Dra. Mariana Elizondo por compartir sus conocimientos que me han ayudado a mejorar en el área de la ciencia.

Al equipo NETs: M.C. Lizbeth Campos, Q.F.B. Daniela Reyes y Q.B.P. Cynthia Tamez, por darme su valiosa amistad, por el cariño que me han otorgado y por ayudarme en la realización de mis experimentos.

A mis amigos del departamento de Inmunología: la Q.F.B. Flora Cruz por su amistad entrañable y el Q.F.B. Armando Flores por darme asistencia, prestarme sus libros y por su valiosa amistad desde hace ocho años.

Al personal del CRCEI: Q.C.B. Lydia Oviedo, Q.C.B. Alma Medrano, Q.B.P. Noemí Huerta, Q.B.P. Aurora Luna, Q.B.P. Miguel Gaza, Q.B.P. Luis Rodríguez, M.C. Álvaro Colín, M.C. Byron Bodden y M.C. Luis Cortez por el apoyo que me brindaron durante mi estancia en el laboratorio.

Al personal del área de almacén: M.C. Agustina de los Santos, Q.C.B. Karina Tijerina, y al personal técnico Ángeles Quijano y Andrés Silva, por su ayuda en la preparación de reactivos y material y por tener siempre un trato amable hacia mí.

A mis compañeros del departamento de Microbiología: Dr. Rogelio Treviño, M.C. Alexandra Montoya, I.B.Q. Sonia Aguilar, Q.B.P. Carolina Luna, Q.C.B. Gerardo García, Q.B.P. Vanesa Escalona, Q.F.B. Orlando Flores y Q.B.P. Fernando Espinosa.

¡MUCHAS GRACIAS!

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN	1-19
1.1 Fibrosis quística (FQ)	1
1.2 Características del neutrófilo	4
1.3 Mecanismos de muerte del neutrófilo	5
1.3.1 Fagocitosis	6
1.3.2 Degranulación	7
1.4 Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs)	10
1.4.1 Formación de los NETs	10
1.4.2 Estructura y morfología de los NETs	12
1.4.3 Función de los NETs	13
1.5 Los NETs en la fibrosis quística	14
1.6 Características generales de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
1.6.1 Pigmentos difusibles en la inducción de NETs	17
1.6.2 Exoenzimas en la inducción de NETs	18
2. JUSTIFICACIÓN	20
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS	22

4.1 Objetivo general	22
4.2 Objetivos específicos	22
5. MATERIAL Y MÉTODOS	23-38
5.1 Estrategia general	23
5.2 Identificación fenotípica de <i>P. aeruginosa</i>	24
5.2.1 Reactivación de las cepas de <i>P. aeruginosa</i>	24
5.2.2 Tinción de Gram	25
5.2.3 Prueba de oxidasa	26
5.2.4 Producción de hemolisinas	27
5.3 Cepas mutantes de <i>P. aeruginosa</i>	27
5.4 Preparación de las diluciones de <i>P. aeruginosa</i>	27
5.5 Inducción de NETs por la especie <i>P. aeruginosa</i> y sus productos secretados al medio de cultivo	30
5.5.1 Obtención y purificación de neutrófilos	30
5.5.2 Inducción de NETs	32
5.5.3 Cuantificación del ADN extracelular por fluorometría	32
5.5.4 Cuantificación de la expansión nuclear del neutrófilo	33
5.6 Cuantificación de proteínas del sobrenadante de los aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i> por el método de Bradford	35
5.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	37
5.8 Análisis estadístico	38

6. RESULTADOS	39-97
6.1 Identificación fenotípica de <i>P. aeruginosa</i>	39
6.2 Determinación de la multiplicidad de infección para los ensayos de inducción de NETs por <i>P. aeruginosa</i>	44
6.3 Inducción de NETs por los aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i>	47
6.3.1 Cuantificación por expansión nuclear de los NETs inducidos por aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i>	47
6.3.2 Análisis de percentiles para la inducción de NETs por aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i>	64
6.3.3 Cuantificación por fluorometría de los NETs inducidos por aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i>	73
6.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) del sobrenadante de los aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i>	78
6.5 Inducción de NETs por las cepas mutantes de <i>P. aeruginosa</i>	80
6.5.1 Cuantificación por expansión nuclear del neutrófilo de los NETs inducidos por las cepas mutantes de <i>P. aeruginosa</i>	80
6.5.2 Cuantificación por fluorometría de los NETs inducidos por las cepas mutantes de <i>P. aeruginosa</i>	88
6.6 Inducción de NETs por <i>Escherichia coli</i>	92

6.6.1 Cuantificación por expansión nuclear del neutrófilo de los NETs inducidos por <i>E. coli</i>	92
6.6.2 Cuantificación por fluorometría de los NETs inducidos por <i>E. coli</i>	96
7. DISCUSIÓN	98-105
8. CONCLUSIÓN	106
9. PERSPECTIVAS	107
10. REFERENCIAS	108-114
APÉNDICES	115-118
Apéndice A. Lista de aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i> utilizados durante el estudio	115
Apéndice B. Mutantes por inserción de transposón de <i>P. aeruginosa</i>	116
Apéndice C. Preparación de soluciones y reactivos	117

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Morfología nuclear del neutrófilo.	13
2. Mecanismo propuesto para la formación de NETs a través de las fosfolipasas.	19
3. Tinción de Gram y prueba de oxidasa.	40
4. Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> en medios de cultivo.	42
5. Producción de pigmentos por los aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> en medio de cultivo líquido LB.	43
6. Inducción de NETs por diferentes MOIs de <i>P. aeruginosa</i> .	45
7. Inducción de NETs por diferentes concentraciones del sobrenadante filtrado de <i>P. aeruginosa</i> .	46
8. Gráfica de expansión nuclear del neutrófilo en NETosis y las diferentes morfologías que presentan los NETs.	48
9. Inducción de NETs por aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> del experimento I.	50
10. Inducción de NETs por el sobrenadante de los aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> del experimento I.	51
11. Inducción de NETs por aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> del experimento II.	53
12. Inducción de NETs por el sobrenadante de los aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> del experimento II.	54

13. Inducción de NETs por el sobrenadante de los aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> del experimento III.	56
14. Inducción de NETs por el sobrenadante de los aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> del experimento III.	57
15. Inducción de NETs por aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> del experimento IV.	59
16. Inducción de NETs por el sobrenadante de los aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> del experimento IV.	60
17. Inducción de NETs por aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> del experimento V.	62
18. Inducción de NETs por el sobrenadante de los aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> del experimento V.	63
19. Expansión nuclear del neutrófilo, a partir de la inducción de NETs con morfología delobulada de los aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i> .	66
20. Expansión nuclear del neutrófilo, a partir de la inducción de NETs con morfología delobulada de los productos secretados por los aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i> .	67
21. Expansión nuclear del neutrófilo, a partir de la inducción de NETs con morfología de NET difuso de los aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i> .	69

22. Expansión nuclear del neutrófilo, a partir de la inducción de NETs con morfología de NET difuso de los productos secretados por los aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i> .	70
23. Clasificación de acuerdo al nivel de inducción de NETs por aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> y sus productos secretados.	72
24. Cuantificación del ADN extracelular utilizando los aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> .	76
25. Cuantificación del ADN extracelular empleando el sobrenadante de los aislados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> .	77
26. SDS-PAGE del sobrenadante de aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i> .	79
27. Inducción de NETs por las cepas mutantes de exoenzimas de <i>P. aeruginosa</i> .	82
28. Inducción de NETs por el sobrenadante de las cepas mutantes de exoenzimas de <i>P. aeruginosa</i> .	83
29. Cuantificación de la expansión nuclear por las cepas mutantes de exoenzimas de <i>P. aeruginosa</i> .	84
30. Inducción de NETs por las cepas mutantes de pigmento de <i>P. aeruginosa</i> .	86
31. Inducción de NETs por el sobrenadante de las cepas mutantes de pigmento de <i>P. aeruginosa</i> .	87

32. Cuantificación del ADN extracelular empleando las cepas mutantes de exoenzimas de <i>P. aeruginosa</i> .	90
33. Cuantificación del ADN extracelular empleando las cepas mutantes de pigmentos de <i>P. aeruginosa</i> .	91
34. Inducción de NETs por la bacteria <i>E. coli</i> .	94
35. Inducción de NETs por el sobrenadante de la bacteria <i>E. coli</i> .	95
36. Cuantificación del ADN extracelular empleando la cepa de <i>E. coli</i> .	97

ABREVIATURAS

FQ = fibrosis quística

IgG = inmunoglobulina G

CFTR = regulador de conductancia
transmembrana de fibrosis quística

NADPH = nicotinamida adenina
dinucleotido fosfato

AMPc = adenosin monofosfato cíclico

ROS = especies reactivas de oxígeno

ADN = ácido desoxirribonucleico

µm = micrómetro

NETs = trampas extracelulares de
neutrófilos

MPO = mieloperoxidasa

PMN = polimorfonucleares

NGAL = lipocalina asociada a la
gelatinasa del neutrófilo

PBI = proteína que incrementa la
permeabilidad

hCAP-18 = catelicidina humana

PR3 = proteinasa 3

MAC-1 = antígeno 1 de macrófago

CG = catepsina G

SOD = superóxido dismutasa

HNE = elastasa de neutrófilo humano

H₂O₂ = peróxido de hidrógeno

PAMPs = patrones moleculares
asociados a patógeno

H3 = histona 3

PRRs = receptores de reconocimiento
de patrón

PAD4 = enzima peptidil arginina
deaminasa 4

FcγR = receptor de IgG

µm² = micrómetro cuadrado

LES = lupus eritematoso sistémico

ADP = adenosin difosfato

GTP = guanosin trifosfato

PepA = exoproteína A de
Pseudomonas

ExoU = exoenzima U

ExoS = exoenzima S

ExoT = exoenzima T

PKC = proteína quinasa C

PMA = forbol-12-miristato-13-acetato

LB = Luria Bertani

° C = grados Celsius

μL = micro litro

rpm = revoluciones por minuto

hrs = horas

OD = densidad óptica

λ = longitud de onda

MOI = multiplicidad de infección

nm = nanómetro

mL = mililitro

μm = micrómetro

RPMI = medio Roswell Park
Memorial Institute

EDTA = ácido

etilendiaminotetraacético

rcf = fuerza centrífuga relativa

PBS = salina amortiguadora de
fosfatos

g = fuerza g

Ex = excitación

Em = emisión

FITC = isotiocianato de fluoresceína

μm² = micrómetro cuadrado

π = número pi

r² = radio al cuadrado

RESUMEN

Q.F.B. Saira Rocío Martínez Alemán

Fecha de Graduación: Agosto 2016

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título del estudio: “BÚSQUEDA DE MOLÉCULAS INDUCTORAS DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETs) EN AISLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* PROVENIENTES DE PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA”

Número de páginas: 118

Candidato al Grado de MAESTRÍA en CIENCIAS con Orientación en Microbiología Médica

Área de estudio: Bacteriología Médica

Los NETs están presentes en el esputo de pacientes con fibrosis quística causando secreciones anormalmente viscosas en los pulmones, lo que favorece su colonización por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. **Objetivos:** Realizar un análisis de la virulencia de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes con fibrosis quística e identificar partículas responsables en la inducción de los NETs. **Material y Métodos:** Se estudió la inducción de NETs por 16 aislados clínicos y 7 cepas mutantes de *P. aeruginosa*, evaluando su producción de pigmentos al medio de cultivo. La inducción de NETs se determinó por fluorometría, microscopía de fluorescencia y cuantificación de la expansión nuclear. **Resultados:** Los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* mostraron una variada producción de pigmentos al medio de cultivo, además de una robusta inducción de NETs principalmente en etapa delobulada; a diferencia de las cepas mutantes, que presentaron una constante producción de pigmentos al medio de cultivo, pero con un nivel de inducción de NETs muy bajo. **Conclusión:** Las exoenzimas presentes en *P. aeruginosa* pueden desencadenar la formación de los NETs en aislados clínicos provenientes de pacientes con fibrosis quística.



Dr. C. Alejandro Sánchez González
Director de Tesis

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Fibrosis Quística (FQ)

La fibrosis quística afecta aproximadamente a uno de cada 2.500 nacidos vivos [2]; en México, cada año nacen entre 300 y 400 niños con este padecimiento. Sin embargo, debido a los recursos e infraestructura actuales, solamente el 15% de ellos son diagnosticados de manera oportuna, mientras que el resto fallece antes de cumplir los 4 años de edad por complicaciones respiratorias y desnutrición. En nuestro país, existen alrededor de 3.000 niños con FQ, los cuales no tienen acceso a un tratamiento especializado, la edad promedio de diagnóstico es de 2.6 años, momento en el cual muchos niños ya muestran una afectación pulmonar. Actualmente la esperanza de vida promedio para un individuo con FQ es de 18 años, sin embargo, en 1980 la mayoría de los niños con este padecimiento no vivían lo suficiente para ingresar a la educación pre-escolar. Hoy en día, el 27% de los pacientes diagnosticados en México han alcanzado la vida adulta, mientras que el 85% de los enfermos de FQ mueren sin haber conocido su padecimiento [8].

La norma oficial mexicana NOM-034-SSA2-2002 para la prevención y control de los defectos al nacimiento, señala como una acción prioritaria en cualquier unidad de salud de los sectores público, privado o social, la detección de enfermedades como la FQ a través del tamiz neonatal, que identifica valores altos de tripsinógeno inmunoreactivo en sangre en las primeras seis semanas de vida del recién nacido/lactante [9]. En caso de que esta prueba sea positiva es preciso confirmar el diagnóstico a partir de pruebas de electrolitos en sudor y genotipificación [10]. A pesar de que la norma establece como acción prioritaria la detección de la FQ, en las instituciones de salud no se realizaba de forma generalizada el tamiz neonatal para FQ; sin embargo, la Secretaria de Salud anunció que el tamiz neonatal básico incluirá la prueba para detectar FQ a partir del año 2016 [10, 11].

La FQ es un desorden recesivo autosómico que limita la vida [1], siendo la enfermedad hereditaria letal más común en caucásicos, aunque también puede afectar a otras razas [2]. Esta enfermedad es causada por mutaciones en el gen que codifica el regulador de conductancia transmembrana de FQ o CFTR por sus siglas en inglés, localizado en el cromosoma 7q31.2 [1, 3]. Se ha demostrado la función del gen CFTR como un canal de cloro regulado por la fosforilación dependiente de AMP cíclico, lo cual fue consistente con alteraciones en el transporte de iones documentado en la FQ [4]. Estas mutaciones, de las cuales más de 1600 han sido secuenciadas, se han clasificado en cinco categorías (Clase I-V) de acuerdo a la proteína producida por el gen CFTR y la expresión fenotípica de la enfermedad [5]. Las mutaciones de clase I, II y III se asocian con enfermedad pulmonar severa y también con una alta morbilidad y mortalidad [6]. Considerando el fenotipo de estas mutaciones en el gen CFTR, se

encontró que la mutación conocida como F508del (p.Phe508del) era la causa más común de la FQ lo que representa el 70% de los pacientes con esta enfermedad [1, 7].

En individuos con FQ, la mutación F508del provoca afectaciones en diversos órganos, en particular, aquellos que poseen epitelio como la glándula sudorípara, el ducto biliar del hígado, el tracto reproductor masculino y el intestino. Esta mutación también induce secreciones anormalmente viscosas en las vías respiratorias de los pulmones y en los ductos del páncreas lo que provoca obstrucciones que conducen a la inflamación, daño y destrucción tisular. La pérdida de la función exocrina pancreática resulta en malnutrición y retardo en el crecimiento, lo que lleva a la muerte en la primera década de vida de la mayoría de los individuos no tratados [1].

Como tratamiento se ha utilizado antibioterapia tanto para combatir la infección bronquial crónica como las exacerbaciones infecciosas. En estos pacientes, el volumen de distribución de los fármacos hidrofílicos (aminoglúcido y cefalosporinas) está incrementado como consecuencia de la mala nutrición y pérdida de tejido adiposo, por ello las dosis utilizadas, especialmente las de los aminoglucósidos que también tienen un aclaramiento renal considerablemente acelerado, deben ser más altas de lo habitual para lograr concentraciones eficaces en las secreciones bronquiales. También se emplea la fisioterapia respiratoria que consiste en la limpieza bronquial diaria, con el fin de evitar la acumulación de mucosidad en los bronquios y prevenir la infección. Para que esta terapia sea

realmente efectiva es fundamental la constancia en el tratamiento y el número de sesiones diarias dependiendo de la situación de la persona [12].

Otra alternativa adicional al tratamiento consiste en la administración de DNAsa recombinante humana comercializada como Pulmozyme, la cual conduce a la reducción en la concentración y longitud del ADN extracelular y es usado en la clínica para el tratamiento de la FQ, sin embargo, es un tratamiento costoso y no todos los pacientes tienen acceso al mismo [13]. La elevada presencia de ADN extracelular es una característica distintiva de la FQ. Existen estudios recientes que reportan que el ADN en la FQ puede ser derivado de la formación de trampas extracelulares de neutrófilo, también denominadas como NETs [14-16].

1.2 Características del neutrófilo

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en circulación, y los pacientes con deficiencias congénitas de neutrófilos sufren de graves infecciones que con frecuencia son fatales, destacando la importancia de estas células en la defensa inmune [17].

Los neutrófilos se generan continuamente en la medula ósea a partir de precursores mieloides. Su producción diaria puede alcanzar hasta 2×10^{11} células. En humanos, del 50-70% de los leucocitos en circulación son neutrófilos, y cuando se encuentran en la etapa madura alcanzan un diámetro promedio de 7-10 μm , su núcleo es segmentado y su citoplasma está enriquecido con gránulos y vesículas secretoras

[18]. Junto con otros dos tipos de células con un desarrollo afin, los eosinófilos y basófilos, se han denominado como leucocitos polimorfonucleares (PMN), cuya característica distintiva es la presencia de “gránulos” [17]. Tradicionalmente, los gránulos han sido subdivididos en tres diferentes clases basados en sus moléculas de cargas residentes: azurofílicos o primarios, específicos o secundarios y gelatinasa o terciarios que se describirán con detalle más adelante [18].

Los neutrófilos producen una gran cantidad de péptidos y proteínas que directa o indirectamente eliminan microbios. Existen tres tipos principales de antimicrobianos: (a) péptidos catiónicos como defensinas, LL-37 y proteína bactericida que incrementa la permeabilidad (BPI), (b) enzimas proteolíticas como lisozima, proteinasa-3 (PR3), catepsina G (CG) y elastasa de neutrófilo (HNE), y (c) proteínas quelantes de metales como lactoferrina y calprotectina [19]. Estos péptidos catiónicos, tienen una característica que probablemente promueve su interacción inicial con superficies al ser de naturaleza aniónica.

1.3 Mecanismos de muerte del neutrófilo

El sistema inmune innato proporciona una defensa inmediata contra patógenos invasores, es esencial para la supervivencia de organismos multicelulares [20] y los neutrófilos desempeñan un papel importante [21].

Los neutrófilos circulan dentro del torrente sanguíneo, sin embargo, una vez que detectan un agente patógeno, dejan los vasos sanguíneos y rápidamente son reclutados al sitio de la infección siguiendo un gradiente quimiotáctico producido por señales microbianas y endógenas, por lo que son típicamente las primeras células en aparecer [22, 23]. En el sitio inflamatorio, emplean varias estrategias tanto intracelulares como extracelulares para contener y eliminar la infección [18].

1.3.1 Fagocitosis

La fagocitosis es el principal mecanismo del neutrófilo para eliminar patógenos y restos celulares. Se trata de un proceso activo mediado por receptores, durante el cual una partícula es internalizada por la membrana celular en una vacuola denominada fagosoma [17]. Los detalles del mecanismo de internalización dependen del tipo de interacción entre el neutrófilo y el microorganismo. La interacción puede ser directa, a través del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por receptores de reconocimiento de patrón (PRRs), o mediante opsoninas. El último mecanismo está mejor caracterizado e incluye tres ejemplos clásicos: fagocitosis mediada por el receptor de la región Fc de IgG (FcγR), que se basa en la formación de extensiones de pseudópodos para la inmersión de partículas opsonizadas IgG; la fagocitosis mediada por lectinas que se encuentran en el suero y pueden reconocer y opsonizar cuerpos extraños para favorecer su fagocitosis; y, por último, la fagocitosis mediada por receptor, donde un receptor específico en la

superficie de la membrana reconoce una macromolécula extracelular y se une a ella para formar un complejo receptor-ligando que experimenta endocitosis [24].

Posterior a la fagocitosis, el fagosoma comienza un proceso de maduración para eliminar a los patógenos. En los neutrófilos, la maduración del fagosoma ocurre tras la fusión de los gránulos al fagosoma, por lo que la administración de moléculas antimicrobianas se produce en el lumen fagosomal. Simultáneamente, el ensamblaje del complejo NADPH oxidasa en la membrana fagosomal permite la producción de ROS, y en conjunto, estos dos mecanismos crean un ambiente tóxico para la mayoría de los patógenos [17].

1.3.2 Degranulación

Los neutrófilos deben transportar una gran cantidad de moléculas altamente reactivas a través del torrente sanguíneo y luego correctamente desplegarlos en el momento adecuado. Por lo tanto, no es ninguna sorpresa que un orgánulo especializado de almacenamiento ha evolucionado en los neutrófilos: el gránulo. Los gránulos son, sin embargo, mucho más que orgánulos de depósito latentes para sustancias peligrosas, son participantes activos e indispensables en casi todas las actividades del neutrófilo durante la inflamación [17].

Existen tres tipos fundamentales de gránulos en el neutrófilo. Gránulos azurofílicos (también conocidos como gránulos primarios o peroxidasa positivos) que son los más grandes, midiendo aproximadamente 0.3 μM de diámetro y son los

primeros en formarse durante la maduración del neutrófilo. Se nombran así por su capacidad para captar el colorante azul básico A y contienen mieloperoxidasa (MPO), una enzima importante en el estallido oxidativo [25, 26]. Adicionalmente, incluyen defensinas, lisozima, BPI, y un número de serín proteasas: elastasa de neutrófilo humano (HNE), proteinasa 3 (PR3), y catepsina G (CG) [27].

La segunda clase de gránulos, los gránulos específicos (o secundarios), son más pequeños ($0.1 \mu\text{M}$), no contienen MPO, y se caracterizan por la presencia de la glicoproteína lactoferrina. Estos gránulos se forman después de los gránulos azurofílicos; también contienen un amplio rango de componentes antimicrobianos incluyendo lipocalina asociada a la gelatinasa del neutrófilo (NGAL), proteína antimicrobiana catelicidina humana (hCAP-18), y lisozima [26, 27].

La tercera clase, los gránulos gelatinasa (terciarios), son también MPO negativos, son más pequeños que los gránulos específicos, y contienen unos pocos antimicrobianos, pero sirven como un lugar de almacenamiento para un número de metaloproteasas, como gelatinasa y leucolisina. Estos gránulos son también la última población de gránulos formados durante la maduración del neutrófilo [28].

Finalmente, un cuarto conjunto de estructuras, las vesículas secretoras, también son comúnmente consideradas parte de la familia de gránulos del neutrófilo. Su carga consiste predominantemente de proteínas derivadas del plasma como la albumina. La membrana de vesículas secretoras sirve como un reservorio para un número de importantes moléculas de unión a membrana empleadas durante la migración del neutrófilo [17].

Después del contacto del neutrófilo con el endotelio, la estimulación a través de selectinas y quimioatrayentes induce la movilización de vesículas secretoras para fusionarse con la membrana plasmática y exponer estos componentes al ambiente externo [28-31]. Esto resulta en la transición a la firme adhesión. A medida que avanzan a través del endotelio, los neutrófilos están expuestos a otras señales de activación que inician la movilización de gránulos gelatinasa, de este modo liberando metaloproteasas [32, 33].

En el sitio inflamatorio, ocurre activación completa del neutrófilo, iniciándose el estallido oxidativo y a la movilización de gránulos azurofílicos y específicos. Estos gránulos se fusionan con el fagosoma, contribuyendo a las actividades antimicrobianas de este compartimento, o a la fusión con la membrana plasmática. Esta fusión permite el ensamblaje del complejo NADPH oxidasa y permite la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) tanto dentro del fagolisosoma y fuera de la célula. La degranulación de gránulos primarios y secundarios contribuye a la creación de un ambiente antimicrobiano en el sitio inflamatorio y produce un entorno hostil para patógenos [17].

1.4 Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs)

Hasta hace algunos años, se pensaba que los neutrófilos empleaban esencialmente solo dos principales estrategias antimicrobianas: la fagocitosis y la degranulación [23]. Recientemente, una tercera estrategia fue descubierta como un nuevo mecanismo de defensa inmune innata del huésped contra infecciones, la formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos o también denominadas como NETs [34].

1.4.1 Formación de los NETs

La NETosis es un tipo de muerte celular del neutrófilo que conduce a la formación de los NETs, siendo este un proceso complejo aun poco conocido [22]. Para liberar los NETs, el neutrófilo activado se somete a cambios morfológicos dramáticos, los cuales pueden variar dependiendo del estímulo [22, 35]. Este proceso puede ser detectado utilizando el colorante *Sytox[®] Green*, que se excluye de células vivas, pero emite fluorescencia cuando se intercala en el ADN de células muertas [36].

Minutos después de la activación, el neutrófilo se aplana y adhiere firmemente a un sustrato, dicha adhesión se encuentra mediada por los receptores de integrina MAC-1 [37]. La unión de los neutrófilos a su sustrato promueve el ensamblaje del complejo NADPH oxidasa, el cual se ha determinado que es esencial para la formación de los NETs. Este complejo se ensambla en la membrana fagosomal de la

célula y reduce el oxígeno molecular en anión superóxido mediante la transferencia de electrones desde NADPH. La enzima superóxido dismutasa (SOD) transforma el anión superóxido en peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el cual actúa en turno como sustrato para una de las enzimas más abundantes en los gránulos del neutrófilo: MPO. La MPO reacciona con el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) para generar ácido hipocloroso, como el ácido hipocloroso [22].

Durante la siguiente hora, el núcleo pierde su forma lobulada, la cromatina se descondensa por acción de las enzimas HNE y MPO, las cuales normalmente se encuentran almacenadas en gránulos primarios, sin embargo, una vez que se inicia la formación de NETs estos migran hacia el núcleo en donde ejercen su función proteolítica sobre las histonas [38, 39]. La descondensación de la cromatina se acrecienta debido a las modificaciones adicionales sobre las histonas, así se ha encontrado que la histona H3 sufre una modificación (citrulinación) que convierte residuos de arginina en citrulina, siendo esta reacción catalizada por la enzima peptidil arginina deaminasa 4 (PAD4), la cual se localiza en el núcleo del neutrófilo [40, 41]. Subsecuentemente, la membrana nuclear interna y externa progresivamente se separan una de la otra y simultáneamente los gránulos se disocian [38]. Posteriormente, la envoltura nuclear se desintegra por completo en vesículas y el nucleoplasma y citoplasma se mezclan entre sí formando una masa homogénea. Finalmente, las células parecen contraerse hasta que ocurre la ruptura de la membrana celular y el interior de la célula es expulsado en el espacio extracelular, liberando los NETs [22, 38].

1.4.2 Estructura y morfología de los NETs

La estructura de los NETs es inusual; ya que están compuestos de filamentos lisos con un diámetro de aproximadamente 17 nm, compuestos de nucleosomas apilados y probablemente modificados. Su columna vertebral está formada por dominios globulares con un diámetro de aproximadamente 50 nm constituidos por proteínas granulares [34, 42].

Como se mencionó anteriormente, durante la formación de los NETs, hay cambios en el tamaño nuclear y en la forma del neutrófilo [38]. Al observar detalladamente la morfología nuclear, Hakkim *et al.* definieron cuatro morfologías: (1) núcleo lobulado, (2) núcleo delobulado, (3) NET difuso y (4) NET disperso (Figura 1). Se observó que los neutrófilos activados por 240 minutos tenían una mayor área nuclear, con un rango entre 150 y 350 μm^2 . En contraste, el núcleo de células activadas por 15 minutos tenía un área menor a 104 μm^2 . Estos datos muestran que la expansión de la cromatina puede ser cuantificada. También analizaron la morfología nuclear trazando el perímetro versus el factor de circularidad de Heywood, el cual describe la forma. Usando todos estos criterios, es posible cuantificar el número de células con cada una de las cuatro morfologías nucleares. Este método permite la evaluación automática de cambios en la morfología nuclear y es adecuado para determinar el efecto inhibitorio de la formación de NETs [36].

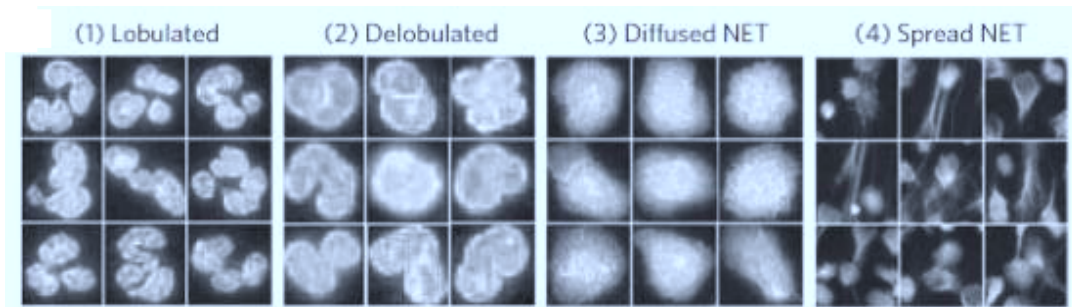


Figura 1. Morfología nuclear del neutrófilo. Se muestran imágenes de la tinción del ADN de células elegidas al azar. Estas imágenes muestran que un software especializado selecciona rigurosamente núcleos con una morfología distinta. Este método permite la evaluación automática de los cambios en la morfología nuclear [36].

1.4.3 Función de los NETs

La función principal de los neutrófilos es eliminar microorganismos. Es probable que los NETs evolucionaron para frenar las infecciones por su facultad para “atrapar”, prevenir la diseminación, inactivar factores de virulencia y exterminar microorganismos [22]. Los NETs son capaces de atrapar casi todos los tipos de patógenos, incluso aquellos que por su tamaño no es posible que sean fagocitados, por lo anterior, su función ha sido demostrada en respuesta a infecciones provocadas por bacterias gram-positivas y gram-negativas, levaduras, virus y parásitos protozoarios [43].

La captura dentro de las fibras de ADN evita la propagación de microorganismos sobre el cuerpo y facilita una mayor concentración de factores antimicrobianos en el sitio de la infección [34]. La captura se produce a través de interacciones de carga entre la superficie celular del patógeno y componentes de los NETs. Sus funciones antimicrobianas están representadas por las proteínas procedentes tanto de los gránulos y el citoplasma, principalmente por HNE, histona y MPO, sin embargo, también se ha encontrado que contienen CG, PR3, lactoferrina, calprotectina y péptidos antimicrobianos como defensinas o el péptido catiónico derivado de la proteína antimicrobiana LL37 [42].

1.5 Los NETs en la fibrosis quística

Además de la función antimicrobiana de los NETs, su eliminación inefectiva o una excesiva formación puede causar efectos patológicos. La formación de los NETs se ha observado durante enfermedades inflamatorias crónicas (ateroesclerosis), enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico (LES), en diversas formas de vasculitis, trombosis, así como en enfermedades pulmonares (FQ) [44].

Se ha encontrado que los NETs están presentes en el esputo de pacientes con FQ y que la abundancia de los mismos contribuye a una incrementada viscosidad de las mucosidades en esta enfermedad, y además se asocia a la colonización de los pulmones con bacterias. Los NETs pueden contribuir a la patología de la enfermedad

induciendo daño al tejido, a través de la acción de sus gránulos líticos sobre el tejido pulmonar [45].

Las principales bacterias que colonizan los pulmones de estos pacientes son *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae*, pero el patógeno más común que afecta las vías respiratorias de pacientes con FQ y que también induce los NETs es *Pseudomonas aeruginosa* [45].

1.6 Características generales de *P. aeruginosa*

El género *Pseudomonas* estaba constituido inicialmente por una gran colección heterogénea de bacterias sin capacidad de fermentación que se agruparon por sus parecidos morfológicos donde se incluyen casi 200 especies, siendo *P. aeruginosa* la más importante. Se denominaron pseudomonas porque se suelen disponer en parejas de células que recuerdan a una célula única [46].

La especie *P. aeruginosa* incluye bacilos gram-negativos rectos o ligeramente curvados en general móviles (0,5-1,0 por 1,5-5,0 μm), que se disponen típicamente en parejas. *P. aeruginosa* crece rápidamente y forma colonias planas con bordes que se van extendiendo, β -hemólisis, y una coloración verde relacionada con la producción de pigmentos azul y amarillo verdoso. Estas bacterias emplean los carbohidratos mediante la respiración aerobia de forma que el oxígeno es el aceptor terminal de los electrones. Aunque se describen como aerobios obligados, pueden crecer de forma anaerobia utilizando nitratos o arginina como aceptor alternativo para

los electrones. Algunas cepas aparecen mucoides por la abundancia de una capsula de polisacáridos; estas cepas resultan especialmente frecuentes en los pacientes con FQ [46].

Esta bacteria es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrimentos que otros organismos pueden asimilar. Se ha reportado el aislamiento de *P. aeruginosa* de ambientes tan inhóspitos como son el combustible de avión, soluciones de clorhexidina y el jabón [47].

P. aeruginosa representa un problema importante de salud en centros hospitalarios, especialmente cuando se trata de pacientes con cáncer [48] o quemados [49]. Por desgracia, se encuentran en todo el ambiente hospitalario, en reservorios húmedos como los alimentos, los lavabos, los baños, las mopas para fregar suelos, los equipos de diálisis y terapia respiratoria e incluso en las soluciones desinfectantes. Es raro que las personas sean portadoras dentro de la flora microbiana normal, salvo en los pacientes hospitalizados y en individuos inmunodeprimidos [46].

Estos microorganismos tienen también muchos factores estructurales, toxinas y enzimas que potencian su virulencia y los hacen resistentes a la mayor parte de los antibióticos de uso habitual. Por suerte, las infecciones por *P. aeruginosa* son fundamentalmente oportunistas [46].

1.6.1 Pigmentos difusibles en la inducción de los NETs

P. aeruginosa produce pigmentos difusibles (p. ej., piocianina, pioverdina y piorrubina) que explican su aspecto característico en cultivo y además han sido descritos como factores de virulencia [46].

En un estudio en el que se buscó determinar si *P. aeruginosa* era capaz de inducir la formación de NETs, así como las moléculas bacterianas implicadas en el proceso, describieron que la piocianina induce la formación de NETs en neutrófilos adherentes. En este estudio examinaron *in vitro* la producción de piocianina a partir de 40 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes con FQ, esto en etapas tempranas y avanzadas de la enfermedad, así como en enfermedad leve o grave. Se detectó un amplio rango de capacidades de producción de piocianina de esos aislamientos y que no había una tendencia en la producción de la piocianina entre los diferentes pacientes [50].

Enseguida examinaron si la piocianina purificada era capaz de inducir los NETs. Para lo cual emplearon un rango de concentraciones de la molécula desde 0 a 30 μM en diferentes periodos de tiempo, observando que la piocianina induce la formación de NETs de una manera dependiente tanto del tiempo como de la concentración. Para corroborar que la piocianina contribuye en la formación de los NETs, diseñaron una mutante deficiente en piocianina, la cual demostró una disminución en la inducción de los NETs comparada con una cepa silvestre (*wild type*, en inglés) que produce piocianina. Sin embargo, la cepa silvestre induce el 10% de NETs mientras que la cepa mutante no los induce de manera significativa (4%); e

incluso hay un efecto limitado de la piocianina en la inducción de los NETs. Lo cual sugiere la participación de otras moléculas como inductores de NETs [50].

1.6.2 Exoenzimas en la inducción de los NETs

Algunas moléculas asociadas a la virulencia de *P. aeruginosa* [51] y que podrían estar relacionadas con la inducción de NETs, son las exoenzimas S y T que presentan actividad de proteína activadora de GTPasa, así como actividad de ADP ribosil transferasa [52, 53]. Otra molécula es la exoenzima U o PepA que es una citotoxina con actividad de fosfolipasa A2 [54, 55].

Existen reportes que muestran que *P. aeruginosa* promueve la enfermedad a través del sistema de secreción tipo III para inyectar proteínas efectoras tóxicas al citoplasma de células eucarióticas, siendo las exoenzimas U, S y T, las tres proteínas efectoras descritas hasta la fecha [56]. Se demostró que ExoU tiene mayores efectos que ExoS y ExoT sobre la virulencia en la neumonía aguda; además está asociada con diferentes efectos en el pulmón, permitiendo la persistencia y la diseminación de la bacteria, lo cual se relaciona con su actividad de fosfolipasa [51, 56].

En la tesis de Maestría de la M.C. Lizbeth Campos, se estudió los mecanismos involucrados en la inducción de NETs por 4 especies de *Candida* de relevancia clínica, a través de un análisis del perfil de producción de sus fosfolipasas y su interacción con los neutrófilos en la inducción de NETs. Se encontró que las fosfolipasas presentes en *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* están implicadas

en la inducción de los NETs, mientras que *C. glabrata* no induce la formación de NETs, sugiriendo que otros factores de virulencia y de inhibición de este mecanismo podrían influir en dicha respuesta [57].

En la literatura se ha descrito que la fosfolipasa A2 (PLA2) hidroliza los fosfolípidos de la membrana dando origen al ácido araquidónico y este a su vez a la síntesis de eicosanoides que se ven involucrados en procesos proinflamatorios como las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Así mismo se ha documentado que a través de esta vía se activa directamente la PKC, la cual a través de reacción de fosforilación da lugar a la activación de la enzima NADPH oxidasa para la producción de ROS, siendo una posible vía para la inducción de NETs como se muestra en la figura 2 [36, 58, 59].

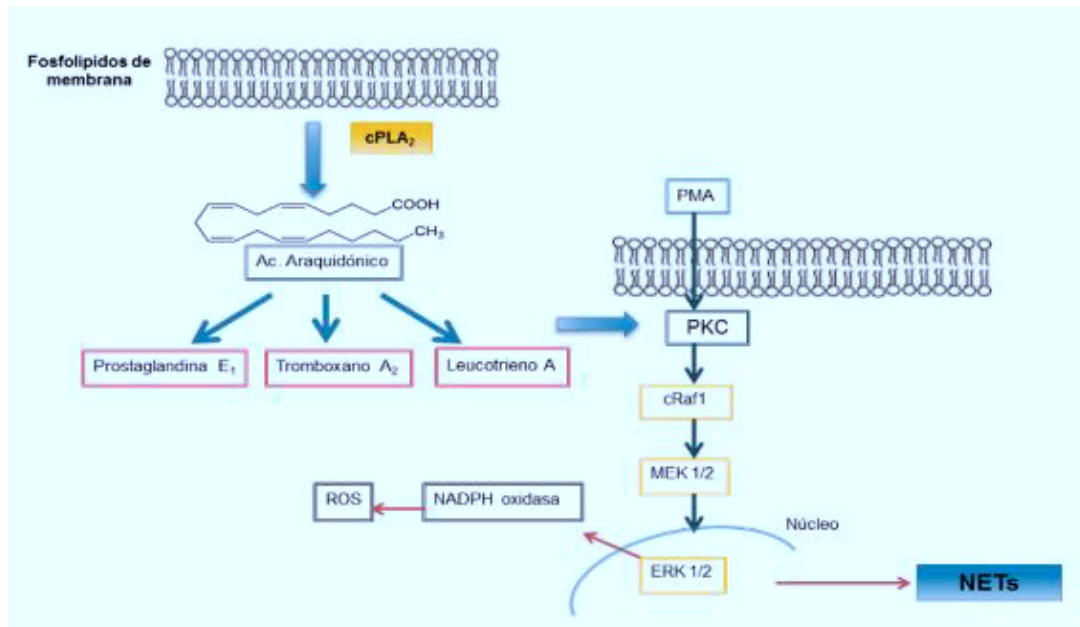


Figura 2. Mecanismo propuesto para la formación de NETs a través de las fosfolipasas.

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, existe poca información acerca de los factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* que promueven la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), por lo que un análisis de virulencia bacteriana podría ayudar a encontrar las partículas responsables de su inducción.

La identificación precisa de dichas moléculas responsables en la inducción de los NETs podría permitir el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos contra estas.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS

Los aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de pacientes con fibrosis quística y/o sus productos secretados, entre los que se encuentran las exoenzimas, promueven la activación de vías de señalamiento para la formación de trampas extracelulares de neutrófilos.

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la capacidad de diferentes moléculas importantes en la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*, como piocianina, pioverdina y las exoenzimas en la inducción de trampas extracelulares de neutrófilos.

4.2 Objetivos específicos

1. Estudiar las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de aislamientos clínicos de pacientes con fibrosis quística, separando las cepas de acuerdo a su producción y secreción de pigmentos al medio de cultivo, y estudiar su capacidad para inducir NETs.
2. Analizar la capacidad de cepas mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* para inducir NETs mediante moléculas implicadas en su virulencia.

CAPÍTULO 5

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Estrategia general

Para llevar a cabo el presente trabajo, se estableció la siguiente estrategia experimental. A partir de una colección de 120 aislamientos clínicos de expectoración y exudado faríngeo provenientes de pacientes con FQ, se realizó la identificación fenotípica de la bacteria *P. aeruginosa* por los métodos convencionales reportados en la literatura: se efectuó una selección mediante previa reactivación en medio líquido Luria Bertani (LB) para la producción de pigmentos al medio de cultivo. Enseguida se llevó a cabo el crecimiento en agar Mac Conkey e identificación microscópica por tinción de Gram, así como la prueba de oxidasa y la producción de hemolisinas. También se obtuvieron cepas mutantes de *P. aeruginosa* que cuentan con diferentes características que las hacen de interés para este estudio, y fueron reactivadas empleando el mismo procedimiento que para los aislados clínicos. Por último, se realizó la inducción de NETs por las cepas de *P. aeruginosa* seleccionadas y las cepas mutantes, así como sus productos secretados al medio de cultivo; y se determinó la cantidad de ADN extracelular empleando la técnica de fluorescencia y la cuantificación de la expansión nuclear del neutrófilo utilizando microscopía de fluorescencia.

5.2 Identificación fenotípica de *Pseudomonas aeruginosa*

Para la realización de este trabajo, se analizó una colección de 120 aislamientos clínicos de expectoración y exudado faríngeo provenientes de pacientes con FQ. Las cepas fueron recolectadas del año 2013 a 2015 en el Laboratorio de Bacteriología del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRCEI), adscrito al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Con el fin de identificar y seleccionar la especie *P. aeruginosa* se realizaron las siguientes pruebas de manera simultánea:

5.2.1 Reactivación de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

Comenzando con los 120 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* previamente almacenados a -20° C, se realizó la reactivación de los mismos; para lo cual, los crioviales con las cepas fueron descongeladas empleando un baño de hielo y así evitar los cambios bruscos de temperatura. De cada criovial descongelado se tomaron 100 µL que fueron colocados en tubos con medio líquido LB, y los mismos fueron incubados a 37° C y 200 g durante 24 hrs (Labnet International. Inc., Modelo 222 DS Edison, NJ).

Después del período de incubación se llevó a cabo un registro de los tubos con crecimiento bacteriano, incluyendo la presencia o ausencia de pigmento en el medio de cultivo.

Enseguida, cada uno de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* fueron sembrados en cajas Petri con Agar Mac Conkey (BD Bioxon), y se llevó a cabo la incubación a 37° C durante 24 hrs (Thermo Fisher Scientific, Inc. Modelo 815, Waltham, MA). Después de usarse, las placas con crecimiento bacteriano fueron almacenadas hasta su siguiente uso.

5.2.2 Tinción de Gram

Se prepararon las muestras, colocando una gota de agua destilada sobre un portaobjetos limpio, mientras que, con el asa de siembra previamente esterilizada se tomó una colonia de bacterias. Con el asa se extendió la gota con las bacterias sobre el portaobjetos y se fijó la extensión por calor, calentando suavemente a la llama del mechero hasta que la muestra se secó.

Se aplicó a la muestra cinco gotas del colorante cristal violeta para cubrir la superficie del extendido durante un minuto, y enseguida se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de colorante, tiñéndose las células de color morado. Enseguida se aplicaron cinco gotas de lugol sobre el extendido por un minuto; el lugol es un mordente, ya que reacciona con el colorante cristal violeta para formar un complejo cristal violeta-yoduro, y las células continuaron de color morado. A continuación, la muestra se lavó con alcohol-acetona para eliminar el complejo cristal violeta-yoduro de las bacterias Gram negativas. De esta manera las bacterias Gram positivas continuaron moradas y las bacterias Gram negativas quedaron incoloras.

Por último, se realizó una tinción de contraste colocando cinco gotas del colorante safranina sobre el extendido durante un minuto, enseguida se lavó la muestra con agua corriente y se dejó secar (BD, Gram stain kit. Franklin Lakes, NJ). Las bacterias Gram negativas, que se decoloraron, se tiñeron de un color rosado o fucsia, en tanto que las bacterias Gram positivas no se afectaron con la contratinción y permanecieron moradas. Una vez que la preparación estuvo totalmente seca, se colocó una gota de aceite de inmersión y se observó al microscopio con el objetivo de 100x (Zeiss Primo Star, Germany).

5.2.3 Prueba de oxidasa

Partiendo de un cultivo fresco de 24 hrs de *P. aeruginosa*, se tomó una colonia que fue dispersada con el asa bacteriológica sobre un trozo de papel filtro que contenía tres gotas del reactivo oxidasa (p-tetrametilfenilendiamina al 1%). Después de 30 segundos se apreció el desarrollo de un color azul oscuro en el sitio de inoculación, siendo este resultado positivo.

5.2.4 Producción de hemolisinas

A partir de agar Mac Conkey (BD Bioxon), se tomó el cultivo de *P. aeruginosa* con el asa bacteriológica, el cual fue sembrado en agar sangre por dilución (3 zonas) y se incubó durante 24 hrs a una temperatura de 37°C (Thermo Fisher Scientific, Inc., Modelo 815. Waltham, MA). Después del periodo de incubación, se observaron halos incoloros alrededor de las colonias de *P. aeruginosa*, representando una hemólisis total de los eritrocitos, por lo que el resultado se interpretó como hemólisis β .

5.3 Cepas mutantes de *P. aeruginosa*

Para la realización de este trabajo, se contó con las cepas mutantes por inserción de transposón de *P. aeruginosa*, las cuales fueron obtenidas a través de la Universidad de Washington, EE. UU., y se muestran en el Apéndice B.

5.4 Preparación de las diluciones de *P. aeruginosa*

Para determinar la inducción de NETs por los aislamientos clínicos y las cepas mutantes de *P. aeruginosa*, las cepas se reactivaron en medio líquido LB y fueron ajustadas a 1 OD (densidad óptica) a $\lambda 600$ nm (equivalente a 1×10^7 bacterias/mL) en el lector de microplacas (Bio-Rad. Hércules, CA) de la siguiente manera: Los tubos con crecimiento bacteriano fueron centrifugados a 1500 g durante 15 minutos

(Becton Dickinson. Modelo 420101) para separar el sobrenadante y el pellet de la bacteria. Enseguida se recolectó el sobrenadante con ayuda de una jeringa estéril, a la cual se le retiró la aguja para colocar un filtro de 0.20 μm (Corning, Modelo 431219. Tewksbury, MA), y el sobrenadante filtrado fue recolectado en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.

El sobrenadante restante fue decantado, mientras que el pellet se resuspendió en 1 mL de medio RPMI (Life Technologies, Mainway Drive Burlington, ONT) y el tubo se llevó a agitación en vórtex durante 10 segundos. A continuación, utilizando una microplaca de 96 pocillos, fueron colocados 100 μL de medio RPMI como blanco, mientras que en otro pocillo se colocaron 90 μL de RPMI con 10 μL del pellet resuspendido (ambos tratamientos por duplicado); y se realizó la lectura correspondiente a $\lambda 600\text{ nm}$ en el lector de microplacas (Bio-Rad, Hércules, CA).

Con las lecturas obtenidas se procedió a realizar los cálculos para ajustar la cantidad de bacterias a 1 OD: se obtuvo el promedio de las dos lecturas para una misma cepa y el resultado fue multiplicado por 10 (factor de dilución), consiguiendo como resultado el valor de OD contenido en 1 mL.

Ejemplo:

$$\frac{0.151 + 0.153}{2} = 0.152$$

Enseguida se hace una relación matemática entre el valor de OD contenido en 1 mL para obtener la cantidad de volumen que equivale a 1 OD.

Ejemplo: $0.152 \times 0 = 1.52 \text{ OD en } 1 \text{ mL}$

$$\begin{array}{r} 1.52 \text{ OD} \text{ ---- } 1 \text{ mL} \\ 1 \text{ OD} \text{ ---- } X \\ \hline X = 0.658 \text{ mL} \end{array}$$

La cantidad de volumen previamente determinada, se lleva a un volumen final de 1 mL con medio RPMI en un tubo Eppendorf, siendo esta la dilución equivalente a 100 (1×10^7 bacterias/mL). Para una dilución de 10 (1×10^6 bacterias/mL), se colocaron en un tubo Eppendorf, 100 μL de la solución anterior añadiendo 900 μL de RPMI; para una dilución de 1 (1×10^5 bacterias/mL), se colocó de igual forma en un tubo Eppendorf, 100 μL de la solución anterior adicionando 900 μL de RPMI; y para la dilución de 0.1 (1×10^4 bacterias/mL), se colocaron en un tubo Eppendorf, 100 μL de la solución anterior agregando 900 μL de RPMI. Este procedimiento fue realizado para cada una de las cepas de trabajo empleadas en la inducción de NETs.

5.5 Inducción de NETs por la especie *Pseudomonas aeruginosa* y sus productos secretados al medio de cultivo

Para llevar a cabo la siguiente prueba, los aislamientos clínicos seleccionados y las cepas mutantes de *P. aeruginosa* fueron previamente reactivadas en medio líquido LB durante 24 hrs a 37° C y con agitación constante de 200 g. La metodología para la obtención de los neutrófilos e inducción de NETs se describe a continuación.

5.5.1 Obtención y purificación de neutrófilos

Se realizaron extracciones de sangre periférica de individuos sanos en tubos con EDTA (BD vacutainer, Franklin Lakes, NJ) y las muestras fueron colocadas (7 mL) en tubos cónicos de polipropileno de 14 mL sobre la cantidad equivalente de Histopaque 119 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Los tubos fueron centrifugados a 800 rcf durante 20 minutos, con freno mínimo (valor de 3) para separar los componentes de la sangre (VWR International, Symphony 4417R, Radnor, PA).

Las fases correspondientes al suero, monocitos y linfocitos (capa celular superior) se desecharon y se recolectó la capa inferior, correspondiente a los PMN utilizando una pipeta Pasteur, evitando recolectar la fase roja (eritrocitos). Los PMN que se recolectaron fueron lavados con PBS 1x hasta el volumen máximo del tubo (14 mL) y se llevó a cabo una centrifugación a 300 g por 10 minutos. Los PMN, enseguida fueron separados de los eritrocitos remanentes mediante un gradiente de Percoll (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), el cual se preparó a partir de una solución al

100% (9 partes de Percoll más 1 parte de PBS 10x). Se prepararon 5 porcentajes adicionales en 5 tubos de 14 mL: de la solución de Percoll al 100% se tomaron los siguientes volúmenes para las distintas fases, 3.25 mL (65%), 3.5 mL (70%), 3.75 mL (75%), 4.0 mL (80%) y 4.25 mL (85%) de esta solución y se llevó a un volumen total de 5 mL con PBS 1x en cada tubo. A continuación, en otro tubo, se colocó cuidadosamente 1 mL de cada gradiente de Percoll previamente preparado, empezando desde el más concentrado (85%) al menos concentrado (65%). Adicionalmente, se resuspendió el pellet de células PMN en 2 mL de PBS 1x, y se transfirieron a la parte superior del tubo con los diferentes gradientes de Percoll. Los tubos fueron centrifugados durante 20 minutos a 800 g (sin freno). Posteriormente se colectó en otro tubo de 14 mL, la interfase entre las capas del 70% y 75% del gradiente de Percoll; y se lavó de nuevo con PBS 1x, mediante centrifugación a 300 g durante 10 minutos. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 2 mL de medio RPMI (Life Technologies, Mainway Drive Burlington, ONT).

Los neutrófilos se cuantificaron mediante su conteo directo en cámara de Neubauer (Propper, NY. Modelo 11101) y se determinó la viabilidad de las células mediante la tinción con el colorante Azul Tripano.

5.5.2 Inducción de NETs

Los neutrófilos (1×10^5 /mL) fueron sembrados en medio RPMI en una placa de 24 pozos y se dejaron adherir durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron los tratamientos: 50 μ L de cultivos de *P. aeruginosa* (MOI 1:100, 1:10, 1:1 y 1:0.1), 3 μ L de sobrenadante del cultivo líquido para inducir la formación de los NETs. Se incluyó como control negativo a neutrófilos sin estimular y a neutrófilos estimulados con 3 μ L de LB, y como control positivo a neutrófilos estimulados con 40 nM de PMA (Sigma, Saint Louis, MO).

Los neutrófilos fueron incubados a 37° C durante 3 hrs (Thermo Fisher Científica, Inc. Modelo 815) y posteriormente se le añadió a cada pozo, 10 μ L del colorante *Sytox*[®] *Green* (Molecular probes, Life Technologies, Eugene, OR) y se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad por 15 minutos. En algunos casos los tratamientos fueron previamente fijados con Paraformaldehído al 4%.

5.5.3 Cuantificación del ADN extracelular por fluorometría

Una vez realizada la inducción de NETs, se obtuvo la lectura correspondiente a la intensidad de fluorescencia empleando el fluorómetro (Thermo Scientific, Inc., Modelo 5210450. Waltham, MA) con los filtros de λ Ex a 485 nm y λ Em a 538 nm. Se hizo una incubación breve de las células con el fluoróforo *Sytox*[®] *Green*, que tienen un λ Ex a 504 nm y un λ Em a 523 nm, lo que resultó en una fluorescencia

verde brillante. Los resultados obtenidos fueron seleccionados, copiados y pegados en una hoja de Excel (Microsoft Office 2016 para PC) para ser analizados.

5.5.4 Cuantificación de la expansión nuclear del neutrófilo

Utilizando un microscopio de fluorescencia, se capturaron imágenes de fluorescencia y su correspondiente campo claro o contraste de fases con el filtro FITC (Ex=480 y Em=535) usando el objetivo de 20x (Zeiss Axioplan, West Germany).

La cuantificación de la expansión nuclear fue realizada de la siguiente manera: las imágenes obtenidas fueron procesadas en el programa Image J (Versión 1.47) de la siguiente manera: por medio de la imagen de contraste de fases, se hizo un conteo de la cantidad de células totales por campo, utilizando el contador de células “Plugins” del programa mediante los siguientes comandos: Plugins → Analyze → Cell counter → Initialize → Select the desired type → Count. El número total de células fue registrado en una hoja de Excel (Microsoft Office 2016 para PC). Después se trabajó con la imagen de fluorescencia por el colorante *Sytox[®] Green* (transformándola en una imagen a blanco y negro de 8-bit en este programa (Comandos: Image→ Type→8-bit). Se ajustó la luz y contraste de la imagen para hacer claramente discernibles las células completas del ruido del fondo, haciendo clic para aplicarlo (Comandos: Image→ Adjust → Brightness/Contrast → Apply). Posteriormente, se ajustó el umbral de la imagen (en la tabulación de la imagen se seleccionó “Adjust” y después “Threshold” y en las opciones se seleccionó “Default”,

fondo blanco y negro). Se movió la pestaña deslizante superior hasta que el color negro cubrió por completo a las células, evitando la aparición de ruido en la imagen (Comandos: Image → Adjust → Threshold (select Default, Black and White y Dark background) → Apply). Luego, usando las herramientas de dibujo, se eliminaron las células del borde de la imagen, y manualmente se separaron las células, seleccionando la herramienta de lápiz o “Pencil tool”. Se analizaron las imágenes para obtener el área del pixel correspondiente de cada célula, para esto se seleccionó en la tabulación “Analyze”, “Analyze particle” y se estableció los valores de tamaño 100-Infinito, mostrando los contornos y comprobando los resultados de la pantalla, haciendo clic en aceptar (Comandos: Analyze → Analyze Particle <set Size: 100-Infinity, Show: Outlines and check Display results > → OK).

Posteriormente si se dividieron adecuadamente las células, el programa debe ser capaz de contar las células individuales (indicándose con un número rojo dentro de cada célula). Una vez realizado esto, se copiaron los datos del número de evento y área que se muestran en la ventana de resultados y se pegaron en el documento de Excel en una nueva columna llamada Imagen J resultados. Luego, en la misma hoja de Excel, se creó una columna llamada BINS, el cual es un rango de los números en incremento que cubren desde el valor mínimo al máximo obtenido por el área de todos los tratamientos. En la siguiente celda se calculó la frecuencia de cada dato en el tratamiento, insertando la función “Frecuencia” y se introdujo el rango de datos para el área del tratamiento de la matriz de datos y el rango de los datos para los contenedores de la matriz de BINS, haciendo clic en aceptar. La función sólo devolverá el primer valor; a partir de esta, se debe extender la selección para toda la

gama de valores de Bins. Después se hizo clic sobre la fórmula y se introdujo el comando <Ctrl> + <Shift> + <Enter>.

Los datos fueron convertidos al porcentaje de células positivas al colorante *Sytox*[®] *Green* dividiendo los valores de frecuencia por la cantidad total de células determinadas de la imagen de contraste de fase, y se trazó el porcentaje de células *Sytox*[®] *Green*-positivas dentro del rango del área ADN en μm^2 (dividir los valores de la matriz de Bins por el diámetro estimado en una etapa no estimulada de los neutrófilos humanos). En general se puede considerar una célula NETótica a la que presenta núcleos descondensados y supera la superficie media normal de neutrófilos no estimulados ($80 \mu\text{m}^2$), suponiendo una forma circular y el uso de la fórmula del círculo $\pi \times r^2$.

5.6 Cuantificación de proteínas del sobrenadante de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* por el método de Bradford

Para determinar la cantidad de proteínas en el sobrenadante de los aislamientos clínicos A5, A6, A9 y A10 de *P. aeruginosa*, primero las cepas se incubaron en medio líquido LB a 37°C y con agitación constante de 200 g durante 24 hrs (Labnet International. Inc., Modelo 222 DS Edison, NJ). Después del periodo de incubación, los tubos con crecimiento bacteriano fueron centrifugados a 1500 g durante 15 minutos (Becton Dickinson. Modelo 420101) para separar el sobrenadante y el pellet de la bacteria. Enseguida se recolectó el sobrenadante con ayuda de una

jeringa estéril, a la cual se le retiró la aguja para colocar un filtro de 0.20 μm (Corning, Modelo 431219, Tewksbury, MA), y el sobrenadante filtrado fue recolectado en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.

Enseguida se procedió a cuantificar la cantidad de proteínas del sobrenadante filtrado para cada cepa utilizada empleando el protocolo de Bradford de la siguiente manera: antes de realizar el procedimiento, el reactivo de Bradford fue atemperado y mezclado; para un volumen final del 300 μL , se añadieron 298 μL del reactivo de Bradford a tubos Eppendorf para los estándares y muestras, incluyendo el blanco; posteriormente se agregaron 2 μL de cada estándar (0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/mL), y de las muestras a los tubos correspondientes. Se llevó a agitación en vórtex cada solución preparada y se colocaron 200 μL de cada una en los pozos de una placa de 96 pozos. Enseguida se llevó a cabo la lectura de absorbancia a 595 nm en el lector de micoplacas (Bio-Rad, Hércules, CA); y una vez obtenida la lectura, se restó el resultado obtenido del blanco, tanto a los estándares como a las muestras, y se realizó una curva de regresión lineal para estimar la concentración de proteínas de cada una de las muestras.

5.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Primero se ensambló el aparato para gel, asegurando que el sándwich de placas de vidrio y los espaciadores estuvieran bien sellados. Se preparó la solución para el gel separador al 12% con: 3.0 mL 30% acrilamida/0.8% bisacrilamida; 2.65 mL de agua miliQ; 1.85 mL de buffer 4x Tris Cl/SDS pH 8.8; 100 μ L de persulfato de amonio al 10% y 12 μ L de TEMED. La solución del gel separador se agitó en vórtex y se cargó el aparato con 4.5 mL de manera rápida. En la parte superior se colocó \approx 1 ml de isopropanol para aislar la polimerización del oxígeno. Después, se vertió el isopropanol, se enjuago con agua destilada dos veces y se removieron los restos de agua desde el interior del aparato con una toalla de papel. Enseguida se preparó la solución para el gel concentrador al 5% con: 1.95 ml de agua miliQ; 850 μ L de buffer 4x Tris Cl/ SDS pH 6.8; 590 μ L de 30% acrilamida/0.8% bisacrilamida, 52 μ L de persulfato de amonio al 10% y 8 μ L de TEMED. La solución del gel concentrador se agito en vórtex, se cargó el aparato y se insertó el peine, permitiendo la completa polimerización del gel concentrador (\approx 45 minutos) antes de remover el peine.

A continuación, las muestras de proteínas fueron diluidas en una relación 1:1 con buffer 2x SDS, y se calentaron a 100° C y en agitación constante durante 5 minutos, después de este periodo, las muestras se colocaron en un baño de hielo. Una vez polimerizado el gel concentrador, se removió el vidrio y el gel sándwich del aparato, y el sándwich se enganchó al aparato de electroforesis. Cuidadosamente se removió el peine de gel y la parte superior del aparato se llenó con buffer de

electroforesis 1x SDS. El marcador de peso molecular y las muestras fueron cargadas con cuidado en el fondo de los pocillos utilizando una pipeta de punta plana. La parte inferior del aparato se llenó con buffer de electroforesis 1x SDS y el aparato se conectó a la fuente de alimentación. El gel se corrió a un voltaje de 80 V hasta que el colorante entro en el gel de separación, luego se aumentó la corriente a 100 V. Cuando el colorante llego a la parte inferior del gel separador, se apagó la fuente de alimentación, se removió el gel sándwich y se abrieron los geles usando un espaciador para hacer palanca y separarlos. Suavemente se cortó el gel concentrador, y el gel separador se colocó en un recipiente de plástico para teñir el gel durante 2 hrs y después fue desteñido durante 12 hrs.

5.8 Análisis estadísticos

Para agrupar los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* de acuerdo al tipo de inducción de NETs que presento tanto la bacteria como sus productos secretados, se realizó un análisis de percentiles. También se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas en la inducción de los NETs por *P. aeruginosa* al emplear la técnica de fluorometría. Ambos análisis se hicieron utilizando el programa GraphPad Prism 6.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

6.1 Identificación fenotípica de *P. aeruginosa*

En la figura 3A se muestra una imagen representativa de la tinción de Gram realizada a los 15 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* utilizadas para el presente estudio. Al observar en el microscopio, se puede apreciar que las bacterias presentan una coloración roja o rosada, lo cual indica que son bacterias gramnegativas; presentan una estructura en forma de bacilo recto o ligeramente curvado, con un diámetro de 0,5 a 1,0 μm y una longitud que varía de 1,5 a 5,0 μm . También se observa que algunas bacterias se organizan en parejas. Simultáneamente a la tinción de Gram se realizó la prueba de oxidasa, cuyos resultados se pueden observar en la figura 3B, donde se muestra una imagen simbólica de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* como oxidasa positiva, este resultado se distinguió por el desarrollo de un color azul oscuro en el sitio de la inoculación en un tiempo entre 10-20 segundos, lo que indica que las bacterias poseen actividad de citocromo oxidasa.

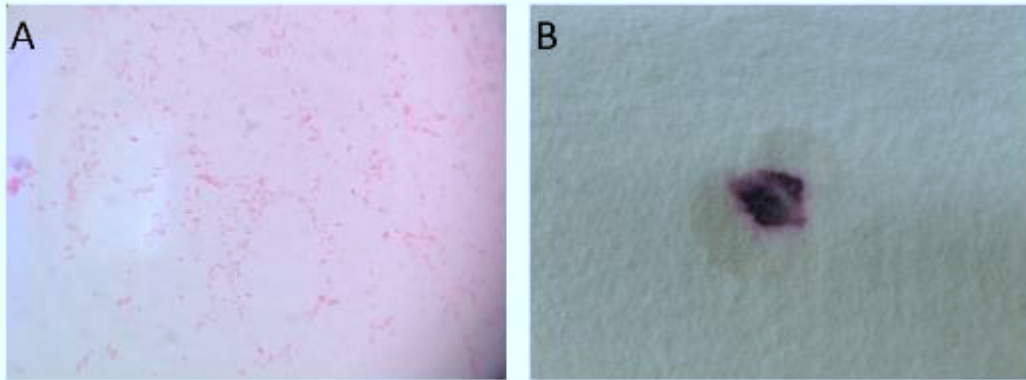


Figura 3. Tinción de Gram y prueba de oxidasa. (A) Imagen representativa de la tinción de Gram realizada a los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* observada a un aumento de 100x en el microscopio de campo claro, donde se aprecian las bacterias como gramnegativas. (B) Resultado representativo para la prueba de oxidasa, observándose la presencia de un color azul en el sitio de la inoculación, indicando un resultado positivo para la prueba.

La figura 4A muestra una imagen representativa del crecimiento de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* en agar Mac Conkey durante 24 hrs a 37° C. Después del periodo de incubación las cepas mostraron buen crecimiento, desarrollando colonias puntiformes, con borde ondulado, de elevación plana, que presentan una superficie rugosa con consistencia membranosa y una coloración desde incoloras a rosadas. En la figura 4B, se muestra de manera simbólica el crecimiento de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* en agar sangre durante 24 hrs a 37° C. Se desarrollaron colonias puntiformes, con borde entero y elevación convexa, presentando una superficie lisa y de consistencia cremosa, así como una coloración grisácea. También pudo apreciarse la producción de hemólisis β , como halos incoloros alrededor de las colonias de *P. aeruginosa*.

La figura 5 representa la producción de pigmentos en los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* después de 24 hrs de incubación a 37° C. En la figura 5A se observa el crecimiento bacteriano sin producción de pigmento; la figura 5B muestra crecimiento bacteriano con producción de pigmento en una tonalidad ligeramente verdosa; mientras que en la figura 5C se presenta el crecimiento bacteriano, así como la producción de pigmento en una coloración verde intenso. La producción de pigmento al medio de cultivo por parte de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* fue variable a lo largo del estudio; no así para las cepas mutantes, ya que estas siempre secretaron pigmentos, a excepción de la cepa de referencia PAO1 que nunca produjo pigmentos.

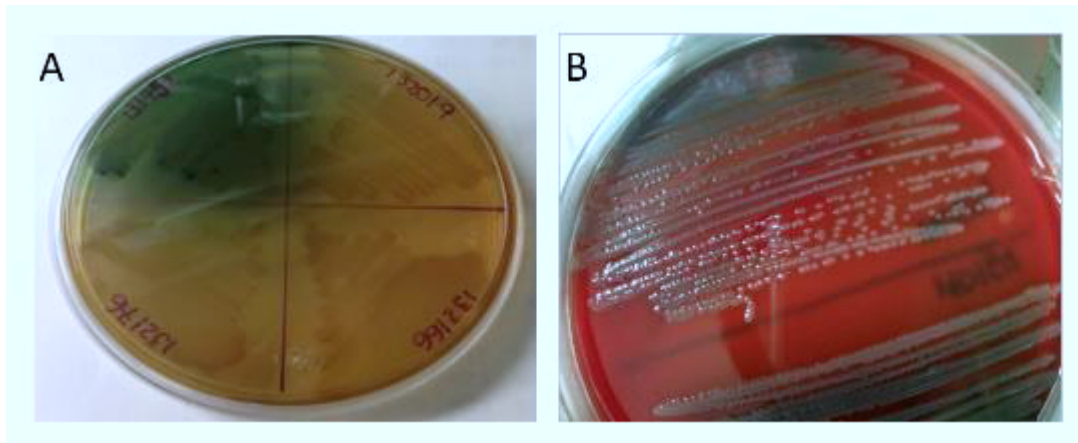


Figura 4. Crecimiento de *P. aeruginosa* en medios de cultivo. (A) En agar Mac Conkey se desarrollan colonias puntiformes, con una coloración desde incoloras a rosadas y también se puede observar la producción de pigmentos en el medio de cultivo. (B) El crecimiento en agar sangre se presenta con colonias puntiformes de una coloración grisácea con la producción de hemólisis β .

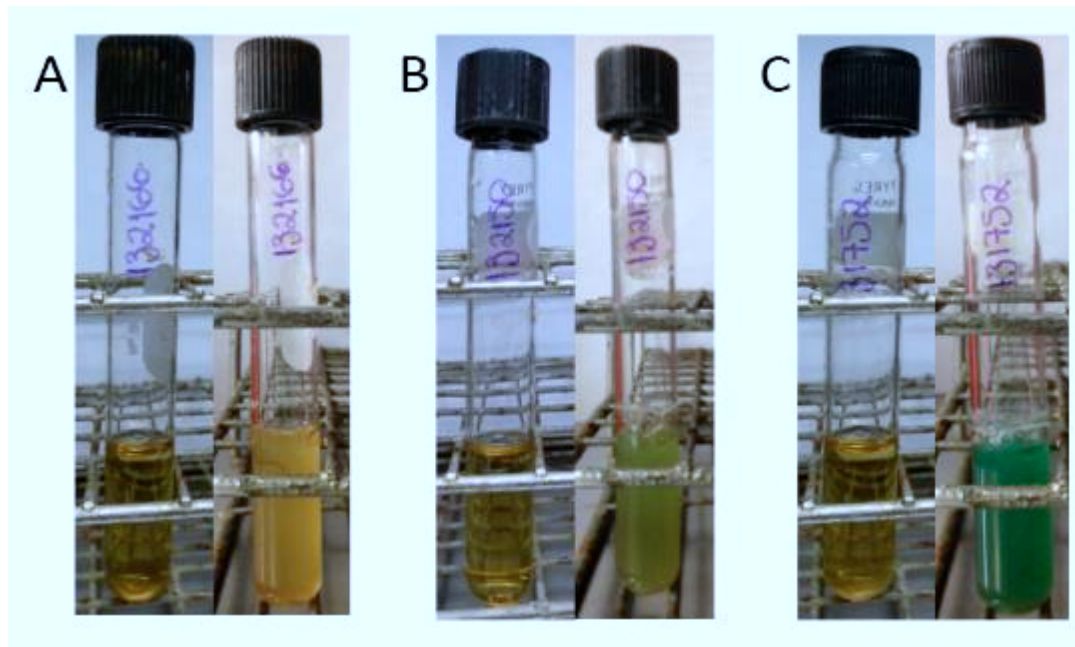


Figura 5. Producción de pigmentos por los aislados clínicos de *P. aeruginosa* en medio de cultivo líquido LB. Las imágenes muestran el medio de cultivo líquido antes y después del período de incubación. (A) Se observa el crecimiento bacteriano sin producción de pigmento; (B) así como crecimiento bacteriano con producción de pigmento ligeramente verdoso; (C) por último, se aprecia el crecimiento bacteriano, así como la producción de pigmento verde intenso.

6.2 Determinación de la multiplicidad de infección para los ensayos de inducción de NETs por *P. aeruginosa*

Los ensayos de inducción de NETs con el pellet bacteriano de *P. aeruginosa* se realizaron con la finalidad de analizar la capacidad de las bacterias para inducir los NETs; debido a esto, fue necesario establecer la multiplicidad de infección para usar en los ensayos posteriores. Los resultados se presentan en la figura 6; y al evaluar las distintas MOIs, se observó de manera interesante que la MOI más baja de 1:0.1, la cual equivale a 10 neutrófilos por cada bacteria, tiene una mayor capacidad para inducir los NETs, a pesar de que el neutrófilo puede utilizar otros mecanismos de defensa como fagocitosis o degranulación para eliminar a las bacterias. Por lo que se eligió esta MOI para el resto de los experimentos. También se realizaron ensayos adicionando el sobrenadante filtrado de *P. aeruginosa* para evaluar la capacidad de los productos secretados por la bacteria para inducir los NETs, observando que al emplear el 3% del sobrenadante filtrado hay una mayor inducción de NETs, y estos se presentan con una morfología delobulada a diferencia del 30% del sobrenadante donde la presencia de rayas es abundante, como se observa en la figura 7.

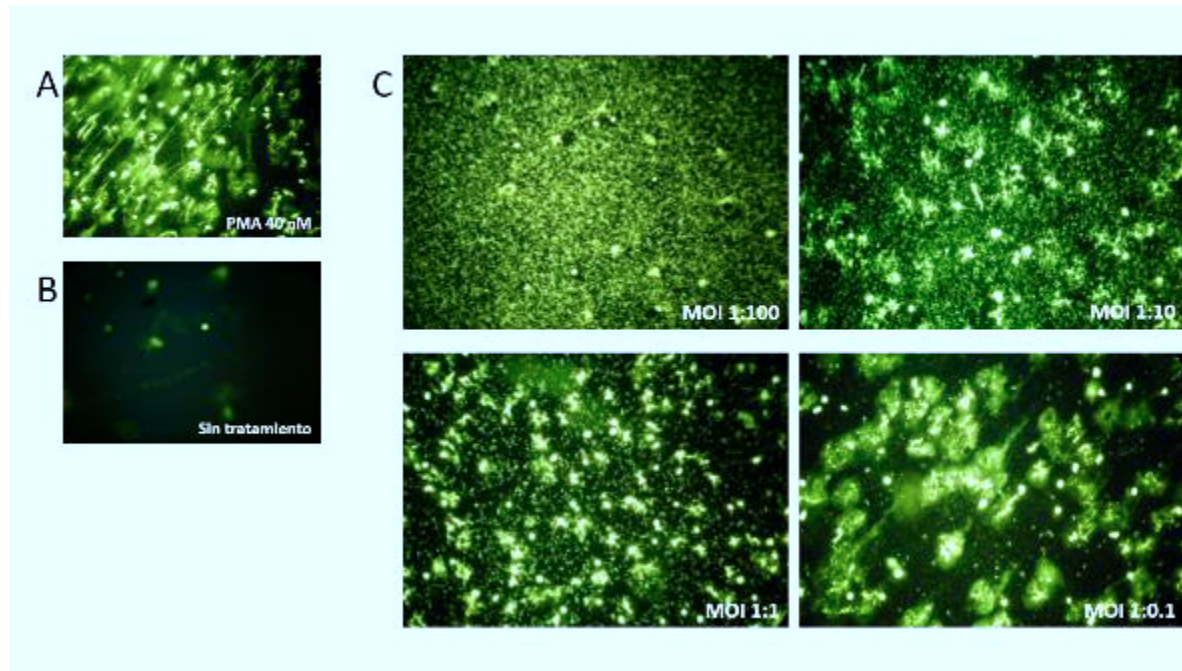


Figura 6. Inducción de NETs por diferentes MOIs de *P. aeruginosa*. (A) Neutrófilos estimulados con PMA 40 nM como control positivo. (B) Neutrófilos estimulados con RPMI como control negativo. (C) Inducción de NETs a una MOI de 1:100 (imagen superior izquierda); inducción de NETs a una MOI de 1:10 (imagen superior derecha); inducción de NETs a una MOI de 1:1 (imagen inferior izquierda); e inducción de NETs a una MOI de 1:0.1 (imagen inferior derecha).

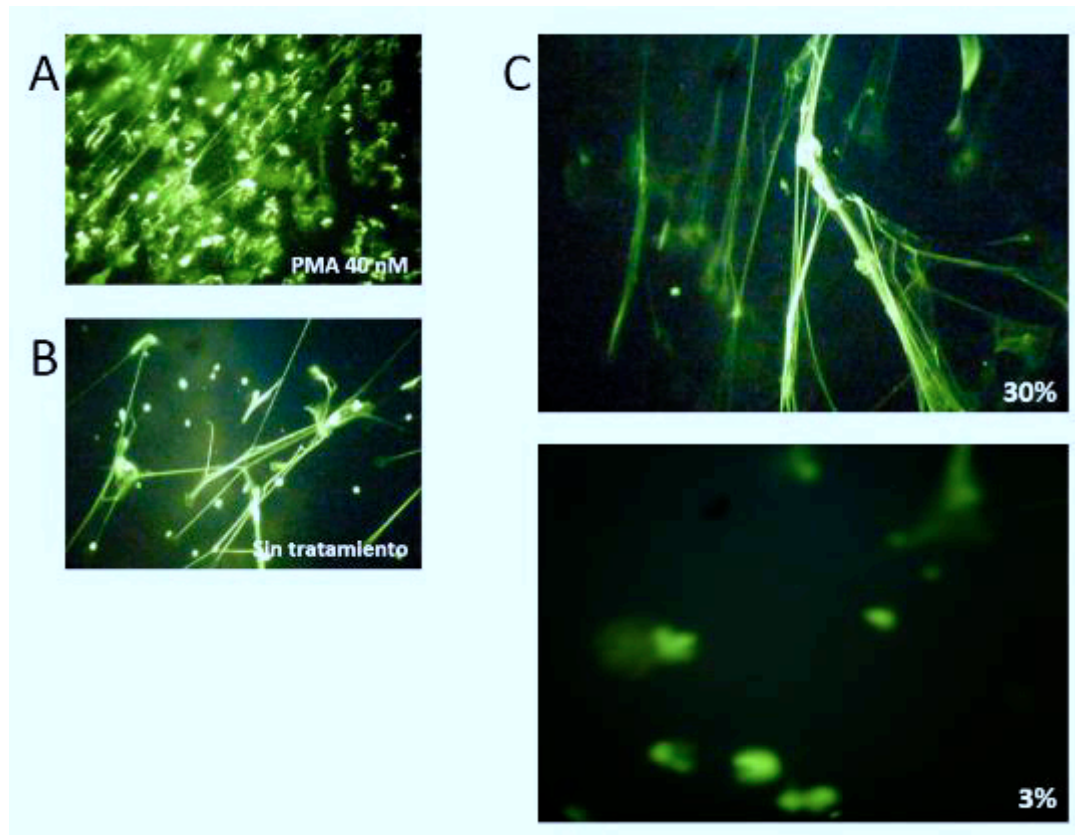


Figura 7. Inducción de NETs por diferentes concentraciones del sobrenadante filtrado de *P. aeruginosa*. (A) Neutrófilos estimulados con PMA 40 nM como control positivo. (B) Neutrófilos estimulados con medio líquido LB como control negativo. (C) Inducción de NETs con 30% del sobrenadante filtrado (imagen superior); e inducción de NETs con 3% del sobrenadante filtrado (imagen inferior).

6.3 Inducción de NETs por los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*

Se ha demostrado que *P. aeruginosa* induce a la formación de NETs, sin embargo, a la fecha se desconoce el mecanismo completo de dicha inducción, por lo que en este estudio se analizó la inducción de NETs por aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* y su relación con la secreción de pigmentos al medio de cultivo.

En el Apéndice A se incluye la lista de aislamientos clínicos que fueron utilizados para los ensayos de inducción de NETs; también contiene información sobre la producción de pigmentos de cada cepa al momento de realizar los experimentos. Para una mejor visualización de los resultados, los aislamientos clínicos han sido agrupados en cinco experimentos distintos.

6.3.1 Cuantificación por expansión nuclear de los NETs inducidos por aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*

La figura 8 representa la cuantificación de los NETs, ya que se realiza una gráfica donde el eje “X” representa el área del ADN en micrómetros cuadrados (μm^2), y el eje “Y” se refiere al porcentaje de todas las células positivas para el fluoróforo *Sytox*[®] *Green*. El área de un neutrófilo normal es de $80 \mu\text{m}^2$, por lo que un aumento en el área nuclear del neutrófilo se verá reflejado como un desplazamiento en la gráfica hacia la derecha. También se ha reportado por Hakkim *et al.*, que el neutrófilo en NETosis atraviesa por cuatro etapas diferentes, a las cuales les asignamos distintos valores con base en el área del ADN. Dichas etapas son: lobulado ($100 -159 \mu\text{m}^2$),

delobulado (160 -310 μm^2), NET difuso (311 - 400 μm^2) y NET disperso (401 -600 μm^2) [35].

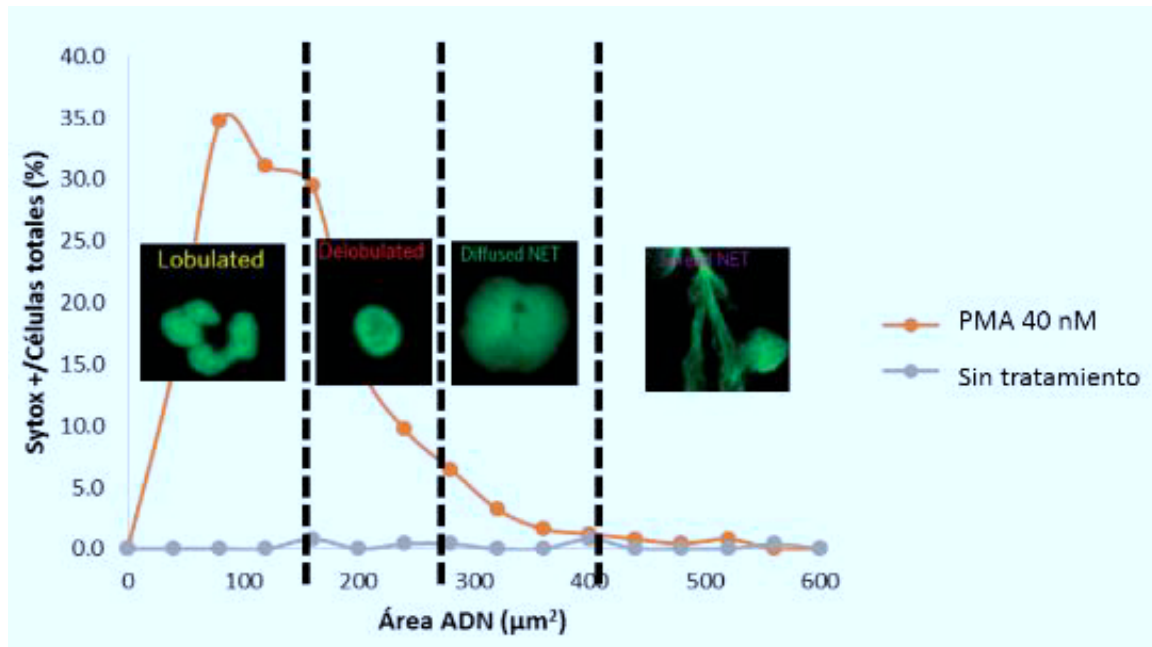


Figura 8. Gráfica de expansión nuclear del neutrófilo en NETosis y las diferentes morfologías que se presentan los NETs.

En todos los experimentos realizados para la inducción de NETs se empleó la dilución 0.1 (1×10^4 bacterias/mL) para los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*. Después de que se llevó a cabo la inducción de NETs utilizando los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, se hizo una incubación breve de las células con el fluoróforo Sytox[®] Green que tienen una λ_{Ex} a 504 nm y una λ_{Em} a 523 nm, lo que resultó en una fluorescencia verde brillante. Como control positivo se utilizaron neutrófilos estimulados con PMA 40 nM, y como control negativo neutrófilos sin estimular y neutrófilos estimulados con LB.

En la figura 9 se presenta la inducción de NETs originada por los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* del experimento I. La figura 9C representa las imágenes correspondientes a la poca inducción de NETs en etapa delobulada y de NET difuso por el aislado clínico A1, entretanto que A2 indujo a la formación de NETs en etapas delobulada y de NET difuso. La figura 9D incluye el resultado obtenido de la expansión nuclear en la etapa delobulada, donde se calculó que A1 (8,3%) presentó una inducción de NETs comparable al control positivo (10%), mientras que A2 (18,3%) mostró una NETosis mayor al control positivo.

La figura 10 muestra la inducción de NETs promovida por el sobrenadante filtrado de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* del experimento I. En la figura 10C se muestra la poca presencia de NETs principalmente en etapa delobulada y algunas células como NET difuso inducidos por el aislado clínico A1; mientras que A2 mostró escasa inducción de NETs en etapa delobulada. En la figura 10D se demuestra el resultado de la expansión nuclear en la etapa delobulada, donde se observa que A1 (2,8%) y A2 (3,9%) tiene un porcentaje de inducción de NETs menor al del control positivo (10%).

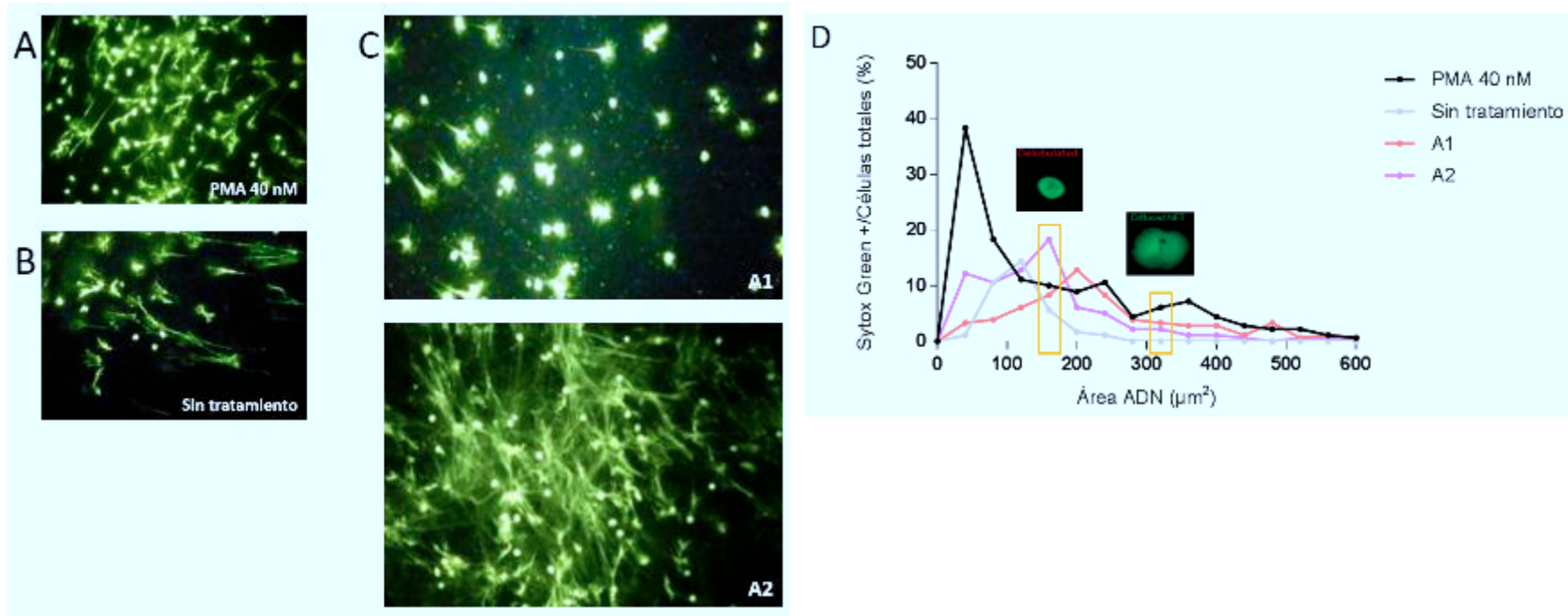


Figura 9. Inducción de NETs por aislados clínicos de *P. aeruginosa* del experimento I. (A) Neutrófilos estimulados con PMA 40 nM como control positivo. (B) Neutrófilos estimulados con RPMI como control negativo. (C) Inducción de NETs por A1 (imagen superior) y A2 (imagen inferior) empleando la MOI 1:0.1. Imágenes de fluorescencia observadas con el objetivo 20x (D) Gráfica de la cuantificación de la expansión nuclear del neutrófilo.

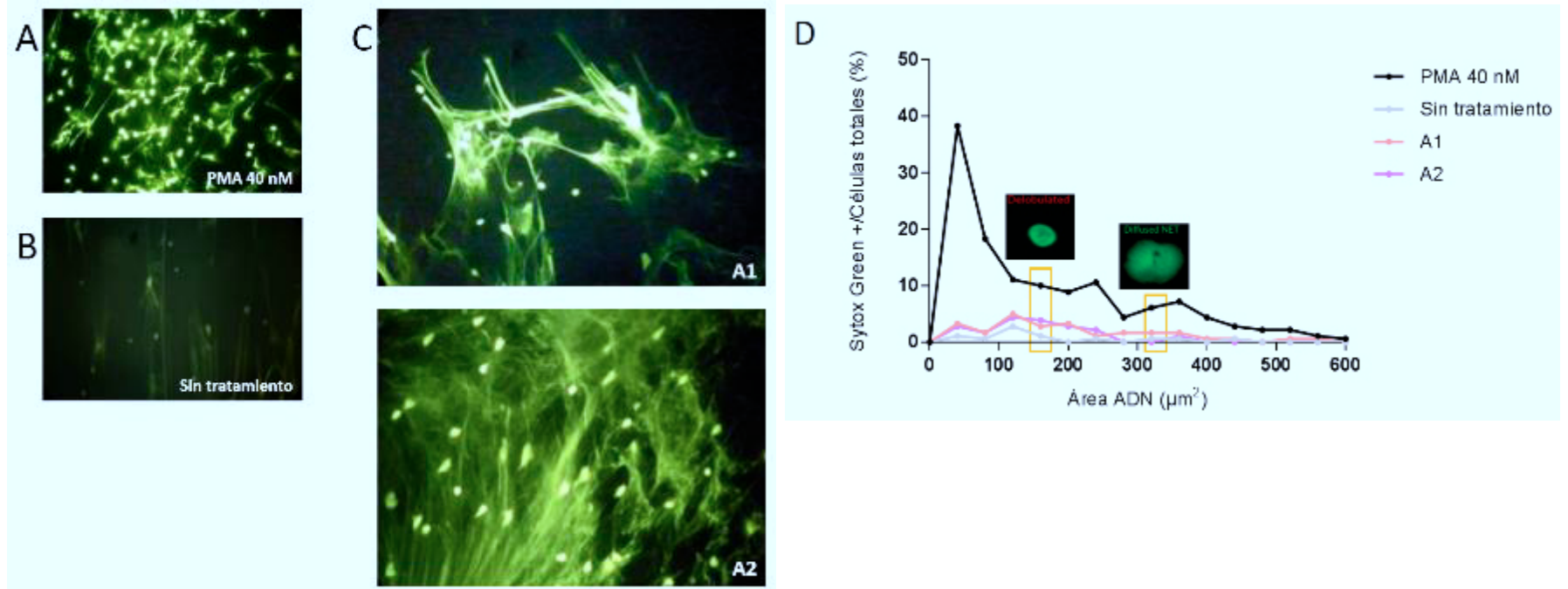


Figura 10. Inducción de NETs por el sobrenadante de los aislados clínicos de *P. aeruginosa* del experimento I. (A) Neutrófilos estimulados con PMA 40 nM como control positivo. (B) Neutrófilos estimulados con el medio de cultivo líquido LB como control negativo. (C) Inducción de NETs por el 3% del sobrenadante de A1 (imagen superior) y A2 (imagen inferior). Imágenes de fluorescencia observadas con el objetivo 20x. (D) Gráfica de la cuantificación de la expansión nuclear del neutrófilo.

La figura 11 muestra la inducción de NETs promovida por los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* del experimento II. En la figura 11C se aprecian las imágenes correspondientes a una inducción de NETs muy similar a la del control positivo (11A) para los aislados clínicos A3 y A4, además se pueden observar los NETs en la etapa lobulada y delobulada. La figura 11D incluye el resultado obtenido de la expansión nuclear, donde se calculó que A3 y A4 tienen una inducción de NETs con valores de 32,7% y 33,9% respectivamente, por lo que representan valores mayores al del control positivo (29,4%).

En la figura 12 se presenta la inducción de NETs originada por el sobrenadante filtrado de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* del experimento II. La figura 12C muestra la escasa presencia de NETs en etapa delobulada inducidos por el sobrenadante del aislado clínico A3, mientras que A4 presenta una menor inducción de NETs principalmente en etapa delobulada. En la figura 12D se presenta el resultado de la expansión nuclear, arrojando porcentajes menores a los del control positivo (29,4%), que son de 0,8% y 6,9% para A3 y A4 respectivamente.

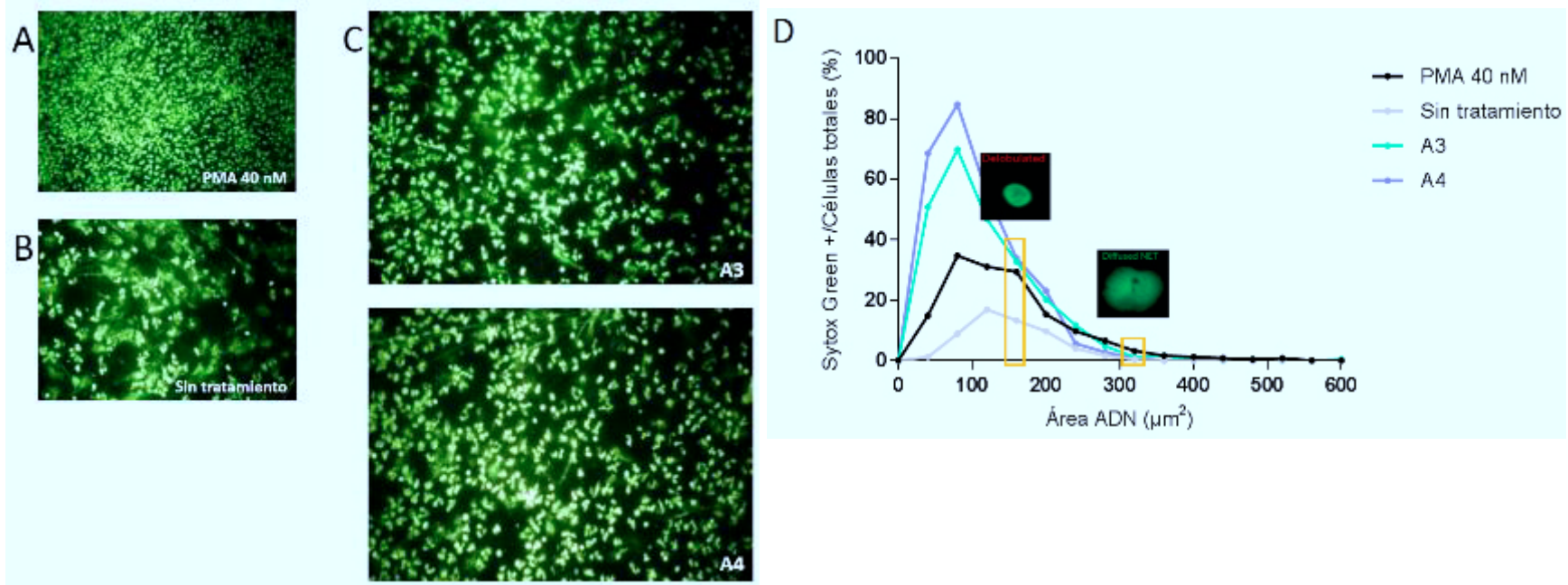


Figura 11. Inducción de NETs por aislados clínicos de *P. aeruginosa* del experimento II. (A) Neutrófilos estimulados con PMA 40 nM como control positivo. (B) Neutrófilos estimulados con RPMI como control negativo. (C) Inducción de NETs por A3 (imagen superior) y A4 (imagen inferior) empleando la MOI 1:0.1. Imágenes de fluorescencia observadas con el objetivo 20x. (D) Gráfica de la cuantificación de la expansión nuclear del neutrófilo.

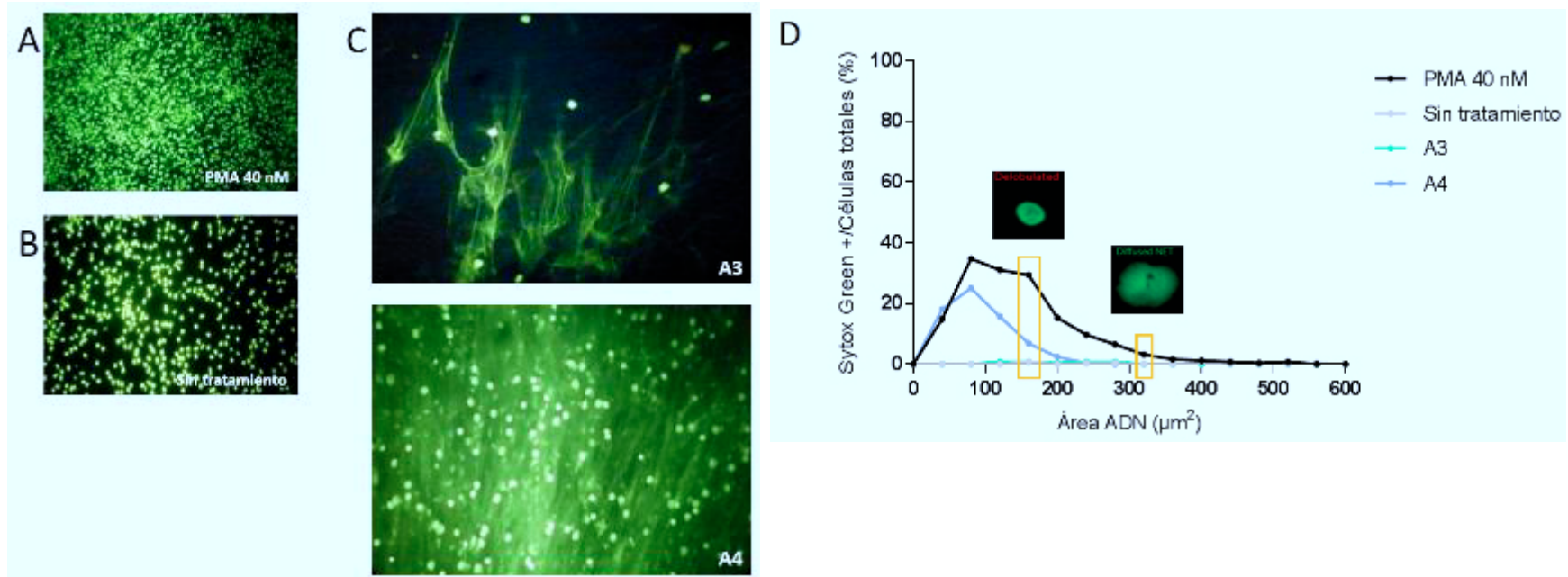


Figura 12. Inducción de NETs por el sobrenadante de los aislados clínicos de *P. aeruginosa* del experimento II. (A) Neutrófilos estimulados con PMA 40 nM como control positivo. (B) Neutrófilos estimulados con el medio de cultivo líquido LB como control negativo. (C) Inducción de NETs por el 3% del sobrenadante de A3 (imagen superior) y A4 (imagen inferior). Imágenes de fluorescencia observadas con el objetivo 20x. (D) Gráfica de la cuantificación de la expansión nuclear del neutrófilo.

En la figura 13 se presenta la inducción de NETs originada por los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* del experimento III. La figura 13C representa las imágenes correspondientes a una inducción de NETs en etapa delobulada por el aislado clínico A5, pero en menor cantidad al control positivo (13A); mientras que A6 induce a la formación de NETs en etapas delobulada, NET difuso y NET disperso; por otra parte, A7 y A8 presentaron NETs en etapa delobulada muy similar al control positivo. La figura 13D incluye el resultado obtenido de la expansión nuclear en la etapa delobulada, donde se calculó que los aislados clínicos A5 (13,8%) y A6 (10,7%) presentaron una menor inducción de NETs en comparación al control positivo (22,8%), mientras que A7 (22,4%) y A8 (21,2%) mostraron una NETosis muy similar al control positivo.

La figura 14 muestra la inducción de NETs promovida por el sobrenadante filtrado de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* del experimento III. En la figura 14C se muestra la presencia de NETs principalmente en etapa delobulada inducidos por los aislados clínicos A5, A6 y A8; mientras que A7 muestra poca inducción de NETs, pero en etapa de NET difuso y NET disperso. En la figura 14D se demuestra el resultado de la expansión nuclear en la etapa delobulada, donde se observa que A5 (20,1%) y A8 (23,8%) tiene un porcentaje de inducción de NETs similar o incluso mayor al del control positivo (22,8%), mientras que A6 (12%) y A7 (4,7%) inducen niveles bajos de NETs.

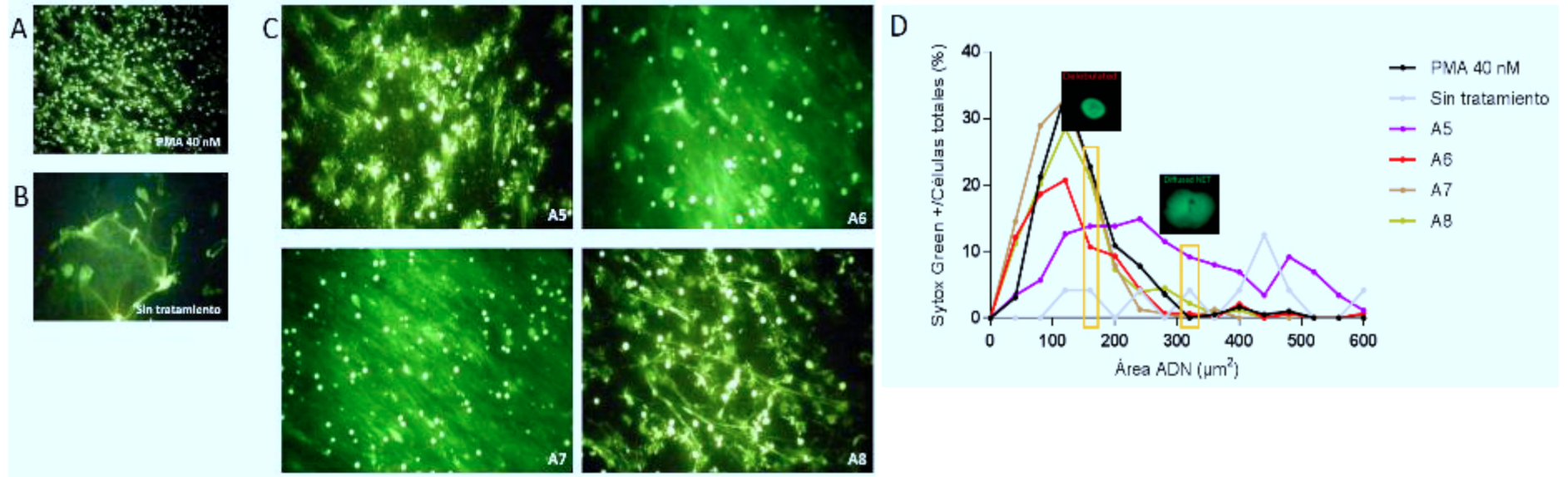


Figura 13. Inducción de NETs por aislados clínicos de *P. aeruginosa* del experimento III. (A) Neutrófilos estimulados con PMA 40 nM como control positivo. (B) Neutrófilos estimulados con RPMI como control negativo. (C) Inducción de NETs por A5 (imagen superior izquierda), A6 (imagen superior derecha), A7 (imagen inferior izquierda) y A8 (imagen inferior derecha) empleando la MOI 1:0.1. Imágenes de fluorescencia observadas con el objetivo 20x. (D) Gráfica de la cuantificación de la expansión nuclear del neutrófilo.

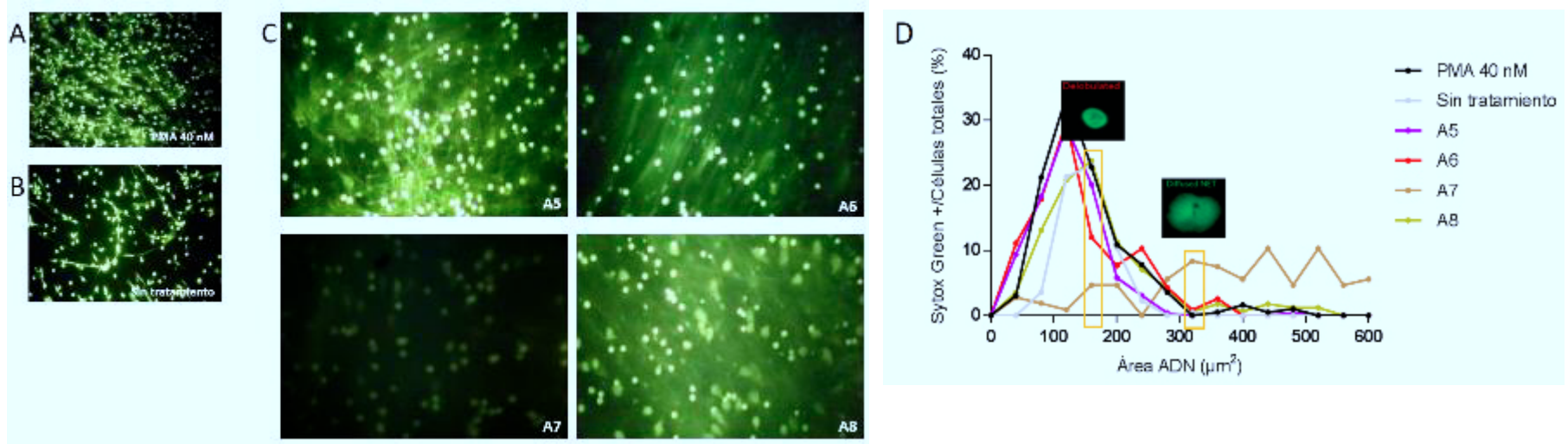


Figura 14. Inducción de NETs por el sobrenadante de los aislados clínicos de *P. aeruginosa* del experimento III. (A) Neutrófilos estimulados con PMA 40 nM como control positivo. (B) Neutrófilos estimulados con el medio de cultivo líquido LB como control negativo. (C) Inducción de NETs por el 3% del sobrenadante de por A5 (imagen superior izquierda), A6 (imagen superior derecha), A7 (imagen inferior izquierda) y A8 (imagen inferior derecha). Imágenes de fluorescencia observadas con el objetivo 20x. (D) Gráfica de la cuantificación de la expansión nuclear del neutrófilo.

La figura 15 muestra la inducción de NETs promovida por los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* del experimento IV. En la figura 15C se aprecian las imágenes correspondientes a una inducción de NETs muy similar a la del control positivo (15A) para los aislados clínicos A9, A10, A11 y A12, además se pueden observar los NETs en la etapa delobulada y una proporción menor como lobulados y NET difuso. La figura 15D incluye el resultado obtenido de la expansión nuclear, donde se calculó que los aislados clínicos A9-A12 tienen una inducción de NETs con valores de 17.9%, 22%, 26.7% y 26.7% respectivamente, por lo que representan valores comparables al control positivo (21.2%).

En la figura 16 se presenta la inducción de NETs originada por el sobrenadante filtrado de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* del experimento IV. Las figuras 16C muestra la presencia de NETs inducidos por el sobrenadante de los aislados A9, A10, A11 y A12 respectivamente, y destacan las células NETóticas principalmente en etapa lobulada y delobulada. En la figura 16D se presenta el resultado de la expansión nuclear, arrojando porcentajes menores a los del control positivo (21.2%), que van desde 17.4%, 16.1% y 13.6% para los aislados clínicos A10, A11 y A12 respectivamente; siendo el aislamiento clínico A9 el que presenta una inducción de NETs incluso menor a la del control negativo (7.7%) con un valor de 2.9%.

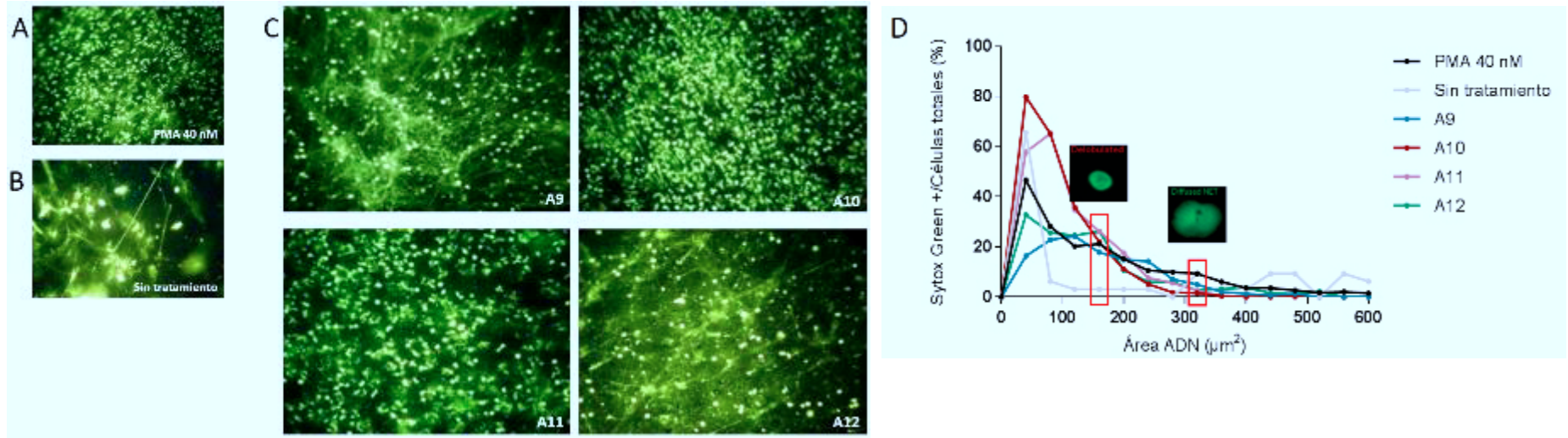


Figura 15. Inducción de NETs por aislados clínicos de *P. aeruginosa* del experimento IV. (A) Neutrófilos estimulados con PMA 40 nM como control positivo. (B) Neutrófilos estimulados con RPMI como control negativo. (C) Inducción de NETs por A9 (imagen superior izquierda), A10 (imagen superior derecha), A11 (imagen inferior izquierda) y A12 (imagen inferior derecha) empleando la MOI 1:0.1. Imágenes de fluorescencia observadas con el objetivo 20x. (D) Grafica de la cuantificación de la expansión nuclear del neutrófilo.

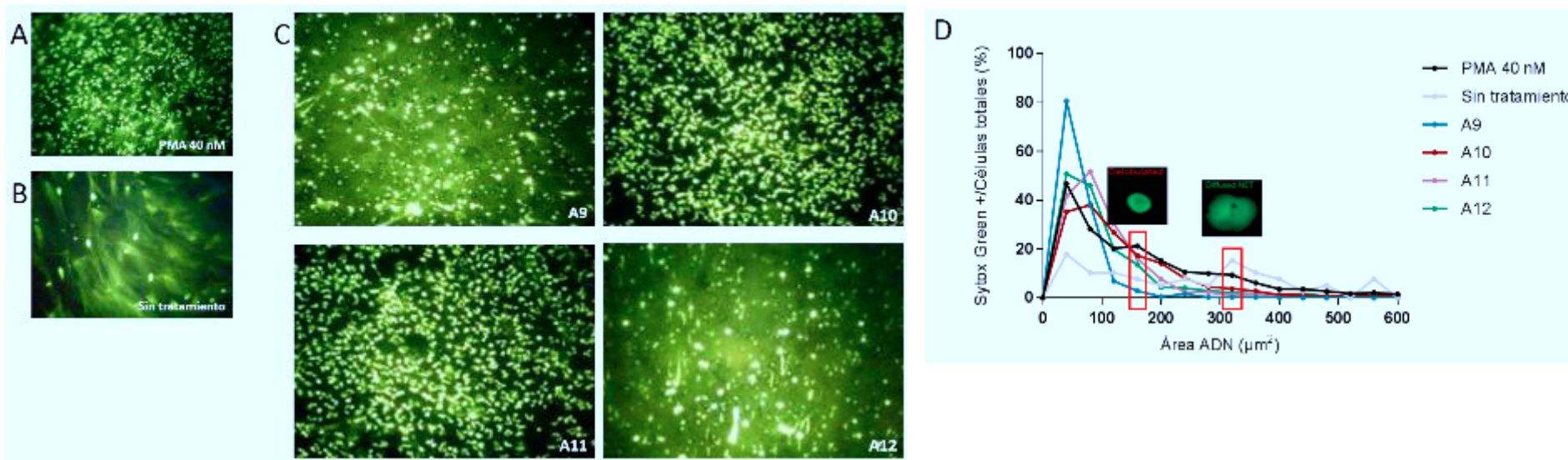


Figura 16. Inducción de NETs por el sobrenadante de los aislados clínicos de *P. aeruginosa* del experimento IV. (A) Neutrófilos estimulados con PMA 40 nM como control positivo. (B) Neutrófilos estimulados con el medio de cultivo líquido LB como control negativo. (C) Inducción de NETs por el 3% del sobrenadante de por A9 (imagen superior izquierda), A10 (imagen superior derecha), A11 (imagen inferior izquierda) y A12 (imagen inferior derecha). Imágenes de fluorescencia observadas con el objetivo 20x. (D) Grafica de la cuantificación de la expansión nuclear del neutrófilo.

En la figura 17 se presenta la inducción de NETs originada por los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* del experimento V. La figura 17C representa las imágenes correspondientes a una inducción de NETs menor a la del control positivo (17A) para los aislados clínicos A13, A14, A15 y A16, además se pueden observar los NETs principalmente en la etapa delobulada, y una proporción menor como NET difuso y NET disperso. La figura 17D incluye el resultado obtenido de la expansión nuclear en la etapa delobulada, donde se calculó que los aislados clínicos A13-A16 tienen una inducción de NETs con valores de 9,7%, 18,4%, 11,9% y 17,5% respectivamente, por lo que representan valores menores de inducción de NETs en comparación con el control positivo (23,7%).

La figura 18 muestra la inducción de NETs promovida por el sobrenadante filtrado de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* del experimento V. En la figura 18C se muestra la presencia de NETs inducidos por el sobrenadante de los aislados A13, A14, A15 y A16 respectivamente, y se observa el mayor porcentaje de las células NETóticas en la etapa delobulada para los cuatro aislados clínicos, destacando el asilado A13, el cual presenta principalmente células NETóticas en etapa delobulada, NET difuso y NET disperso. En la figura 18D se demuestra el resultado de la expansión nuclear en la etapa delobulada, donde se observan porcentajes menores a los del control positivo (21,2%) para A14 (14,0%) y A16 (18,3%), entretanto A13 (9,8%) y A15 (9,4%) presentan menor porcentaje de inducción de NETs que el control negativo (11,6%).

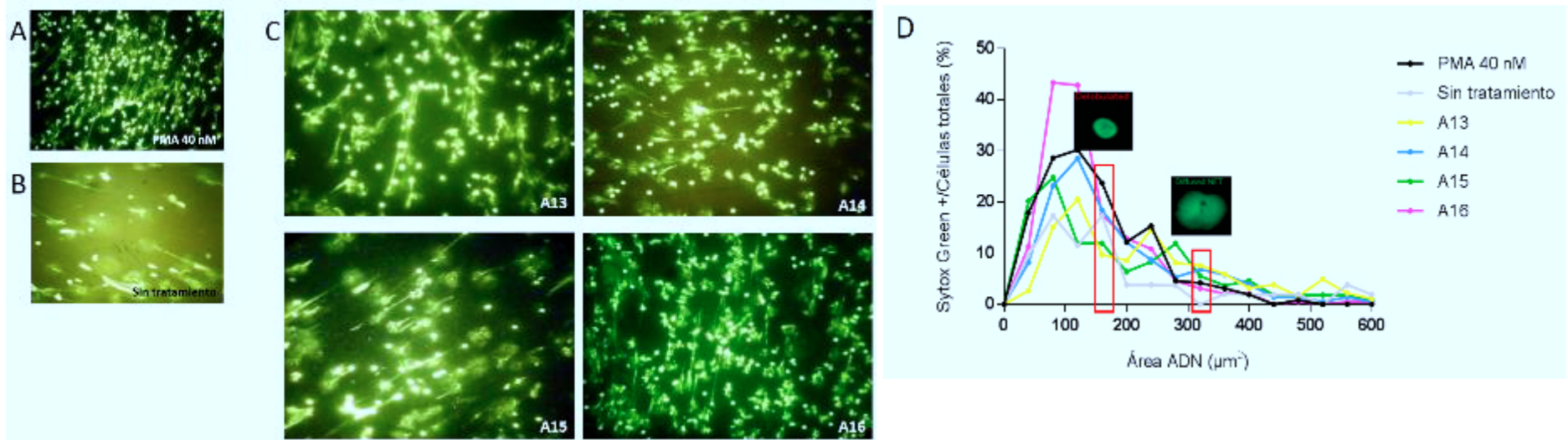


Figura 17. Inducción de NETs por aislados clínicos de *P. aeruginosa* del experimento V. (A) Neutrófilos estimulados con PMA 40 nM como control positivo. (B) Neutrófilos estimulados con RPMI como control negativo. (C) Inducción de NETs por A13 (imagen superior izquierda), A14 (imagen superior derecha), A15 (imagen inferior izquierda) y A16 (imagen inferior derecha) empleando la MOI 1:0.1. Imágenes de fluorescencia observadas con el objetivo 20x. (D) Grafica de la cuantificación de la expansión nuclear del neutrófilo.

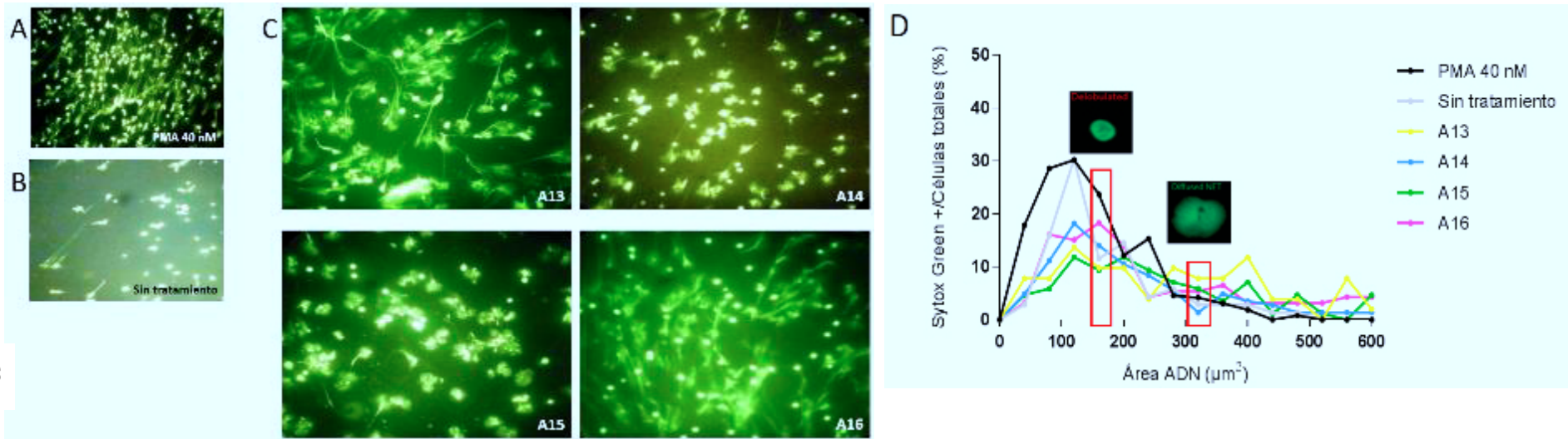


Figura 18. Inducción de NETs por el sobrenadante de los aislados clínicos de *P. aeruginosa* del experimento V. (A) Neutrófilos estimulados con PMA 40 nM como control positivo. (B) Neutrófilos estimulados con el medio de cultivo líquido LB como control negativo. (C) Inducción de NETs por el 3% del sobrenadante de por A13 (imagen superior izquierda), A14 (imagen superior derecha), A15 (imagen inferior izquierda) y A16 (imagen inferior derecha). Imágenes de fluorescencia observadas con el objetivo 20x. (D) Grafica de la cuantificación de la expansión nuclear del neutrófilo.

6.3.2 Análisis de percentiles para la inducción de NETs por aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*

El percentil es una de las medidas de posición no central que se puede describir como una forma de comparación de resultados. El percentil es un número de 0 a 100 que está muy relacionado con el porcentaje pero que no es un porcentaje en sí. Para un conjunto de datos, el percentil para un valor dado indica el porcentaje de datos que son igual o menores que dicho valor, en otras palabras, indica donde se posiciona una muestra con respecto al total. Este análisis permitió agrupar los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* de acuerdo al tipo de inducción de NETs que presento tanto la bacteria como sus productos secretados, en inducción negativa de NETs, baja inducción de NETs, media inducción de NETs y alta inducción de NETs, de acuerdo al tipo de morfología que estos presentaron.

En la figura 19A se muestran los resultados obtenidos de la expansión nuclear del neutrófilo, a partir de la inducción de NETs con morfología delobulada de los 16 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*. El análisis de percentiles permitió agrupar a los aislamientos clínicos de la siguiente manera: 4 aislados clínicos con baja inducción de NETs (A1, A6, A13 y A15); 8 aislados clínicos con media inducción de NETs (A2, A5, A7, A8, A9, A10, A14 y A16); y 4 aislados clínicos con alta inducción de NETs (A3, A4, A11 y A12) como se observa en la figura 19B.

La figura 20A muestra los resultados obtenidos de la expansión nuclear del neutrófilo, a partir de la inducción de NETs con morfología delobulada de los productos secretados por los 16 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*. Los aislamientos clínicos fueron agrupados de la siguiente manera con base en el análisis de percentiles: 4 aislados clínicos con baja inducción de NETs (A1, A2, A3 y A9); 8 aislados clínicos con media inducción de NETs (A4, A6, A7, A11, A12, A13, A14 y A15); y 4 aislados clínicos con alta inducción de NETs (A5, A8, A10 y A16) como se observa en la figura 20B.

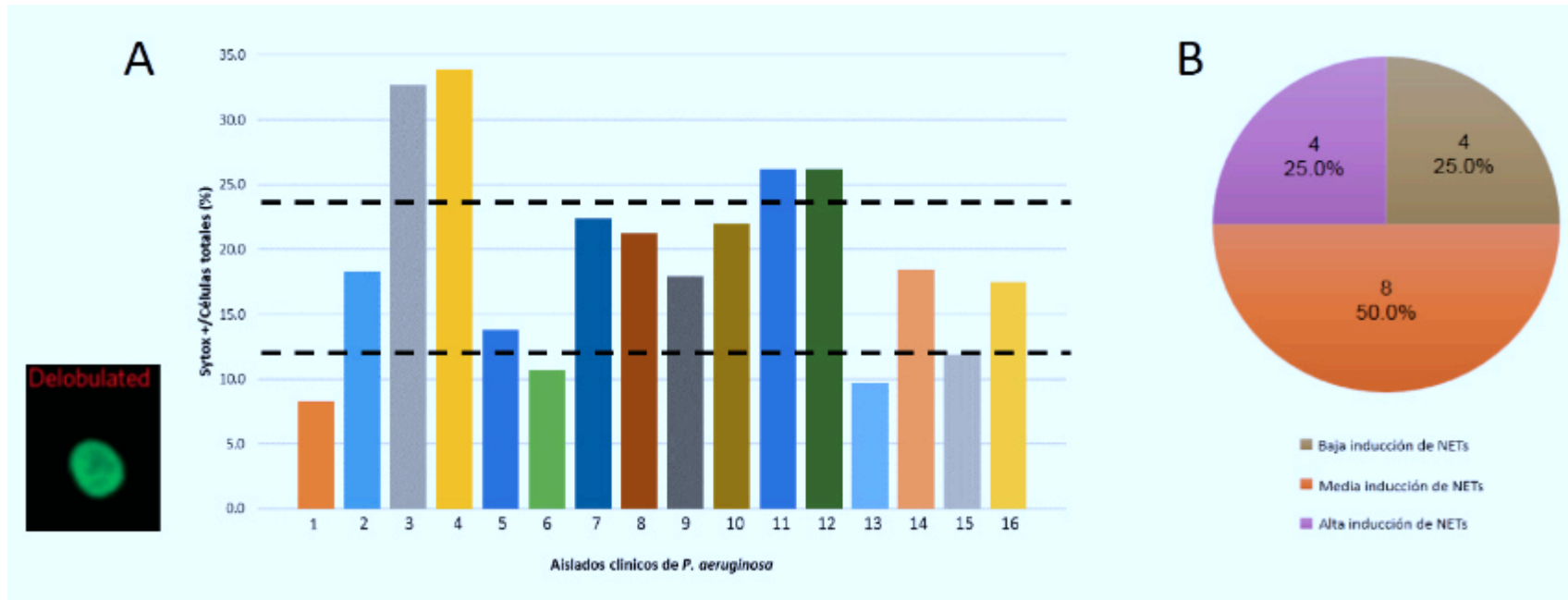


Figura 19. Expansión nuclear del neutrófilo, a partir de la inducción de NETs con morfología delobulada de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*. (A) Gráfica de barras donde se incluye el resultado de inducción de NETs de los 16 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, y divididos de acuerdo al análisis de percentiles. (B) Gráfica de pastel donde se agrupan los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* de acuerdo al nivel de inducción de NETs.

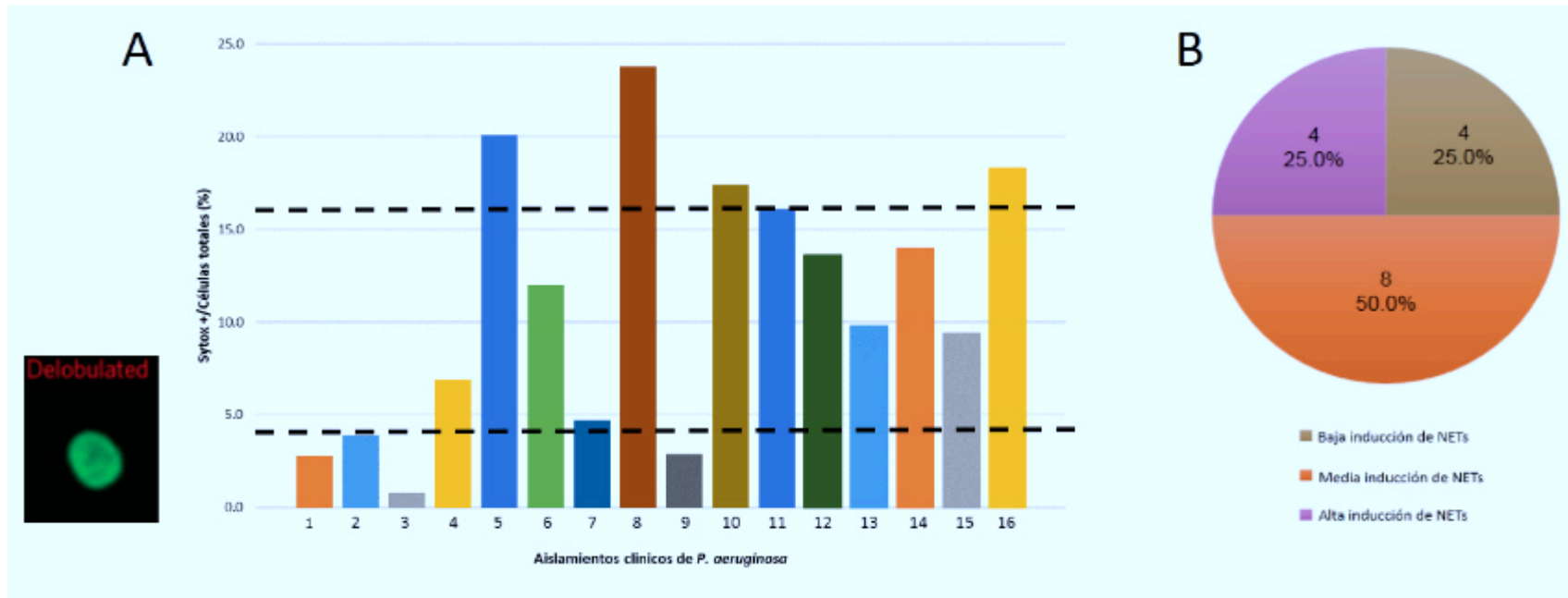


Figura 20. Expansión nuclear del neutrófilo, a partir de la inducción de NETs con morfología delobulada de los productos secretados por los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*. (A) Gráfica de barras donde se incluye el resultado de inducción de NETs de los 16 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, y divididos de acuerdo al análisis de percentiles. (B) Gráfica de pastel donde se agrupan los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* de acuerdo al nivel de inducción de NETs.

En la figura 21A se muestran los resultados obtenidos de la expansión nuclear del neutrófilo, a partir de la inducción de NETs con morfología delobulada de los 16 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*. El análisis de percentiles permitió agrupar a los aislamientos clínicos de la siguiente manera: 1 aislado clínico con inducción negativa de NETs (A7); 3 aislados clínicos con baja inducción de NETs (A3, A4 y A5); 8 aislados clínicos con media inducción de NETs (A1, A2, A8, A9, A10, A11, A12 y A16); y 4 aislados clínicos con alta inducción de NETs (A5, A13, A14 y A15) como se observa en la figura 22B.

La figura 22A muestra los resultados obtenidos de la expansión nuclear del neutrófilo, a partir de la inducción de NETs con morfología delobulada de los productos secretados por los 16 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*. Los aislamientos clínicos fueron agrupados de la siguiente manera con base en el análisis de percentiles: 4 aislados clínicos con inducción negativa de NETs (A2, A3, A4 y A5); 8 aislados clínicos con baja inducción de NETs (A1, A6, A8, A9, A10, A11, A12 y A14); 4 aislados clínicos con media inducción de NETs (A7, A13, A15 y A16); y ningún aislado clínico con alta inducción de NETs como se observa en la figura 22B.

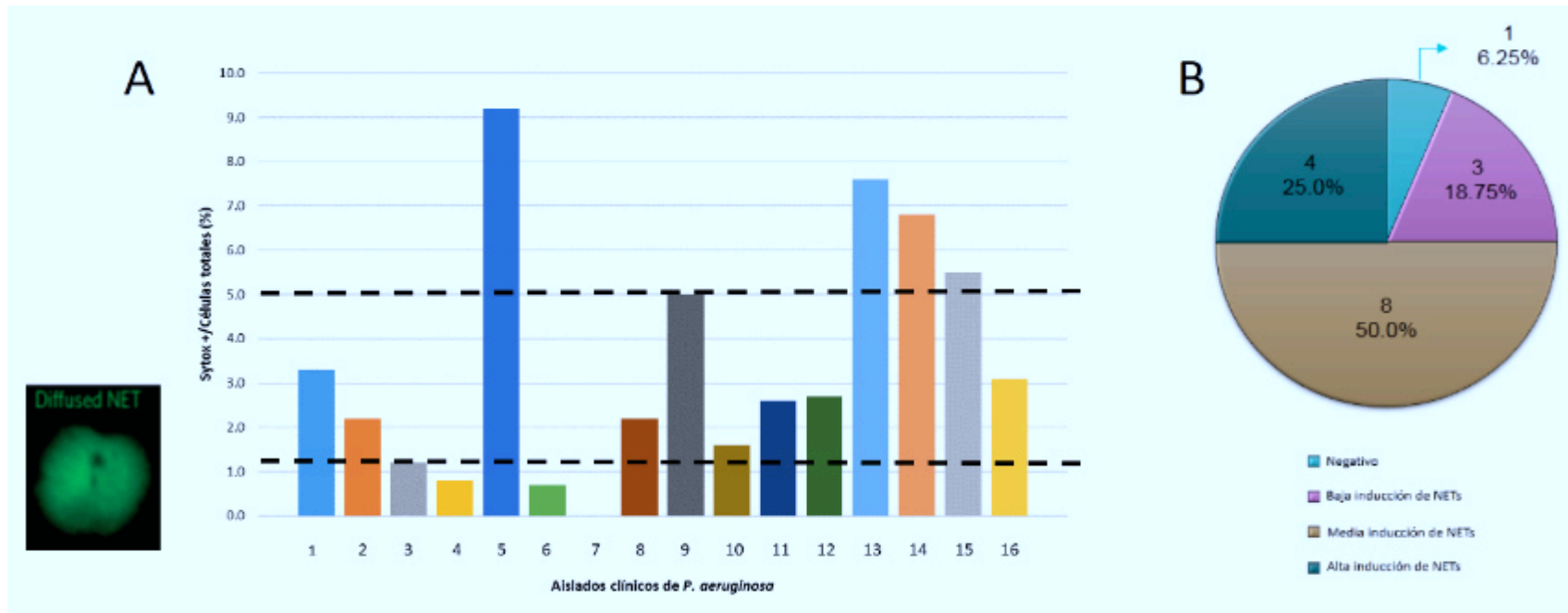


Figura 21. Expansión nuclear del neutrófilo, a partir de la inducción de NETs con morfología de NET difuso de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*. (A) Gráfica de barras donde se incluye el resultado de inducción de NETs de los 16 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, y divididos de acuerdo al análisis de percentiles. (B) Gráfica de pastel donde se agrupan los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* de acuerdo al nivel de inducción de NETs.

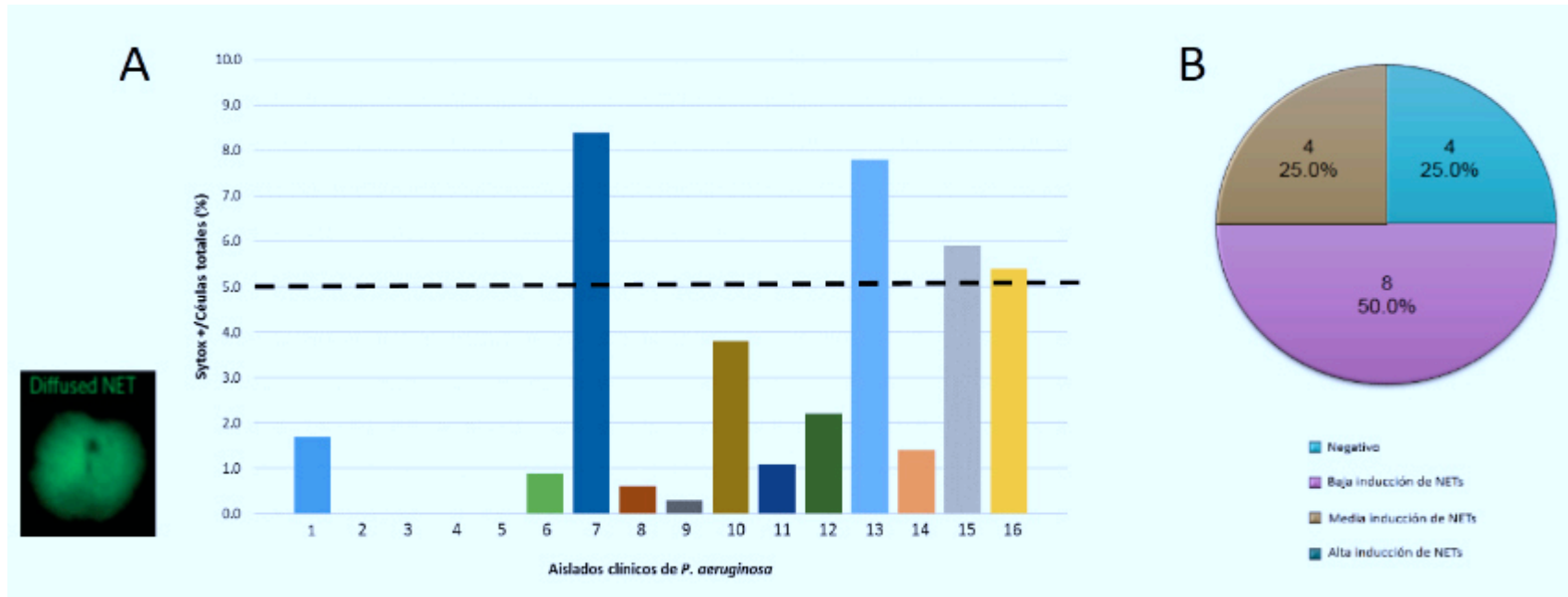


Figura 22. Expansión nuclear del neutrófilo, a partir de la inducción de NETs con morfología de NET difuso de los productos secretados por los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*. (A) Gráfica de barras donde se incluye el resultado de inducción de NETs de los 16 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, y divididos de acuerdo al análisis de percentiles. (B) Gráfica de pastel donde se agrupan los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* de acuerdo al nivel de inducción de NETs.

Con base en los resultados obtenidos del análisis de percentiles, los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* fueron clasificados de acuerdo al nivel de inducción de NETs obtenido por la bacteria y sus productos secretados, tanto en la morfología delobulada como NET difuso (Figura 23). Observando que todos los aislados clínicos de *P. aeruginosa* presentan diferentes niveles de inducción de NETs en ambas morfologías, pero de manera interesante los aislados A2, A6 y A16 mostraron la misma inducción de NETs por la bacteria y sus productos secretados en las dos morfologías.

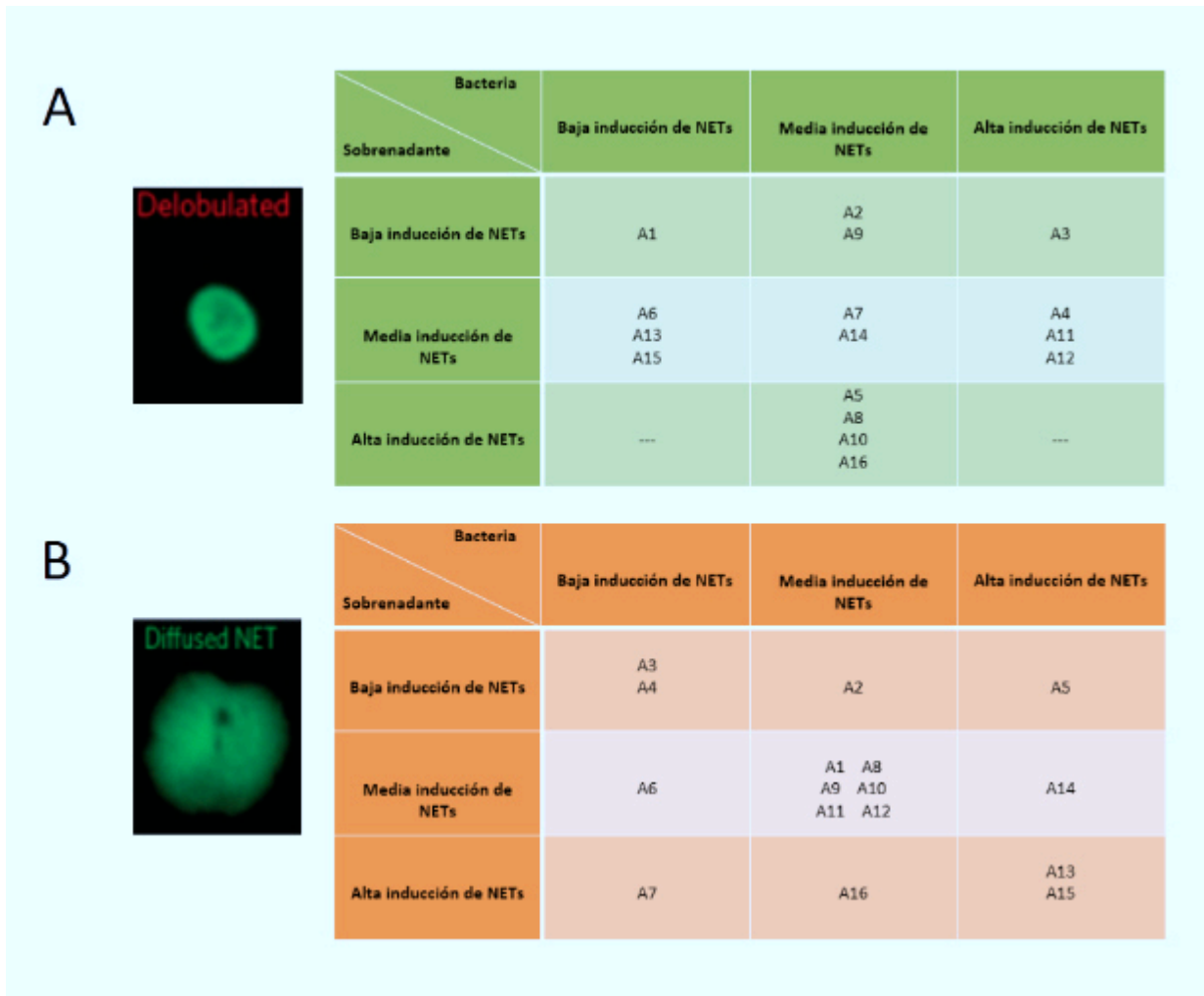


Figura 23. Clasificación de acuerdo al nivel de inducción de NETs por aislados clínicos de *P. aeruginosa* y sus productos secretados. (A) Clasificación de la inducción de NETs con morfología delobulada por *P. aeruginosa*. (B) Clasificación de la inducción de NETs con morfología de NET difuso por *P. aeruginosa*.

6.3.3 Cuantificación por fluorimetría de los NETs inducidos por aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*

Después de que se llevó a cabo la inducción de NETs utilizando los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, se procedió a realizar la lectura correspondiente a la intensidad de fluorescencia, haciendo una incubación breve de las células con el fluoróforo *Sytox*[®] *Green*, que tienen una λ_{Ex} a 504 nm y una λ_{Em} a 523 nm, lo que resultó en una fluorescencia verde brillante. En todos los experimentos realizados para la inducción de NETs se empleó la dilución 0.1 (1×10^4 bacterias/mL) para los aislados clínicos de *P. aeruginosa*. Como control positivo se utilizaron neutrófilos estimulados con PMA 40 nM, y como control negativo neutrófilos sin estimular y neutrófilos estimulados con LB.

En la figura 24A se presenta el resultado obtenido de la intensidad de fluorescencia empleando los aislados clínicos de *P. aeruginosa* A1-A4. En comparación con el control positivo, los aislados A2, A3 y A4 presentaron diferencia significativa, ya que muestran porcentajes de fluorescencia mayores a los del control; mientras que A1 no mostró significancia. Los cuatro aislamientos clínicos mostraron diferencia significativa al compararse con el control negativo, al presentar seis veces más fluorescencia. La figura 25A muestra la gráfica de intensidad de fluorescencia utilizando el sobrenadante de los aislados A1-A4. Los aislamientos A1, A2 y A4 mostraron diferencia significativa en comparación con el control positivo, mientras que A3 no mostró diferencia significativa. Los cuatro aislados clínicos presentaron diferencia significativa en comparación al control negativo.

La figura 24B corresponde al resultado de la intensidad de fluorescencia utilizando los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* A5-A8. Los cuatro aislados presentan diferencia significativa al compararse tanto con el control positivo como con el control negativo. En la figura 25B se presenta la gráfica con el resultado de intensidad de fluorescencia empleando el sobrenadante de los aislamientos A5-A8. Los cuatro aislados mostraron diferencia significativa en comparación tanto con el control positivo como con el control negativo, al presentar mayor intensidad de fluorescencia que el control positivo.

En la figura 24C se presenta el resultado obtenido de la intensidad de fluorescencia empleando los aislados clínicos de *P. aeruginosa* A9-A12. En comparación con el control positivo, los aislados aislamientos presentaron diferencia significativa, ya que mostraron porcentajes de fluorescencia mayores a los del control. Al compararse con el control negativo, los cuatro aislamientos clínicos mostraron diferencia significativa, al presentar cinco veces más fluorescencia. La figura 25C muestra la gráfica de intensidad de fluorescencia utilizando el sobrenadante de los aislados A9-A12. Los aislados A10, A11 y A12 mostraron diferencia significativa en comparación con el control positivo, al presentar mayor intensidad de fluorescencia; mientras que A9 no presentó diferencia significativa al compararse con el control positivo. En comparación con el control negativo, los cuatro aislamientos clínicos mostraron diferencia significativa.

La figura 24D corresponde al resultado de la intensidad de fluorescencia utilizando los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* A13-A16. Los cuatro aislados presentan diferencia significativa al compararse tanto con el control positivo como con el control negativo. En la figura 25D se presenta la gráfica con el resultado de intensidad de fluorescencia empleando el sobrenadante de los aislamientos A13-A16. Los aislados A13, A14 y A15 mostraron diferencia significativa en comparación al control positivo; entretanto, A16 no mostró significancia. Los cuatro aislamientos clínicos presentaron diferencia significativa al compararse con el control negativo.

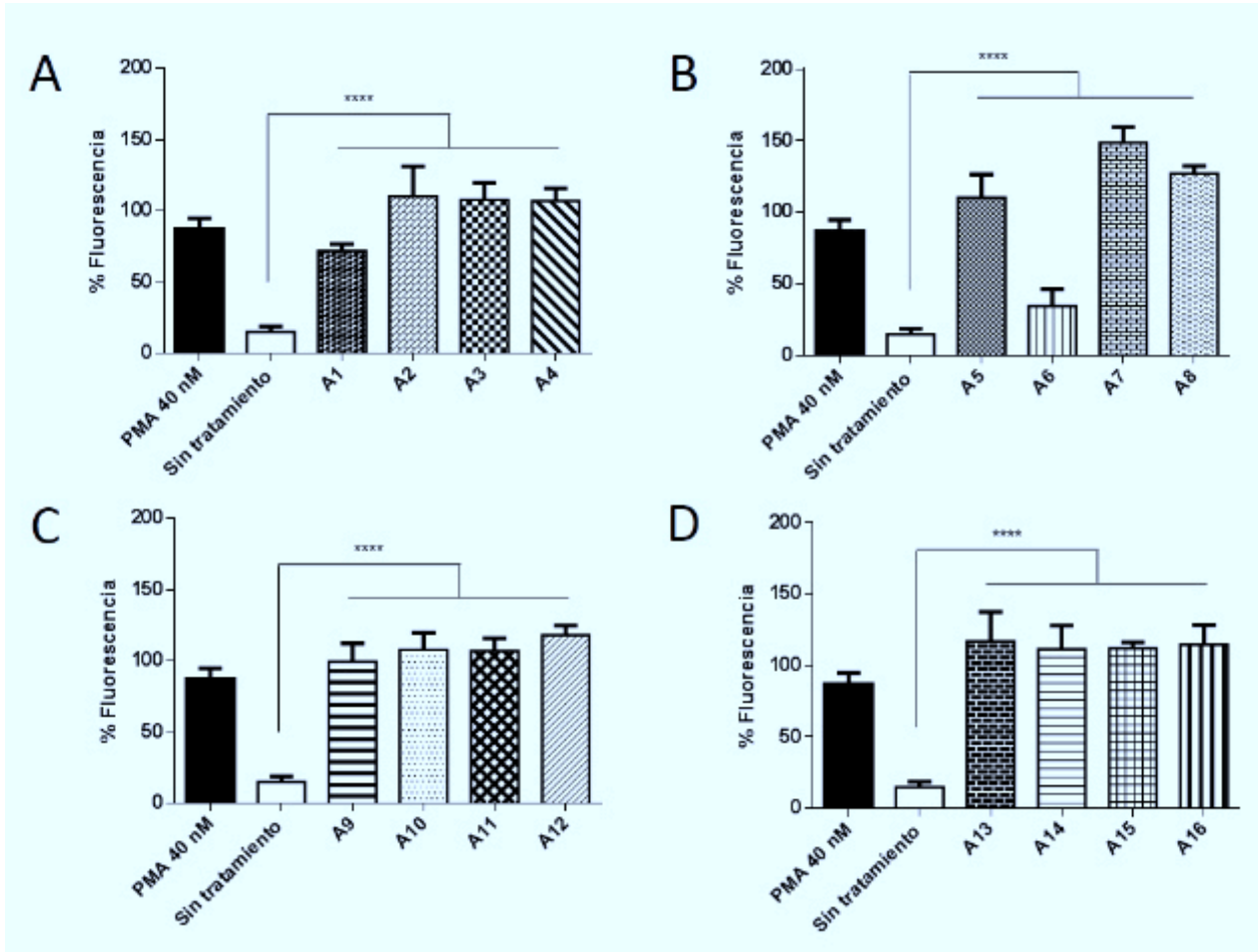


Figura 24. Cuantificación del ADN extracelular utilizando los aislados clínicos de *P. aeruginosa*. (A) Inducción de NETs por aislados clínicos A1, A2, A3 y A4. (B) Inducción de NETs por aislados clínicos A5, A6, A7 y A8. (C) Inducción de NETs por aislados clínicos A9, A10, A11 y A12. (D) Inducción de NETs por aislados clínicos A13, A14, A15 y A16. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes. **** $P < 0.0001$.

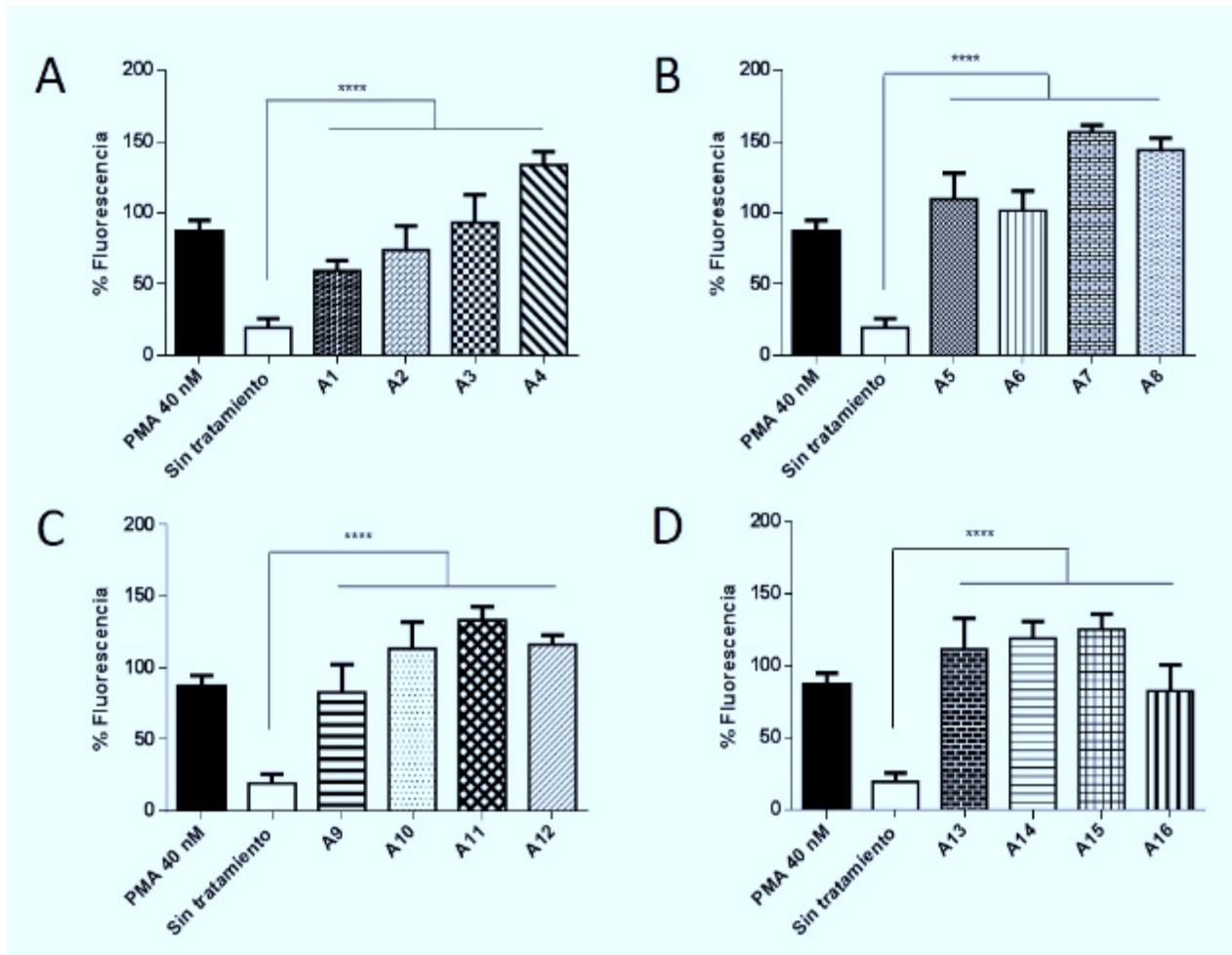


Figura 25. Cuantificación del ADN extracelular empleando el sobrenadante de los aislados clínicos de *P. aeruginosa*. (A) Inducción de NETs por aislados clínicos A1, A2, A3 y A4. (B) Inducción de NETs por aislados clínicos A5, A6, A7 y A8. (C) Inducción de NETs por aislados clínicos A9, A10, A11 y A12. (D) Inducción de NETs por aislados clínicos A13, A14, A15 y A16. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes. **** $P < 0.0001$.

6.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) del sobrenadante de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*

Con base en los resultados obtenidos en la cuantificación de la expansión nuclear del neutrófilo en NETosis, se decidió emplear la técnica de SDS-PAGE utilizando únicamente el sobrenadante de los aislados clínicos de *P. aeruginosa*, A5, A6, A9 y A10 los cuales mostraron una alta inducción de NETs tanto por la bacteria como por sus productos secretados (Figura 26). A partir de los pesos moleculares de las bandas observadas en el gel, se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos del genoma de *P. aeruginosa* (www.pseudomonas.com), con el fin de encontrar moléculas que presentaran pesos moleculares similares. Algunas moléculas que concuerdan con el criterio de búsqueda para la banda de ≈ 55 kDa son: spuC (50.5 kDa), mucD (50.3 kDa), fleR (51.2 kDa) y ExoU o PepA (52.3 kDa). Mientras que para la banda de ≈ 35 kDa se encontraron las siguientes moléculas: pscQ (34 kDa), popN (31.3 kDa), pcrV (32.3 kDa) y pvdF (31 kDa).

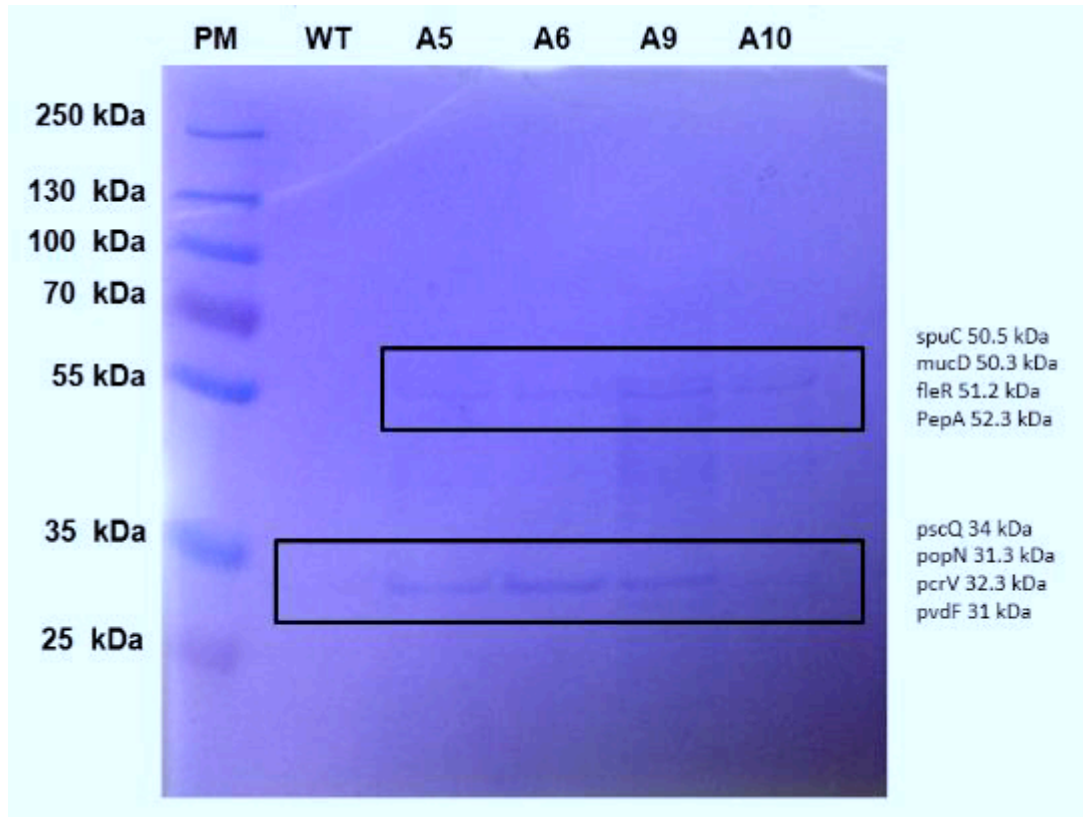


Figura 26. SDS-PAGE del sobrenadante de aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular (PM), el segundo carril al sobrenadante de la cepa silvestre o PA01 (WT), y los carriles 3 al 6 corresponden al sobrenadante de los aislamientos clínicos A5, A6, A9 y A10 respectivamente. En cuadros negros se señalan las bandas visualizadas en el gel y que corresponden a los pesos moleculares ≈ 55 kDa y ≈ 35 kDa.

6.5 Inducción de NETs por las cepas mutantes de *P. aeruginosa*

Para la inducción de NETs, se incluyeron cepas mutantes por inserción de transposón de *P. aeruginosa*, las cuales se presentan en la Apéndice B, y además cuentan con diferentes características como actividad de fosfolipasa, exoenzimas y también proteínas de secreción. Estas cepas mutantes de *P. aeruginosa* fueron activadas en medio líquido LB, y ajustadas a la dilución de 0.1 (1×10^4 bacterias/mL), bajo las mismas condiciones que las establecidas en la sección de Material y métodos. Para todos los experimentos, se utilizaron neutrófilos estimulados con PMA 40 nM como control positivo; y neutrófilos sin estimular y neutrófilos estimulados con LB como controles negativos.

6.5.1 Cuantificación por expansión nuclear del neutrófilo de los NETs inducidos por las cepas mutantes de *P. aeruginosa*

En la figura 27 se muestra la inducción de NETs promovida por la dilución 0.1 (1×10^4 bacterias/mL) de las mutantes de exoenzimas de *P. aeruginosa*. La figura 27C muestra las imágenes correspondientes a la escasa inducción de NETs provocada por las diferentes cepas mutantes de exoenzimas de *P. aeruginosa*, y los pocos neutrófilos en NETosis se pueden observar en una etapa delobulada. El resultado de la inducción de NETs originada por el 3% de sobrenadante de las mutantes de exoenzimas de *P. aeruginosa* se presenta en la figura 28. La figura 28C muestra las imágenes que corresponden a la poca inducción de NETs promovida por el

sobrenadante de todas las cepas mutantes de exoenzimas de *P. aeruginosa*, también se observan pocos neutrófilos en NETosis y que a la vez que se encuentran en una etapa delobulada. Además, la figura 29 comprenden los resultados obtenidos de la expansión nuclear, donde se aprecia que todas las células se encuentran en un área $<100 \mu\text{m}^2$, por lo que ambos resultados se consideran negativos para la inducción de NETs.

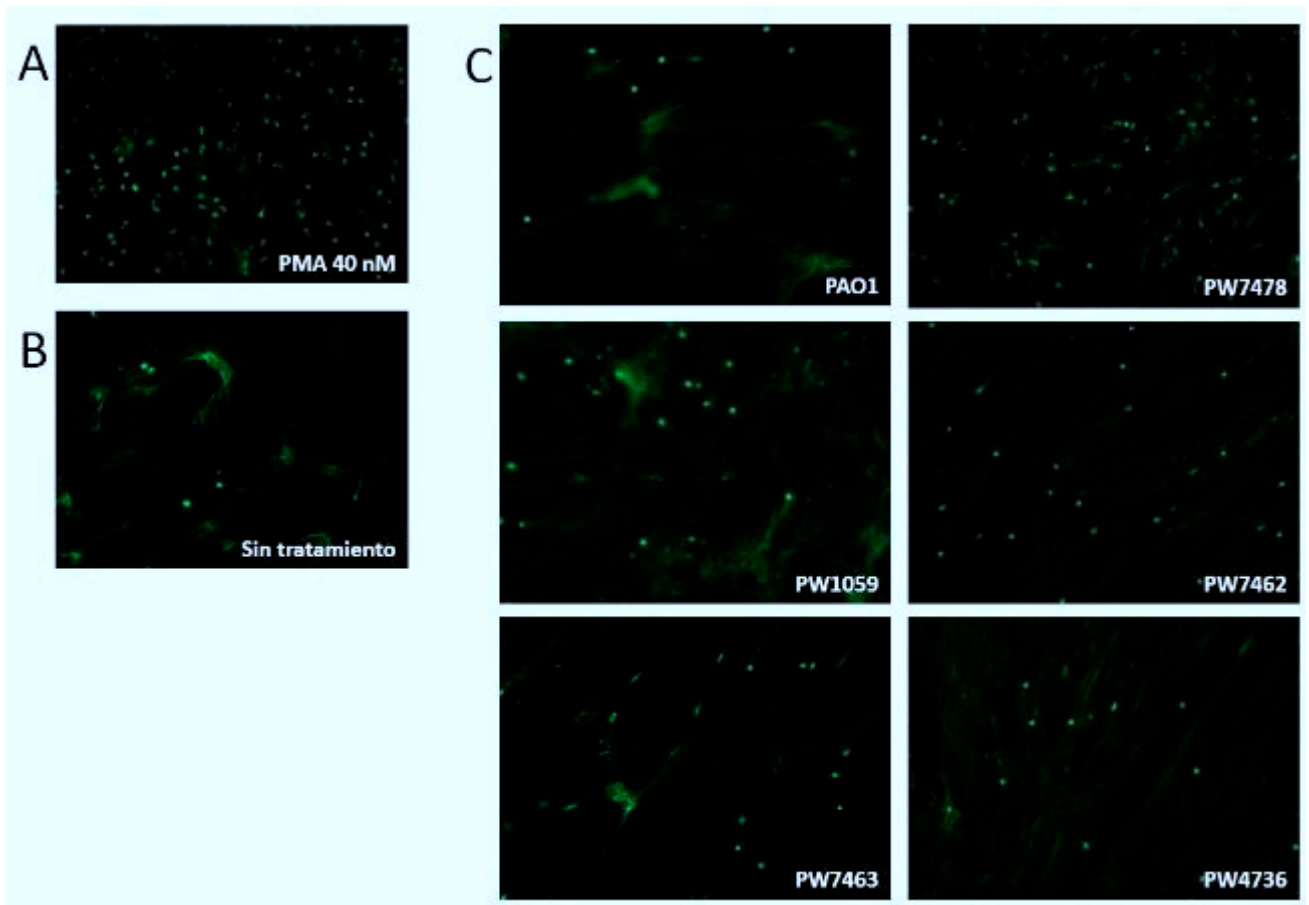


Figura 27. Inducción de NETs por las cepas mutantes de exoenzimas de *P. aeruginosa*. (A) Neutrófilos estimulados con PMA 40 nM como control positivo. (B) Neutrófilos estimulados con medio RPMI como control negativo. (C) Inducción de NETs empleando la dilución 0.1 (1×10^4 bacterias/mL) de las cepas mutantes de exoenzimas. Imágenes de fluorescencia observadas con el objetivo 20x.

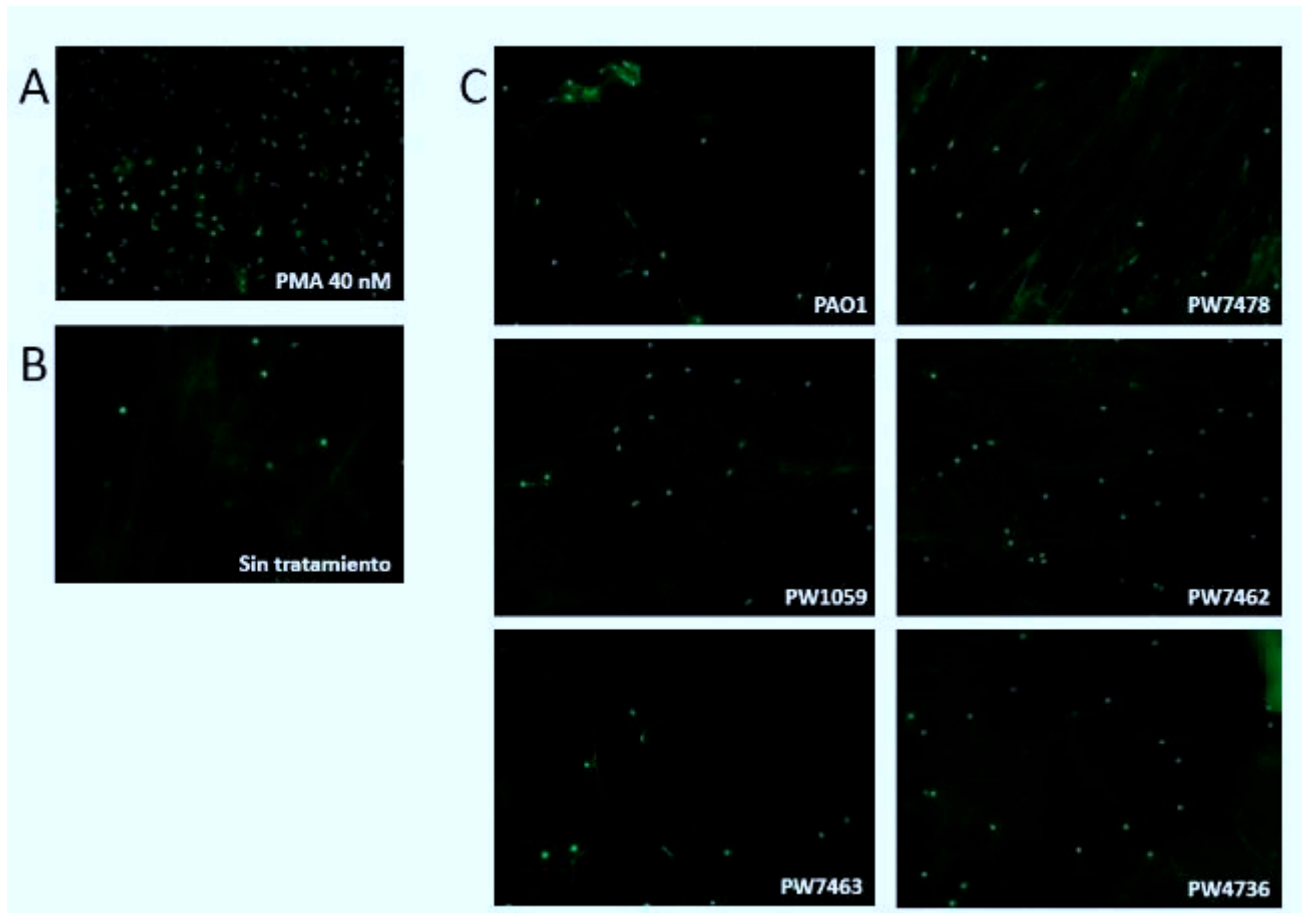


Figura 28. Inducción de NETs por el sobrenadante de las cepas mutantes de exoenzimas de *P. aeruginosa*. (A) Neutrófilos estimulados con PMA 40 nM como control positivo. (B) Neutrófilos estimulados con medio de cultivo líquido LB como control negativo. (C) Inducción de NETs empleando utilizando 3% del sobrenadante de las cepas mutantes de exoenzimas. Imágenes de fluorescencia observadas con el objetivo 20x.

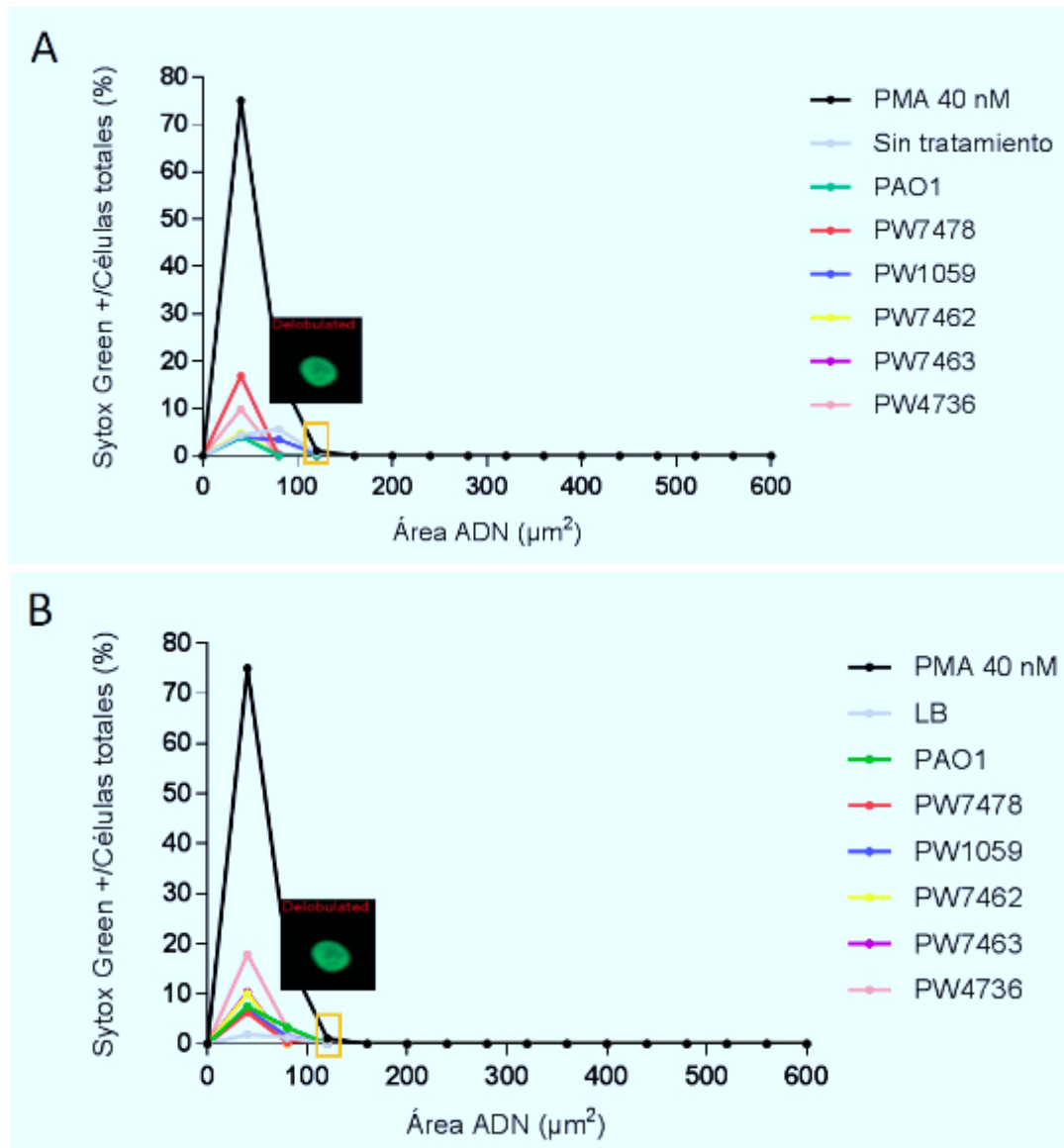


Figura 29. Cuantificación de la expansión nuclear por las cepas mutantes de exoenzimas de *P. aeruginosa*. (A) Gráfica de la expansión nuclear del neutrófilo después de la inducción de NETs utilizando la dilución 0.1 (1×10^4 bacterias/mL) de las cepas mutantes de exoenzimas. (B) Gráfica de la expansión nuclear del neutrófilo después de la inducción de NETs empleando el 3% del sobrenadante de las cepas mutantes de exoenzimas.

Igualmente se llevó a cabo la inducción de NETs empleando las cepas mutantes de pigmentos (pioverdina y piocianina) de *P. aeruginosa*, usando los controles previamente mencionados, tanto para la bacteria como para el sobrenadante. La figura 30 muestra la formación de NETs promovida por la dilución 0.1 (1×10^4 bacterias/mL) de las mutantes de pigmentos de *P. aeruginosa*, mientras que las figuras 30A y 30B muestran las imágenes del control positivo y control negativo respectivamente. En la figura 30C se encuentra el resultado obtenido de la inducción de NETs utilizando las cepas mutantes de pigmentos a una dilución bacteriana de 0.1 (1×10^4 bacterias/mL), donde se puede observar una escasa formación de NETs, así como a los neutrófilos en una etapa delobulada. El resultado de la inducción de NETs originada por el 3% de sobrenadante de las mutantes de pigmentos de *P. aeruginosa* se presenta en la figura 31. El control positivo y el control negativo se representan en la figura 31A y 31B respectivamente, en tanto que la figura 31C muestra las imágenes correspondientes a la poca inducción de NETs promovida por el sobrenadante de las cepas mutantes de pigmentos de *P. aeruginosa*; también se observan poca cantidad de neutrófilos netóticos y en una etapa delobulada. Asimismo, la figura 30D y 31D comprenden los resultados obtenidos de la expansión nuclear, donde se distingue que todas las células presentan un área $< 100 \mu\text{m}^2$, por lo que ambos resultados se consideran negativos para la inducción de NETs.

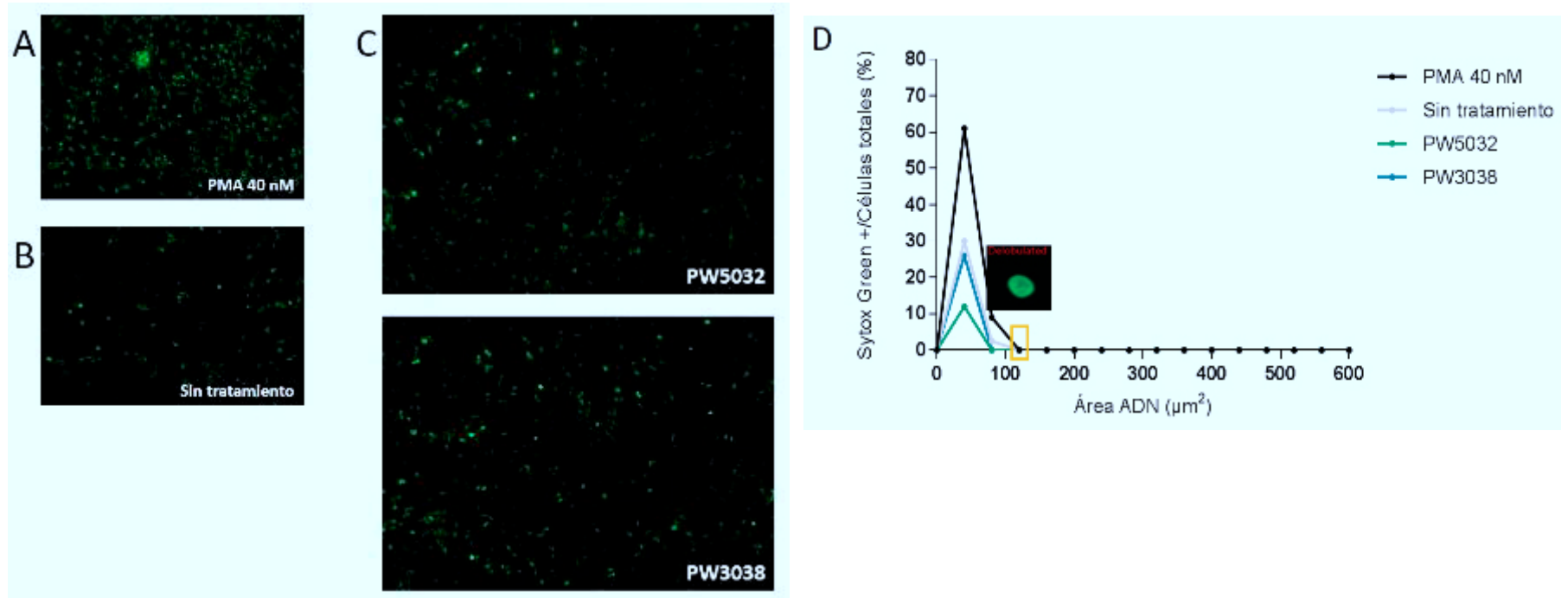


Figura 30. Inducción de NETs por las cepas mutantes de pigmento de *P. aeruginosa*. (A) Neutrófilos estimulados con PMA 40 nM como control positivo. (B) Neutrófilos estimulados con el medio RPMI como control negativo. (C) Inducción de NETs por la dilución 0.1 (1×10^4 bacterias/mL) las cepas mutantes para pioverdina (imagen superior) y piocianina (imagen inferior). Imágenes de fluorescencia observadas con el objetivo 20x. (D) Grafica de la cuantificación de la expansión nuclear del neutrófilo.

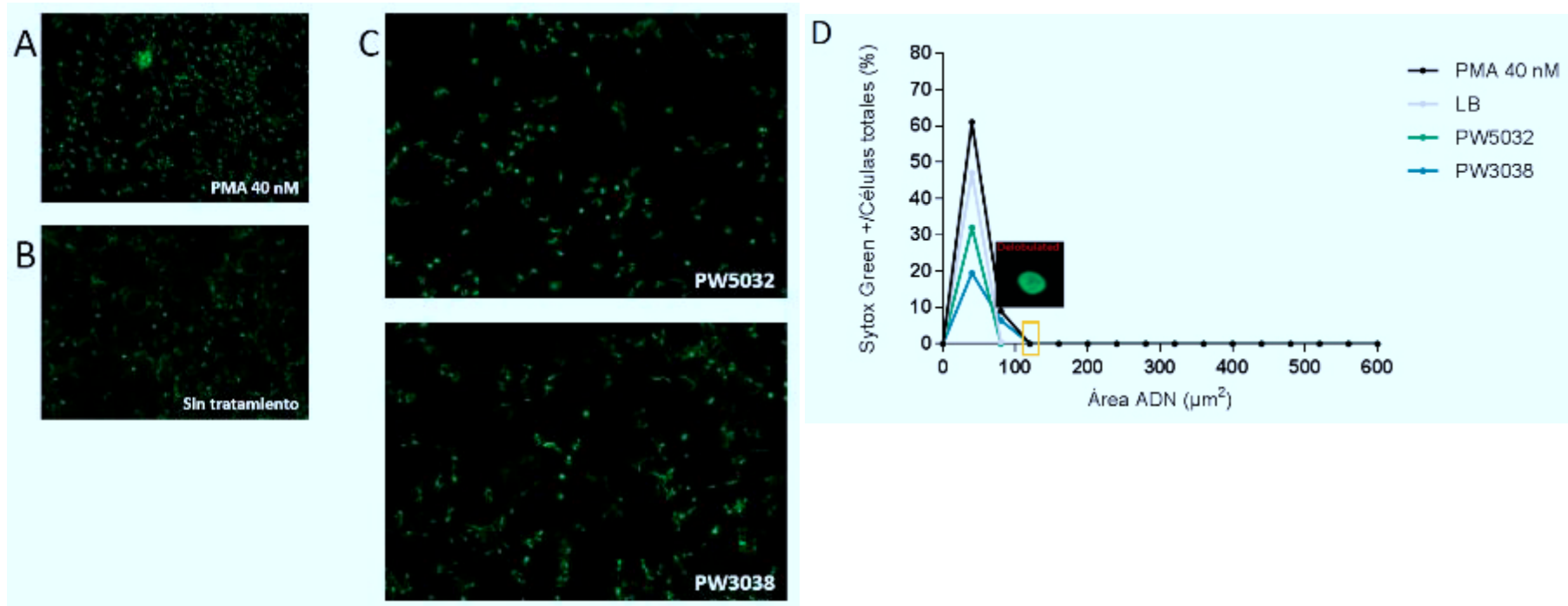


Figura 31. Inducción de NETs por el sobrenadante de las cepas mutantes de pigmento de *P. aeruginosa*. (A) Neutrófilos estimulados con PMA 40 nM como control positivo. (B) Neutrófilos estimulados con el medio de cultivo líquido LB como control negativo. (C) Inducción de NETs por el 3% del sobrenadante de la cepa mutante para pioverdina (imagen superior) y la cepa mutante de piocianina (imagen inferior). Imágenes de fluorescencia observadas con el objetivo 20x. (D) Grafica de la cuantificación de la expansión nuclear del neutrófilo.

6.5.2 Cuantificación por fluorometría de los NETs inducidos por las cepas mutantes de *P. aeruginosa*

Una vez realizada la inducción de NETs utilizando las cepas mutantes por inserción de transposón de *P. aeruginosa*, se procedió a realizar la lectura correspondiente a la intensidad de fluorescencia, haciendo una incubación breve de las células con el fluoróforo *Sytox*[®] *Green*. El resultado obtenido de la inducción de NETs por las mutantes para exoenzimas se presenta en la figura 32; el inciso A corresponde a la gráfica de inducción de NETs empleando la dilución 0.1 (1×10^4 bacterias/mL), notándose una disminución hasta del 80% de la intensidad de fluorescencia en todas las mutantes de exoenzimas en comparación con el control positivo; mientras que al compararse con el control negativo no se observan diferencias significativas. La grafica del inciso B representa el 3% de sobrenadante de cada una de las cepas mutantes para exoenzimas, se puede apreciar que el sobrenadante muestra una menor intensidad de fluorescencia en comparación con el control positivo, mientras que no hay diferencia significativa al compararse con las células tratadas con LB.

También se llevó a cabo la inducción de NETs empleando las cepas mutantes de pigmentos de *P. aeruginosa*, usando los controles mencionados anteriormente. El resultado obtenido se muestra en la figura 33; donde la gráfica del inciso A pertenece a la inducción de NETs empleando la dilución 0.1 (1×10^4 bacterias/mL), apreciándose una disminución en la intensidad de fluorescencia en las mutantes de los pigmentos (pioverdina y piocianina) en comparación con el control positivo,

mientras que no existe diferencia significativa al compararse con el control negativo. El inciso B representa la gráfica que corresponde al 3% de sobrenadante de ambas cepas mutantes para pigmentos, observándose que el sobrenadante muestra una menor intensidad de fluorescencia en comparación con el control positivo, mientras que no hay diferencia significativa al compararse con las células tratadas con LB.

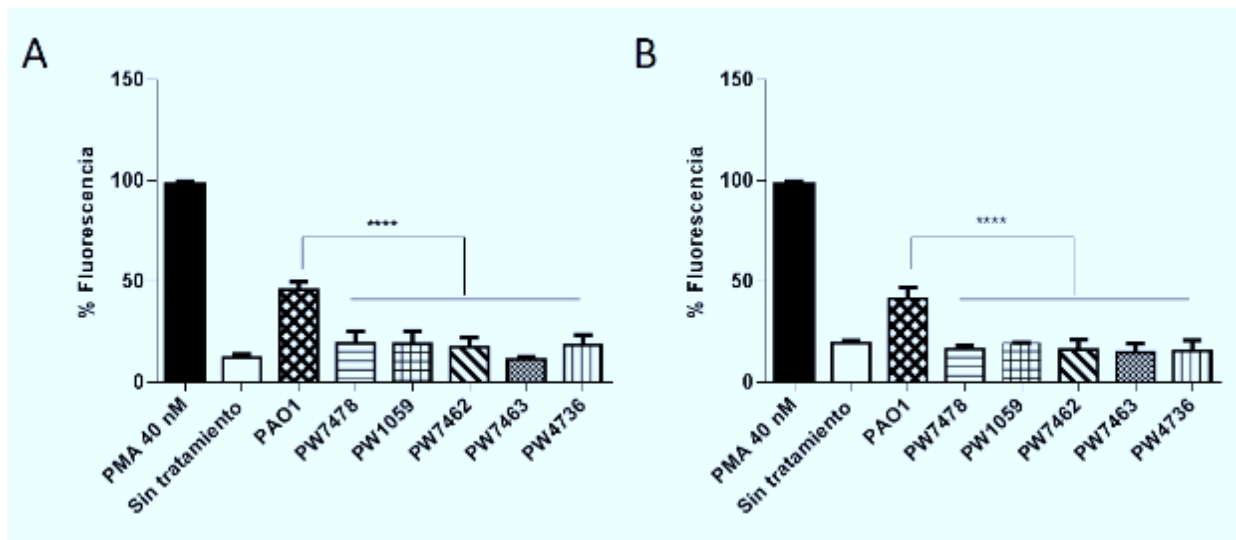


Figura 32. Cuantificación del ADN extracelular empleando las cepas mutantes de exoenzimas de *P. aeruginosa*. (A) Inducción de NETs por las cepas mutantes de exoenzimas. (B) Inducción de NETs por el sobrenadante de las cepas mutantes de exoenzimas. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes. **** $P < 0.0001$.

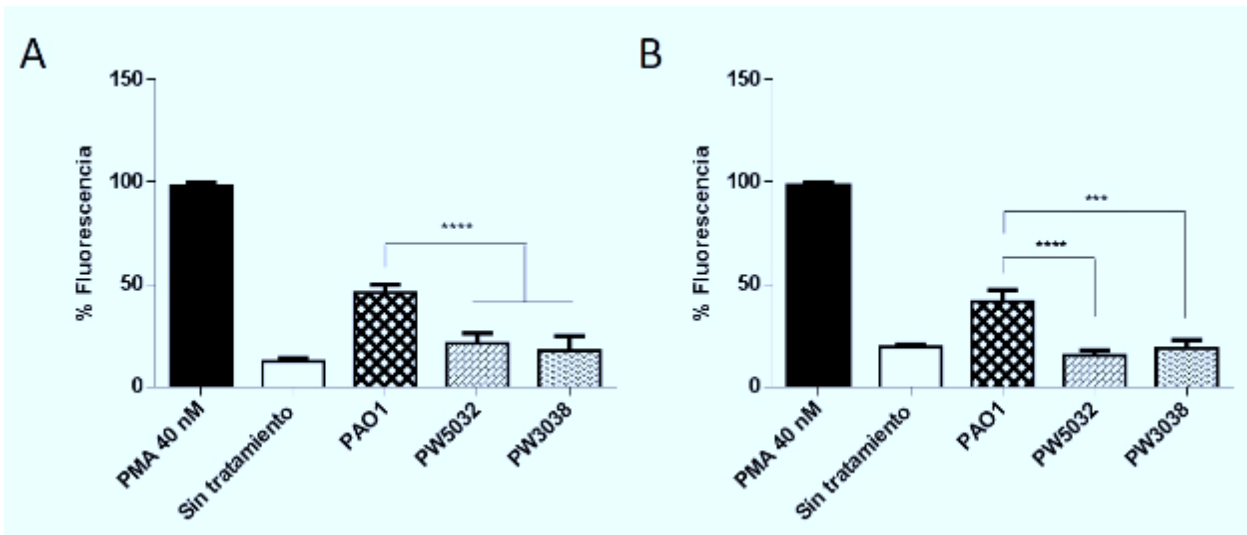


Figura 33. Cuantificación del ADN extracelular empleando las cepas mutantes de pigmentos de *P. aeruginosa*. (A) Inducción de NETs por las cepas mutantes de pigmentos. (B) Inducción de NETs por el sobrenadante de las cepas mutantes de pigmentos. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes. **** $P < 0.0001$.

6.6 Inducción de NETs por *Escherichia coli*

Como control negativo de la inducción de NETs, se incluyó a la bacteria *E. coli*, la cual fue aislada a partir de heces humanas. La cepa de *E. coli* fue activada en medio líquido LB, y ajustada a las diluciones de 100 (1×10^7 bacterias/mL), 10 (1×10^6 bacterias/mL), 1 (1×10^5 bacterias/mL) y 0.1 (1×10^4 bacterias/mL) bajo las mismas condiciones que las establecidas en la sección de Material y métodos para las cepas de *P. aeruginosa*. En todos los experimentos, como control positivo se utilizaron neutrófilos estimulados con PMA 40 nM y como control negativo, neutrófilos sin estimular y neutrófilos estimulados con LB.

6.6.1 Cuantificación por expansión nuclear del neutrófilo de los NETs inducidos por *E. coli*

En la figura 34 se muestra la inducción de NETs promovida por diferentes diluciones de la bacteria *E. coli* con un crecimiento previo de 24 hrs. La figura 34C muestra las imágenes correspondientes a la poca inducción de NETs promovida por las diferentes diluciones de *E. coli* y también se observan los neutrófilos en una etapa delobulada. Adicionalmente, en la figura 34D se incluye la gráfica correspondiente a la expansión nuclear, donde se observa que todas las células se encuentran en un área $<100 \mu\text{m}^2$, por lo que se considera un resultado negativo para la inducción de NETs.

Igualmente, se utilizaron neutrófilos estimulados con PMA 40 nM como control positivo, y como control negativo se incubaron neutrófilos con el medio de cultivo líquido de crecimiento para las bacterias (LB 30%), así como neutrófilos incubados con el 30% y 3% del sobrenadante filtrado de *E. coli*. Para ambos resultados se puede apreciar la escasa inducción de NETs en comparación con el control positivo, como se puede observar en la figura 35. Además, la figura 35D representa la gráfica correspondiente a la expansión nuclear, donde se distingue que todas las células se encuentran en un área $<100 \mu\text{m}^2$, por lo que también se considera un resultado negativo para la inducción de NETs.

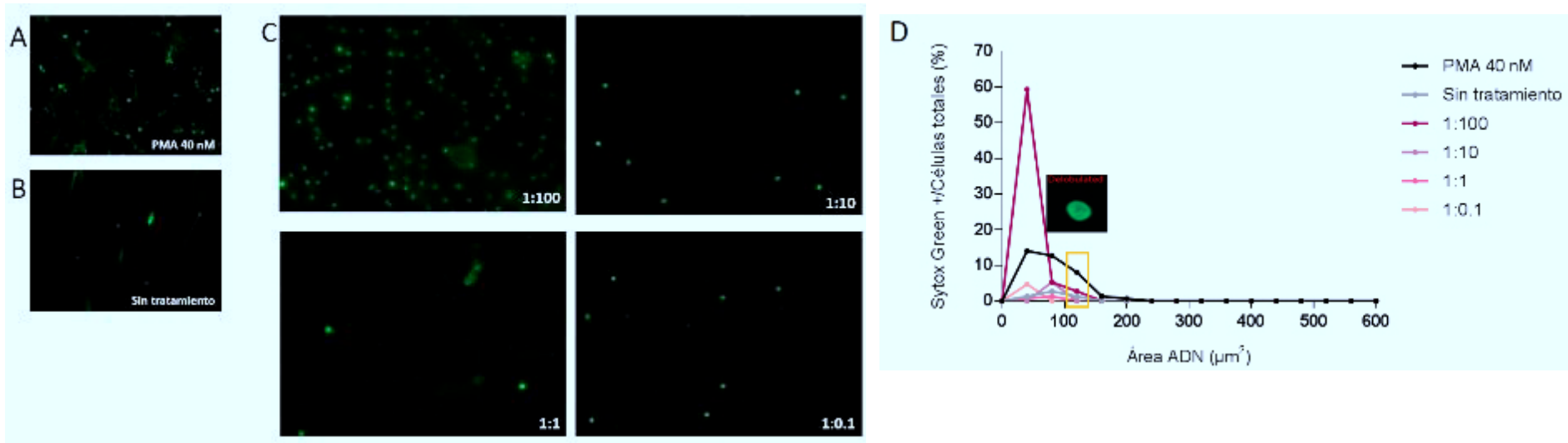


Figura 34. Inducción de NETs por la bacteria *E. coli*. (A) Neutrófilos estimulados con PMA 40 nM como control positivo. (B) Neutrófilos estimulados con el medio RPMI como control negativo. (C) Inducción de NETs por las diluciones 100 (1×10^7 bacterias/mL), 10 (1×10^6 bacterias/mL), 1 (1×10^5 bacterias/mL) y 0.1 (1×10^4 bacterias/mL) de *E. coli*. Imágenes de fluorescencia observadas con el objetivo 20x. (D) Grafica de la cuantificación de la expansión nuclear del neutrófilo.

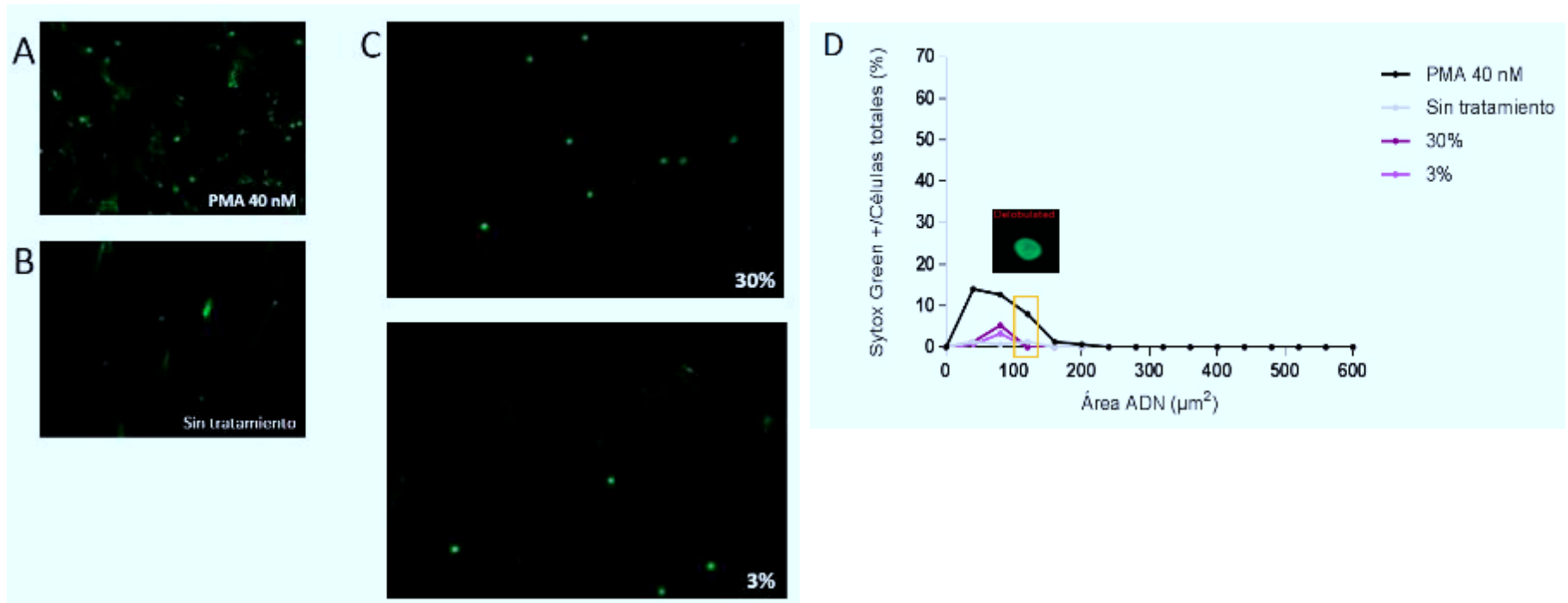


Figura 35. Inducción de NETs por el sobrenadante de la bacteria *E. coli*. (A) Neutrófilos estimulados con PMA 40 nM como control positivo. (B) Neutrófilos estimulados con el medio líquido LB como control negativo. (C) Inducción de NETs por el 30% (imagen superior) y el 3% del sobrenadante (imagen inferior) de *E. coli*. Imágenes de fluorescencia observadas con el objetivo 20x. (D) Grafica de la cuantificación de la expansión nuclear del neutrófilo.

6.6.2 Cuantificación por fluorometría de los NETs inducidos por *E. coli*

Después de que se llevó a cabo la inducción de NETs utilizando la cepa de *E. coli*, se procedió a realizar la lectura correspondiente de la intensidad de fluorescencia, haciendo una incubación breve de las células con el fluoróforo *Sytox*[®] *Green*, que tienen una λ_{Ex} a 504 nm y una λ_{Em} a 523 nm, lo que resultó en una fluorescencia verde brillante. El resultado obtenido se presenta en la figura 36, donde el inciso A ejemplifica las diferentes diluciones de *E. coli* utilizadas para la inducción de los NETs, observándose una disminución de la fluorescencia de manera decreciente, además las MOIs de 1:100 y 1:10 presentan un porcentaje de fluorescencia mayor que las células sin tratamiento, mientras que las MOIs de 1:1 y 1:01 no presentan una diferencia significativa en comparación con el control negativo.

El inciso B representa el porcentaje de sobrenadante de *E. coli* empleado para inducir los NETs, donde se aprecia que el 30% de sobrenadante muestra mayor fluorescencia que el control negativo, por otro lado, el 3% del sobrenadante no presenta una diferencia significativa en comparación con las células tratadas con LB. Los resultados obtenidos para los tratamientos en ambos incisos (A, B) muestran una diferencia significativa en comparación con el control positivo, indicando que la bacteria *E. coli*, así como su sobrenadante no inducen la formación de los NETs.

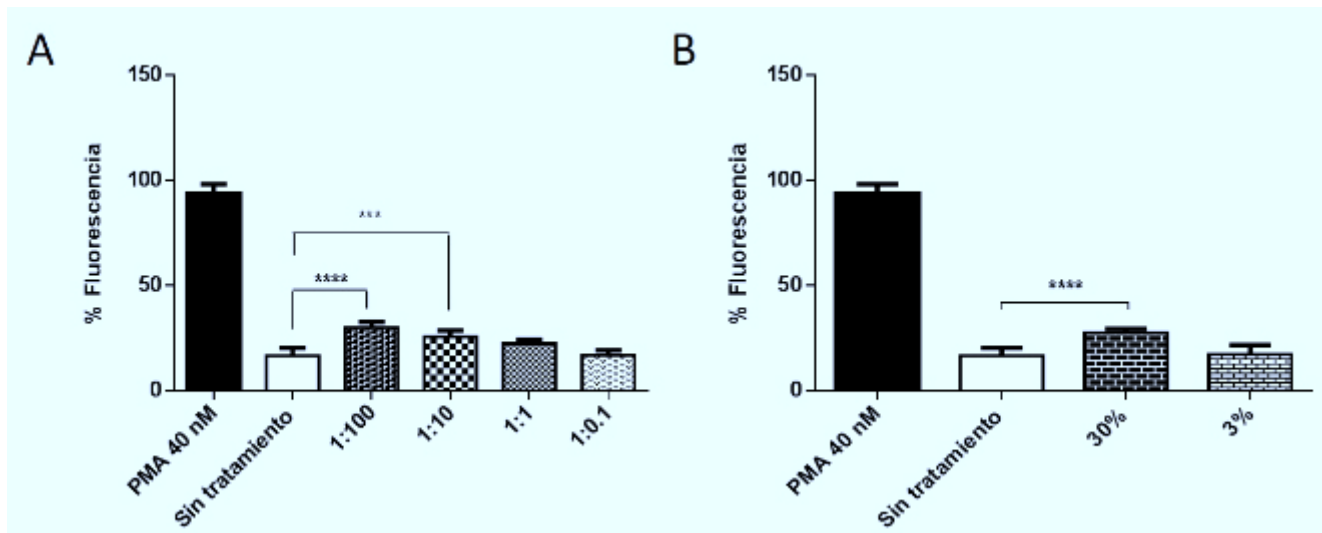


Figura 36. Cuantificación del ADN extracelular empleando la cepa de *E. coli*. (A) Inducción de NETs por las diluciones 100 (1×10^7 bacterias/mL), 10 (1×10^6 bacterias/mL), 1 (1×10^5 bacterias/mL) y 0.1 (1×10^4 bacterias/mL) de *E. coli*. (B) Inducción de NETs por el 3 y 30% del sobrenadante de la cepa de *E. coli*. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes. **** $P < 0.0001$.

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN

La inducción de los NETs por *P. aeruginosa* ha sido previamente reportada por algunos grupos de investigación; sin embargo, su participación en la FQ está poco estudiada. Floyd *et al.* reportaron la utilización de un ensayo de ELISA modificado para cuantificar la liberación de NETs mediante la detección de los complejos MPO-ADN y HNE-ADN. Los neutrófilos apoptóticos no liberan los complejos proteínas-ADN, solo las células que se someten a formación de NETs lo hacen; por lo que los niveles de ambos complejos determinan el grado de formación de NETs. Lo anterior fue medido a OD 450 nm, y el valor obtenido fue proporcional a la cantidad de ADN liberado en la muestra [60]. En contraste con lo anterior, para este trabajo se optó por teñir las células con el fluoróforo *Sytox[®] Green* y observar al microscopio de fluorescencia la formación de los NETs, así como cuantificar la intensidad de fluorescencia utilizando un fluorómetro. El fluoróforo *Sytox[®] Green* tiene como característica ser impermeable a las células vivas, por lo tanto, la fluorescencia emitida se relacionó directamente con el ADN extracelular. Los análisis que llevamos a cabo son complementarios; el análisis de expansión nuclear del neutrófilo en NETosis permitió no solo observar las variadas morfologías que presentaron los NETs en todos nuestros ensayos, sino que también relaciono los niveles de inducción

de NETs de acuerdo a la morfología que estos presentaban; aparte, la técnica de fluorimetría es más sensible y permitió detectar toda la intensidad de fluorescencia que por el método de expansión nuclear no se puede determinar.

Los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* utilizados en el mismo trabajo experimental se obtuvieron de pacientes con FQ que tenían específicamente la mutación F508del; además fueron clasificados en etapa temprana o tardía, relativo al curso de la infección de cada paciente [60]; mientras que en nuestro trabajo no se determinó el tipo de mutación que presentaban los pacientes de los que se obtuvieron los aislados clínicos, y se desconoció en qué etapa de la enfermedad se encontraban.

Todos los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* analizados por Floyd *et al.* fueron capaces de desencadenar la liberación de NETs a diferentes grados y empleando la MOI 1:10 (PMN:PA), pero sin una inducción tan robusta como la que generó el PMA 100 nM [60]; contrario a los resultados de este trabajo, donde la mayoría de los aislados clínicos promovieron una inducción de NETs igual o incluso mayor a la del PMA 40 nM, y empleando tanto la bacteria como sus productos secretados. Es importante destacar que utilizamos la MOI 1:0.1 (PMN:PA), observando que una menor cantidad de bacterias promovió una mayor inducción de NETs, aunque esta MOI, la cual equivale a 10 neutrófilos por cada bacteria, a pesar de que el neutrófilo puede utilizar otros mecanismos como fagocitosis o degranulación para eliminar a la bacteria.

Floyd *et al.* utilizaron cepas silvestres de *P. aeruginosa* para inducir la formación de NETs, observando que la cepa PA14 fue más eficiente que PAO1, la cual presentó la mitad de inducción reportada para el PMA 100 nM [60]. En otro experimento, Young *et al.* utilizaron células en suspensión para evaluar la capacidad de los neutrófilos no adherentes para formar NETs espontáneamente. En estas condiciones, detectaron poca liberación de NETs por los neutrófilos no tratados durante 2 horas, mientras que la cepa PAO1 estimuló eficazmente la formación de NETs en una manera dependiente de la densidad bacteriana; sin embargo, estos resultados fueron menores al obtenido por los neutrófilos tratados con PMA 25 nM [61]. Ambos datos concuerdan con nuestro resultado, debido a que observamos que la cepa PAO1 promovió menos NETosis que el PMA 40 nM en un lapso de 3 horas, en neutrófilos adherentes y en una manera dependiente de las diluciones bacterianas, lo cual pudiera estar relacionado con una disminución en la virulencia de esta cepa de referencia.

Rada *et al.* se dirigieron a caracterizar que la piocianina induce la formación de NETs en neutrófilos adherentes; para lo cual examinaron *in vitro* la producción de piocianina a partir de 40 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* de pacientes con FQ, esto en etapas tempranas y avanzadas de la enfermedad, así como enfermedad leve o grave. Midieron concentraciones de piocianina y se compararon con la cepa control PA14. La mayoría de los aislados clínicos produjo el pigmento, a excepción de 6 aislados que no lo produjeron. Como resultado, observaron que la piocianina en periodos de tiempo cortos y concentraciones bajas induce la formación de los NETs [49]. En nuestro trabajo no cuantificamos la cantidad de piocianina en cada

aislamiento clínico utilizado; no obstante, observamos que la producción de pigmentos (no solo piocianina) fue variable en todos los aislados clínicos, mientras que, en la cepa de referencia, PAO1, nunca hubo presencia de pigmentos. De manera interesante y contrario a lo reportado en el trabajo anterior, los aislados clínicos que no produjeron pigmentos presentaron una inducción de NETs igual o mayor a la del PMA 40 nM. También utilizamos cepas mutantes de los pigmentos de *P. aeruginosa* para inducir la formación de los NETS. Las cepas seleccionadas fueron deficientes en pioverdina (pvdF) y piocianina (pys2); y como resultados, observamos que ninguna de las dos cepas previamente mencionadas indujo la formación de los NETs en comparación con el PMA 40 nM, por lo que los pigmentos no son las principales moléculas en *P. aeruginosa* que desencadenan la formación de los NETs.

Se ha reportado por Feltman *et al.*, que el sistema de secreción tipo III (SSTT) se encuentra conservado en muchos patógenos gram-negativos y codifica alrededor de 20 proteínas que ensamblan un complejo para secretar y traslocar efectores directamente en las células del huésped [62]. También se ha demostrado que el regulon de la exoenzima S es un conjunto de genes de virulencia regulados de manera coordinada en *P. aeruginosa*. Entre las proteínas efectoras codificadas por el regulon y que son secretadas a través del SSTT se incluyen las exoenzimas ExoS, ExoT, ExoY y ExoU [63].

ExoS y ExoT poseen un dominio de proteína activadora de GTPasa amino terminal (GAP) y un dominio de ADP ribosiltransferasa carboxilo terminal (ADPRT) [64]. Interesantemente, ExoS y ExoT tienen 75% de identidad de aminoácidos (60). La secreción de ExoS se asoció con una LD₅₀ relativamente baja, persistencia bactericida en los pulmones y diseminación. En contraste, la secreción de ExoT no se asoció con un cambio significativo en la mortalidad o carga bacteriana en los pulmones, pero condujo a un modesto aumento en la diseminación bacteriana [51].

ExoY posee actividad de adenilato ciclasa; una segunda característica es la estimulación de la adenilato ciclasa por un factor eucariótico que es distinto a la calmodulina, lo que puede representar una estrategia de regulación para evitar la generación de AMP cíclico dentro de la bacteria antes de la intoxicación de las células huésped [63].

ExoU o PepA es una potente citotoxina con actividad de fosfolipasa A₂. Las fosfolipasas son producidas por un grupo diverso de patógenos bacterianos, desempeñando un papel importante como determinantes de virulencia. Las fosfolipasas bacterianas tienen el potencial para interferir con la cascada de señalización de las células del huésped, y para modular su respuesta inmune. Las fosfolipasas mejor caracterizadas, que desempeñan un papel en la virulencia son las fosfolipasas C (PLCs), pero la fosfolipasa A (PLAs) puede ser tan citolítica como PLCs. La hidrólisis de fosfolípidos por las PLAs resulta en la liberación de ácidos grasos de la posición 1 o 2 del glicerol. Como el ácido araquidónico es el ácido graso más comúnmente encontrado en la posición 2 de fosfolípidos de mamíferos, la PLA₂

bacteriana tiene un gran potencial para la estimulación de la cascada del ácido araquidónico [65].

Para elucidar las características inflamatorias de ExoU, Shaver *et al.* compararon la cepa parental PA103 y la cepa defectiva PA103 Δ exoU administradas en bajas dosis (10^4 UFC) por instilación de vías respiratorias en ratones. En este modelo se examinó la acumulación de células inflamatoria y la liberación local de prostaglandinas. El lavado broncoalveolar (BAL) de ratones inoculados con la cepa productora de ExoU contenía significativamente más células que en el BAL de ratones infectados con PA103 Δ exoU, así como una mayor concentración de prostaglandinas [51].

Este factor de virulencia de *P. aeruginosa* es requerido para el daño de células epiteliales *in vitro* y para la virulencia en modelos animales de neumonía aguda; ya que se ha reportado que ExoU tiene un mayor impacto sobre la gravedad de la enfermedad, ExoS tiene un efecto intermedio, y ExoT tiene solo un pequeño efecto sobre la virulencia. Aquellas cepas que no presentan el SSTT y que por lo tanto no secretan ExoU, ExoS y ExoT pueden ser menos virulentas [51].

En el presente trabajo utilizamos cepas mutantes de *P. aeruginosa* para inducir la formación de los NETS. Las cepas seleccionadas fueron deficientes en las exoenzimas ExoS, ExoT, ExoY y ExoU; y como resultados, observamos que ninguna de las cepas antes mencionadas indujo la formación de los NETs en comparación con el PMA 40 nM y presentaron diferencia significativa al compararse con la cepa silvestre, por lo que estas moléculas de *P. aeruginosa* tienen una participación

importante en la inducción de NETs que desencadena esta bacteria en los pacientes con FQ.

Como control negativo en nuestros experimentos, empleamos una cepa de *E. coli*. A la fecha, la formación de NETs desencadenada por esta bacteria esta pobremente documentada. Existen estudios que reportan que *E. coli* induce la formación de los NETs en aislados clínicos de bovinos. La mastitis es una respuesta inflamatoria del tejido mamario contra bacterias invasoras, siendo *E. coli* la principal causa que conduce a la mastitis aguda en las vacas. Lippolis *et al.* reportaron que una cepa de *E. coli* aislada de mastitis clínica en vacas indujo la formación de NETs, y que presentaba mejores índices de estimulación al incubarse con la leche en comparación con el medio de cultivo [66]. También se reportó por Grinberg *et al.* la formación de NETs en neutrófilos adherentes de bovinos utilizando la cepa *E. coli* P4 (serotipo O32:H37), aislada de un caso de mastitis bovina aguda [67].

E. coli también causa una amplia gama de enfermedades en humanos, destacando particularmente las infecciones gastrointestinales. Marin-Esteban *et al.* realizaron un estudio donde indujeron la formación de NETs utilizando la línea celular mieloide PLB-985 diferenciada en neutrófilos maduros; y emplearon la cepa silvestre C1845 de *E. coli* [68], la cual es una cepa difusamente adherente (DAEC) perteneciente a una familia de bacterias que producen una adhesina llamada fimbria F1845, que actúa desencadenando una cascada de señalización, causando enfermedad entérica [69]. El ADN liberado fue cuantificado mediante la lectura de fluorescencia emitida por el fluoróforo *Sytox*[®] *Green*, observando que la cepa silvestre C1845

estimuló significativamente la liberación de ADN extracelular. Sin embargo, la biología del neutrófilo no puede representarse eficientemente en una línea celular en comparación con los neutrófilos obtenidos de sangre periférica, como se realizó en el presente estudio.

A diferencia de los estudios previamente mencionados, en el presente proyecto se trabajó utilizando diferentes diluciones de una cepa de *E. coli* aislada de heces a partir de un individuo sano, la cual no indujo de manera significativa la formación de los NETs, como se observó en los resultados obtenidos a partir de la cuantificación de la intensidad de fluorescencia y de la expansión nuclear del neutrófilo mediante imágenes de microscopía de fluorescencia. Este resultado posiblemente se debió al tipo de cepa utilizada, ya que la bacteria comensal de *E. coli* no tiene factores de virulencia que le permitan adaptarse a nuevos nichos y causar enfermedades, por lo que alguno de los factores de virulencia que adquieren las bacterias patógenas, tanto en humanos como en animales, pudieran estar induciendo la formación de los NETs.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIÓN

- Las exoenzimas, ExoS, ExoT y ExoU de *P. aeruginosa* favorecen la virulencia de la bacteria, por lo cual son importantes moléculas que promueven la inducción de NETs, y la activación de este mecanismo posiblemente se lleve a cabo mediante su actividad de fosfolipasa.

CAPÍTULO 9

PERSPECTIVAS

- Caracterizar los NETs utilizando la técnica de inmunofluorescencia, de acuerdo a sus componentes como MPO, NE, H3C y calprotectina.
- Realizar una correlación de acuerdo al nivel de inducción de NETs entre los aislamientos clínicos provenientes de pacientes con fibrosis quística y las cepas mutantes de *P. aeruginosa* empleando la técnica de RT-PCR.
- Estudiar el papel de los eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos) inducidos por aislados clínicos de *P. aeruginosa* en la generación de NETs.
- Correlacionar el nivel de NETs con la gravedad de los pacientes con FQ.
- Ensayar inhibidores específicos de la inducción de NETs, para ver si estos tienen un efecto benéfico en el estatus de los pacientes con FQ.

CAPÍTULO 10

REFERENCIAS

1. **Cutting GR.** 2015. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nature reviews. Genetics* **16**:45-56.
2. **Cooper GM, Hausman RE.** 2011. *La célula.* 5ª edición. Marbán Libros.
3. **Canton R, del Campo R.** 2010. Cystic fibrosis: deciphering the complexity. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **16**:793-797.
4. **Kartner N, Hanrahan JW, Jensen TJ, Naismith AL, Sun SZ, Ackerley CA, Reyes EF, Tsui LC, Rommens JM, Bear CE, et al.** 1991. Expression of the cystic fibrosis gene in non-epithelial invertebrate cells produces a regulated anion conductance. *Cell* **64**:681-691.
5. **Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ.** 2005. Cystic fibrosis. *The New England journal of medicine* **352**:1992-2001.
6. **The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium.** 1993 Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *The New England journal of medicine* **329**:1308-1313.
7. **O'Sullivan BP, Freedman SD.** 2009. Cystic fibrosis. *Lancet* **373**:1891-1904.
8. **Asociación Mexicana de Fibrosis Quística, A.C.,** México, 2015.
9. **Norma Oficial Mexicana NOM-034-SSA2-2002,** Para la prevención y control de los defectos al nacimiento.
10. **Secretaría de Salud.** México, 2013. Diagnóstico de fibrosis quística en la edad pediátrica.

11. **Secretaria de Salud.** 2015. El tamiz neonatal incluirá en el 2016 la prueba de fibrosis quística.
12. **Federacion Española de Fibrosis Quística.** España, 2016.
13. **Rahman S, Gadjeva M.** 2014. Does NETosis Contribute to the Bacterial Pathoadaptation in Cystic Fibrosis? *Frontiers in immunology* **5**:378.
14. **Dubois AV, Gauthier A, Brea D, Varaigne F, Diot P, Gauthier F, Attucci S.** 2012. Influence of DNA on the activities and inhibition of neutrophil serine proteases in cystic fibrosis sputum. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **47**:80-86.
15. **Papayannopoulos V, Staab D, Zychlinsky A.** 2011. Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving DNase therapy. *PloS one* **6**:e28526.
16. **Dwyer M, Shan Q, D'Ortona S, Maurer R, Mitchell R, Olesen H, Thiel S, Huebner J, Gadjeva M.** 2014. Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor. *Journal of innate immunity* **6**:765-779.
17. **Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A.** 2012. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual review of immunology* **30**:459-489.
18. **Kolaczkowska E, Kubes P.** 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology* **13**:159-175.
19. **Borregaard N, Cowland JB.** 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* **89**:3503-3521.
20. **Lekstrom-Himes JA, Gallin JI.** 2000. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *The New England journal of medicine* **343**:1703-1714.
21. **Nathan C.** 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews. Immunology* **6**:173-182.
22. **Brinkmann V, Zychlinsky A.** 2012. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *The Journal of cell biology* **198**:773-783.
23. **Papayannopoulos V, Zychlinsky A.** 2009. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends in immunology* **30**:513-521.

24. **Underhill DM, Ozinsky A.** 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annual review of immunology* **20**:825-852.
25. **Nusse O, Lindau M.** 1988. The dynamics of exocytosis in human neutrophils. *The Journal of cell biology* **107**:2117-2123.
26. **Lacy P.** 2005. The role of Rho GTPases and SNAREs in mediator release from granulocytes. *Pharmacology & therapeutics* **107**:358-376.
27. **Faurschou M, Borregaard N.** 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **5**:1317-1327.
28. **Borregaard N.** 2010. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* **33**:657-670.
29. **Borregaard N, Kjeldsen L, Sengelov H, Diamond MS, Springer TA, Anderson HC, Kishimoto TK, Bainton DF.** 1994. Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators. *Journal of leukocyte biology* **56**:80-87.
30. **Sengelov H, Kjeldsen L, Borregaard N.** 1993. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *Journal of immunology* **150**:1535-1543.
31. **Faurschou M, Sorensen OE, Johnsen AH, Askaa J, Borregaard N.** 2002. Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties. *Biochimica et biophysica acta* **1591**:29-35.
32. **Delclaux C, Delacourt C, D'Ortho MP, Boyer V, Lafuma C, Harf A.** 1996. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **14**:288-295.
33. **Singer II, Scott S, Kawka DW, Kazazis DM.** 1989. Adhesomes: specific granules containing receptors for laminin, C3bi/fibrinogen, fibronectin, and vitronectin in human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *The Journal of cell biology* **109**:3169-3182.
34. **Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A.** 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**:1532-1535.
35. **Zawrotniak M, Rapala-Kozik M.** 2013. Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta biochimica Polonica* **60**:277-284.

36. **Hakim A, Fuchs TA, Martinez NE, Hess S, Prinz H, Zychlinsky A, Waldmann H.** 2011. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nature chemical biology* **7**:75-77.
37. **Neeli I, Khan SN, Radic M.** 2008. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *Journal of immunology* **180**:1895-1902.
38. **Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A.** 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology* **176**:231-241.
39. **Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakim A, Zychlinsky A.** 2010. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology* **191**:677-691.
40. **Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA, Allis CD, Coonrod SA.** 2009. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *The Journal of cell biology* **184**:205-213.
41. **Leshner M, Wang S, Lewis C, Zheng H, Chen XA, Santy L, Wang Y.** 2012. PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Frontiers in immunology* **3**:307.
42. **Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A.** 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS pathogens* **5**:e1000639.
43. **Lu T, Kobayashi SD, Quinn MT, DeLeo FR.** 2012. A NET Outcome. *Frontiers in immunology* **3**:365.
44. **Kolaczowska E, Kubes P.** 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology* **13**:159-175.
45. **Manzenreiter R, Kienberger F, Marcos V, Schilcher K, Krautgartner WD, Obermayer A, Huml M, Stoiber W, Hector A, Griese M, Hannig M, Studnicka M, Vitkov L, Hartl D.** 2012. Ultrastructural characterization of cystic fibrosis sputum using atomic force and scanning electron microscopy. *Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society* **11**:84-92.

46. **Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA.** 2013. *Microbiologia Medica*. 7^a edición. Editorial Elsevier.
47. **Hardalo C, Edberg SC.** 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Critical reviews in microbiology* **23**:47-75.
48. **Bergen GA, Shelhamer JH.** 1996. Pulmonary infiltrates in the cancer patient. New approaches to an old problem. *Infectious disease clinics of North America* **10**:297-325.
49. Madigan, M. T., J. M. Martinko, J. Parker 1997 *Brock Biology of Microorganisms*, Eighth edition. Prentice Hall. New Jersey. pp.698-701.
50. **Rada B, Jendrysik MA, Pang L, Hayes CP, Yoo DG, Park JJ, Moskowitz SM, Malech HL, Leto TL.** 2013. Pyocyanin-enhanced neutrophil extracellular trap formation requires the NADPH oxidase. *PloS one* **8**:e54205.
51. **Shaver CM, Hauser AR.** 2004. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infection and immunity* **72**:6969-6977.
52. **Goehring UM, Schmidt G, Pederson KJ, Aktories K, Barbieri JT.** 1999. The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *The Journal of biological chemistry* **274**:36369-36372.
53. **Krall R, Schmidt G, Aktories K, Barbieri JT.** 2000. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT is a Rho GTPase-activating protein. *Infection and immunity* **68**:6066-6068.
54. **RM, Six DA, Dennis EA, Ghosh P.** 2003. In vivo phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors. *The Journal of biological chemistry* **278**:41326-41332.
55. **Sato H, Frank DW, Hillard CJ, Feix JB, Pankhaniya RR, Moriyama K, Finck-Barbancon V, Buchaklian A, Lei M, Long RM, Wiener-Kronish J, Sawa T.** 2003. The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *The EMBO journal* **22**:2959-2969.
56. **Hauser AR, Kang PJ, Engel JN.** 1998. PepA, a secreted protein of *Pseudomonas aeruginosa*, is necessary for cytotoxicity and virulence. *Molecular microbiology* **27**:807-818.
57. **Campos L.** 2015. Estudio del papel de las fosfolipasas fúngicas en la inducción de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) por especies del genero *Candida*.

- 58. Dennis EA, Rhee SG, Billah MM, Hannun YA.** 1991. Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J.* Apr;5(7):2068-77.
- 59. Lennartz MR.** 1999. Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis. *Int J Biochem Cell Biol.* Mar-Apr;31(3-4):415-30.
- 60. Yoo D goon, Floyd M, Winn M, Moskowitz SM, Rada B.** 2014. NET formation induced by *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates measured as release of myeloperoxidase-DNA and neutrophil elastase-DNA complexes. *Immunology Letters* **160**:186–194.
- 61. Young RL, Malcolm KC, Kret JE, Caceres SM, Poch KR, Nichols DP, Taylor-Cousar JL, Saavedra MT, Randell SH, Vasil ML, Burns JL, Moskowitz SM, Nick JA.** 2011. Neutrophil extracellular trap (NET)-mediated killing of *pseudomonas aeruginosa*: Evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR. *PLoS ONE* **6**.
- 62. Feltman H, Schulert G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR.** 2001. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **1021**:2659–2669.
- 63. Yahr TL, Vallis AJ, Hancock MK, Barbieri JT, Frank DW.** 1998. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:13899–904.
- 64. Wood SJ, Goldufsky JW, Bello D, Masood S, Shafikhani SH.** 2015. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT induces mitochondrial apoptosis in target host cells in a manner that depends on its GTPase-activating protein (GAP) domain activity. *Journal of Biological Chemistry* **290**:29063–29073.
- 65. Saliba AM, Nascimento DO, Silva MCA, Assis MC, Gayer CRM, Raymond B, Coelho MGP, Marques EA, Touqui L, Albano RM, Lopes UG, Paiva DD, Bozza PT, Plotkowski MC.** 2005. Eicosanoid-mediated proinflammatory activity of *pseudomonas aeruginosa* ExoU. *Cellular Microbiology* **7**:1811–1822.
- 66. Lippolis, J. D., T. A. Reinhardt, J. P. Goff, and R. L. Horst.** 2006. Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk. *Veterinary immunology and immunopathology* **113**:248-255.

- 67. Grinberg, N., S. Elazar, I. Rosenshine, and N. Y. Shpigel.** 2008. Beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity* **76**:2802-2807.
- 68. Marin-Esteban, V., I. Turbica, G. Dufour, N. Semiramo, A. Gleizes, R. Gorges, I. Beau, A. L. Servin, V. Lievin-Le Moal, C. Sandre, and S. Chollet-Martin.** 2012. Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strain C1845 induces neutrophil extracellular traps that kill bacteria and damage human enterocyte-like cells. *Infection and immunity* **80**:1891-1899.
- 69. Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology* **2**:123-140.

APÉNDICES

Apéndice A

Lista de aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* utilizados durante el estudio

No. Aislado clínico	Aislado clínico	Tipo de muestra	Producción de pigmento
A1	140859	Exudado faríngeo	Si
A2	140559	Exudado faríngeo	No
A3	132019	Exudado faríngeo	No
A4	132150	Exudado faríngeo	No
A5	131608	Expectoración	Si
A6	131723	Exudado faríngeo	Si
A7	131752	Exudado faríngeo	Si
A8	131785	Expectoración	Si
A9	131754	Expectoración	No
A10	140084	Exudado faríngeo	Si
A11	132150	Exudado faríngeo	No
A12	140164	Expectoración	No
A13	131716	Expectoración	No
A14	132166	Expectoración	No
A15	132176	Exudado faríngeo	No
A16	131640	Expectoración	No

Apéndice B

Mutantes por inserción de transposón de *P. aeruginosa*

Nombre de la cepa	Abreviatura del gen	Nombre del gen
PW1059	exoT	Exoenzima T
PW3038	pys2	Piocianina S2
PW4736	exoY	Exoenzima Y
PW5032	pvdF	Pioverdina sintetasa F
PW7462	pepA	Leucina aminopeptidasa
PW7463	pepA	Leucina aminopeptidasa
PW7478	exoS	Exoenzima S
PAO1		

Apéndice C

Preparación de soluciones y reactivos

Agar Luria Bertani (LB): Pesar 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, 5 gramos de NaCl y 15 g de agar bacteriológico. Disolver en 1000 mL de agua desionizada y calentar a ebullición durante 1 o 2 minutos hasta su disolución. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Enfriar y distribuir agitando suavemente.

Medio líquido Luria Bertani (LB): Pesar 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura y 5 gramos de NaCl. Disolver en 1000 mL de agua desionizada y calentar a ebullición durante 1 o 2 minutos hasta su disolución. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Enfriar y distribuir en tubos estériles de 13x100 mm.

Agar Eosina azul de metileno (EMB): Suspender 36 g del polvo en 1000 mL de agua desionizada. Reposar 5 minutos; mezclar, calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos hasta su disolución. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Enfriar y distribuir agitando suavemente.

Agar Mac Conkey: Suspender 50 g del polvo en 1000 mL de agua destilada Reposar 5 minutos; mezclar, calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos hasta su disolución.

Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Enfriar y distribuir agitando suavemente.

Agar sangre: Suspender 40 g del polvo en 1000 mL de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos y mezclar perfectamente hasta obtener una suspensión homogénea. Calentar con agitación frecuente y hervir 1 minuto para disolución total. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 20 minutos. Agregar de 5 a 10% de sangre ovina desfibrinada estéril al medio previamente esterilizado, fundido y enfriado de 45 a 50 ° C. Homogenizar y distribuir en cajas Petri estériles.

Glicerol al 70%: por cada 7mL de glicerol concentrado se adicionan 3mL de agua desionizada estéril.

PBS 10x: Pesar 80 g de NaCl (1,370 mM), 2 g KCl (27 mM), 14.2 g de Na₂HPO₄ (100 mM), y 2.45 g KH₂PO₄ (18 mM). Disolver en 800 mL de agua desionizada y ajustar el pH a 7.4 con HCl. Ajustar el volumen a 1000 mL con agua desionizada y esterilizar.

PBS 1x: Medir y colocar 100 mL de PBS 10x en 900 mL de agua destilada.

Azul de Tripano diluido: Agregar 990 µL de PBS 1x más 10 µL del colorante azul tripano (1 mg/ml).

PMA 40nM: Diluir el PMA 2 mM en 10 µL, adicionando 990 µL de RPMI.

Sytox® Green diluido: Añadir 990 µL de PBS 1x más 10 µL del fluoróforo Sytox® Green (5 mM).