

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**BUSQUEDA DE INHIBIDORES DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE
NEUTRÓFILOS EN MOLÉCULAS SECRETADAS POR *Trichinella spiralis***

Por

M.C. ANA LAURA RÍOS LÓPEZ

Como requisito para obtener el Grado de
Doctorado en Ciencias con Orientación en Microbiología Médica

**BUSQUEDA DE INHIBIDORES DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE
NEUTRÓFILOS EN MOLÉCULAS SECRETADAS POR *Trichinella spiralis***

Comité de tesis



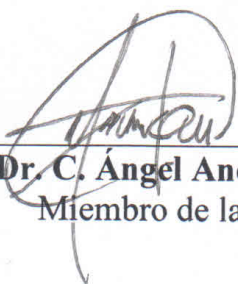
Dr. C. Alejandro Sánchez González
Director



Dra. C. Gloria María González González
Co-director de tesis




Dr. C. Miguel Ángel Becerril García
Miembro de la comisión



Dr. C. Ángel Andrade Torres
Miembro de la comisión



Dr. C. Romel Hernández Bello
Miembro de la comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

**BUSQUEDA DE INHIBIDORES DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE
NEUTRÓFILOS EN MOLÉCULAS SECRETADAS POR *Trichinella spiralis***

Presentado por:

M.C. Ana Laura Ríos López

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bacteriología del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRCEI) perteneciente al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La dirección de este proyecto estuvo a cargo del Dr. C. Alejandro Sánchez González.



Dr. C. Alejandro Sánchez González

Director de tesis

**BUSQUEDA DE INHIBIDORES DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE
NEUTRÓFILOS EN MOLÉCULAS SECRETADAS POR *Trichinella spiralis***

M.C. Ana Laura Ríos López fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de registro 818295. Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [A1-S-9424]

Entre Dios y la ciencia no encontramos jamás una contradicción. No se excluyen, como algunos piensan hoy, se complementan y se condicionan mutuamente.

-Max Planck

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la estancia como estudiante de posgrado.

Al Dr. Alejandro Sánchez, por cada una de sus enseñanzas y consejos, por el tiempo dedicado, y por ser el guía de este maravilloso camino.

A la Dra. Gloria González, por recibirme y abrirme las puertas del laboratorio, por ser una persona de inspiración, transmitir el conocimiento y la pasión por investigación.

A los Dres. Miguel Becerril, Ángel Andrade y Romel Hernández, por su apoyo y asesoría para la realización del proyecto, y por el valioso tiempo compartido.

A mis compañeros de posgrado, Lizzy De Anda, Sergio Alanís, Oscar Alonso, Carlos Alvares, Bere Villareal, Octavio Castelán, Joan Grimaldo, así como al personal del CRCEI, especialmente a Karen Solís, Lizeth Sánchez y Fernando Espinosa, por convertirse en mi familia, hacer especial y divertido cada día de mi estancia en el laboratorio.

A Brenda Wilson, por su auténtica amistad, su tiempo y compañía, por ser mi hermana del alma, pero principalmente por siempre tener una palabra de aliento y una sonrisa para mi corazón. A Gerardo García, por cada momento compartido, cada palabra y risa a su lado que fueron esenciales.

Al equipo Superbugs, Marian Soltero, Fernanda Garza, Devany Andrade e Isa Ledezma, por su cariño y amistad que hicieron cada día más bonito y especial, las quiero mucho.

Al Dr. Jorge Dávila, por seguir enseñándome cada día y por todo el apoyo que me proporcionó.

Y especialmente, a mi familia, mis papás y hermanos, porque sus palabras de aliento fueron lo más importante para que pudiera continuar y no rendirme. Gracias a su confianza y cariño estoy aquí ahora.

Y a ti, mi Orlando, por todo el soporte emocional que me diste a lo largo de este proceso, por confiar en mí incluso cuando yo no lo hacía, por estar para mí, para nosotros, y levantarme cada vez que lo necesitaba.

DEDICATORIA

A mis papás, Laura y Salomón, los pilares de mi vida, sin ellos nada y con ellos todo. A toda mi familia, hermanos, sobrinos y cuñadas. Para ustedes.

A ti Orlando, mi paralelo ser, porque has estado a mi lado, en cada momento, cada etapa, y después de tanto sigues aquí, para mí. Porque me empujaste a seguir, y no me dejaste atrás, siempre de tu mano, siempre a tu lado, siempre un equipo. Para ti.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1.1 Neutrófilos.....	2
1.2 Fagocitosis y estallido respiratorio.....	4
1.3 Degranulación.....	6
1.4 Trampas extracelulares de neutrófilos.....	9
1.5 Papel de las trampas extracelulares de neutrófilos en patologías.....	13
1.5.1 Lupus eritematoso sistémico (SLE).....	14
1.5.2 Artritis reumatoide (RA).....	15
1.5.3 Vasculitis de vasos pequeños.....	17
1.5.4 Fibrosis quística (FQ).....	17
1.6 Evasión de trampas extracelulares de neutrófilos.....	19
1.7 <i>Trichinella spiralis</i>	22
ANTECEDENTES	27
JUSTIFICACIÓN	30
HIPOTESIS	31
OBJETIVOS	32
5.1 Objetivos específicos.....	32
MATERIAL Y MÉTODOS	33
6.1 Área de trabajo.....	33
6.2 Cepas microbianas y condiciones de cultivo.....	33
6.3 Obtención de los antígenos de E-S.....	33
6.4 Purificación de polimorfonucleares.....	34
6.5 Inducción y cuantificación de trampas extracelulares (NETs).....	35
6.6 Efecto de los antígenos E-S de <i>T. spiralis</i> en la formación de NETs.....	36
6.7 Ensayo de viabilidad celular por exclusión de azul tripán.....	36
6.8 Fraccionamiento de proteínas de antígenos E-S de <i>T. spiralis</i>	37
6.9 Ensayo de migración por quimiotaxis.....	38
6.10 Ensayo de fagocitosis.....	38
6.11 Producción de ROS.....	39

6.12 Ensayo de degranulación de elastasa y MPO.....	39
6.13 Determinación de la localización de MPO y calprotectina en neutrófilos durante la formación de NETs.....	40
6.14 Evaluación de la activación de PKC.....	41
6.15 Evaluación de la citrulinación de Histona H3 ⁺	42
6.16 Análisis estadístico.....	43
RESULTADOS	44
7.1 Obtención de antígenos E-S de <i>T. spiralis</i>	44
7.2 Efecto de los antígenos E-S de <i>T. spiralis</i> sobre la formación de trampas extracelulares de neutrófilos.....	45
7.3 Efecto de los antígenos E-S de <i>T. spiralis</i> sobre las funciones antimicrobianas de neutrófilo.....	52
7.3.1 Migración por quimiotaxis.....	52
7.3.2 Fagocitosis de neutrófilos.....	54
7.3.3 Producción de ROS.....	54
7.3.4 Degranulación de elastasa de neutrófilo y MPO.....	56
7.4 Fraccionamiento de proteínas E-S de <i>T. spiralis</i>	58
7.5 Efecto de las fracciones de antígenos E-S de <i>T. spiralis</i> sobre la formación de NETs.....	60
7.6 Efecto de la fracción inhibitoria sobre la quimiotaxis.....	66
7.7 Efecto de la fracción inhibitoria sobre la fagocitosis de neutrófilo.....	67
7.8 Efecto de la fracción inhibitoria sobre la degranulación de elastasa y MPO.....	68
7.9 Implicación de la vía de señalización activada por PKC y citrulinación de histona H3 ⁺ en neutrófilos pre-tratados con la fracción inhibitoria.....	69
7.10 Caracterización de proteínas en fracción C3.....	72
DISCUSIÓN	75
CONCLUSIONES	84
PERSPECTIVAS	85
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Proceso de fagocitosis por células fagocíticas profesionales.....	5
Figura 2. Esquema de mecanismos de formación de trampas extracelulares...	10
Figura 3. Proceso de formación de NETs y moléculas implicadas.....	12
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i>	23
Figura 5. Gradiente obtenido posterior a la separación por densidad de sangre de donares.....	35
Figura 6. Proteínas presentes en el sobrenadante de cultivo de <i>T. spiralis</i>	44
Figura 7. Curva de concentración de antígenos E-S de <i>T. spiralis</i> para la inhibición de NETs.....	45
Figura 8. Efecto de antígenos E-S de <i>T. spiralis</i> sobre la formación de NETs..	47
Figura 9. Viabilidad de neutrófilos.....	48
Figura 10. Efecto de antígenos E-S sobre las NETs estimuladas por patógenos.....	51
Figura 11. Migración de neutrófilos por quimiotaxis.....	53
Figura 12. Fagocitosis de <i>E. coli</i> a 30, 45 y 60 minutos.....	54
Figura 13. Medición de la producción de ROS por oxidación de DHR.....	56
Figura 14. Degranulación de elastasa.....	57
Figura 15. Degranulación de MPO.....	58
Figura 16. Cromatograma de separación de sobrenadante de cultivo de <i>T. spiralis</i> con antígenos E-S de <i>T. spiralis</i> por cromatografía de exclusión por tamaño.....	59
Figura 17. Efecto de las fracciones de antígenos E-S de <i>T. spiralis</i> sobre la formación de NETs.....	61
Figura 18. Área nuclear de neutrófilos pre-estimulados con las fracciones de antígenos E-S de <i>T. spiralis</i>	62
Figura 19. Efecto de las fracciones sobre la formación de NETs.....	64

Figura 20. Curva de concentración de las fracciones sobre la formación de NETs.....	65
Figura 21. Migración de neutrófilos pre-tratados con la fracción C3.....	66
Figura 22. Fagocitosis de <i>E. coli</i> por neutrófilos pre-tratados con la fracción C3.....	67
Figura 23. Degranulación de elastasa.....	68
Figura 24. Degranulación de MPO.....	69
Figura 25. Vía de señalización de Raf-MEK-ERK.....	70
Figura 26. Citrulinación de histona H3 ⁺	71
Figura 27. Proteínas presentes en la fracción C3 del sobrenadante de antígenos de <i>T. spiralis</i>	72
Figura 28. Efecto de la fracción C3 posterior al estímulo de neutrófilos con PMA.....	74

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Proteínas granulares de neutrófilos humanos.....	8
Tabla 2. Mecanismos de evasión de NETs por patógenos.....	21
Tabla 3. Proteínas E-S de <i>T. spiralis</i>	25
Tabla 4. Fase móvil de fraccionamiento de proteínas por exclusión molecular con Superdex 200.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
°C	Grados centígrados
µl	Microlitros
µm	micrómetros
µM	micromolar
ACPA	Anticuerpos contra proteínas citrulinadas (por sus siglas en inglés)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AR	Artritis reumatoide
BCA	Ácido bicinconínico (por sus siglas en inglés)
CFTR	Gen regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística
CLR	Receptores tipo lectina C
CR1	Receptor del complemento 1 (por sus siglas en inglés)
Da	Daltones
DHR	Dihidrorodamina 123
EEA1	Antígeno endosómico temprano 1
E-S	Antígenos excretorios-secretorios
fMLP	N-formil-metionil-leucina-fenilalanina
FPLC	Cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad
FQ	Fibrosis quística
GE	General electric
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HO ⁻	Radicales hidroxilos
HOCl	Ácido hipocloroso
ICC	Infusión cerebro corazón
IgE	Inmunoglobulina E
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-8	Interleucina 8
IL-9	Interleucina 9
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-21	Interleucina 21
IL-33	Interleucina 33
kDa	kiloDaltones

LAMP	Proteínas de membrana asociadas a lisosomas
LDG	Granulocitos de baja densidad
LM	Larva muscular
LPS	Lipopolisacáridos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MMP-8	Matriz metaloproteínasa-8
MOI	Multiplicidad de infección
MPO	Mieloperoxidasa
NADPH	Nicotin adenin dinucleótido fosfato
NBL	Larva recién nacida
NE	Neutrófilo elastasa
NETs	Trampas extracelulares de neutrófilos (por sus siglas en inglés)
nM	nanomolar
O₂⁻	Anión superóxido
PAD-2	Peptidil arginina desaminasa 2
PAD-4	Peptidil arginina desaminasa 4
PBS	Solución Salina Amortiguada por Fosfatos
PKC	Proteína quinasa C
PMA	Acetato de miristato de forbol (por sus siglas en inglés)
PMN	Polimorfonucleares
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
PSGL-1	Glicoproteína P-selectina de ligando
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RA	Artritis reumatoide (por sus siglas en inglés)
RPMI	Medio RPMI
ROS	Especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SLE	Lupus eritematoso sistémico (por sus siglas en inglés)
SVV	Vasculitis de vasos pequeños (por sus siglas en inglés)
TLR	Receptores tipo Toll
TTBS	Solución salina amortiguada con Tween-Tris
v/v	Porcentaje volumen-volumen
UFC	Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

Las NETs son estructuras fibrosas compuestas de material nuclear y proteínas citoplasmáticas, que pueden capturar y eliminar a microorganismos patógenos, como bacterias, hongos y parásitos, sin embargo, es un proceso que debe ser cuidadosamente regulado debido a que el contenido del neutrófilo en el exterior de la célula puede causar daño a los tejidos, son fuente de autoantígenos y desempeñan un papel importante en ciertas alteraciones autoinmunes o inflamatorias en las cuales la formación exacerbada de NETs agrava la enfermedad. Los patógenos presentan mecanismos de evasión del sistema inmune, como la desencadenada por los neutrófilos. *Trichinella spiralis*, puede evadir la captura por las NETs mediante los antígenos excretores-secretorios (E-S), los cuales desempeñan un papel inmunomodulador. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los antígenos E-S de *T. spiralis* en la formación de NETs, con la finalidad de conocer si los antígenos E-S pueden inhibir este mecanismo antimicrobiano del neutrófilo, y puedan ser empleados como alternativa de tratamiento en enfermedades donde la participación de las NETs puede ser de importancia.

Para este fin, se obtuvieron los antígenos E-S del sobrenadante de cultivos de *T. spiralis*, se evaluó el efecto en las actividades antimicrobianas del neutrófilo, posteriormente se separó el sobrenadante por cromatografía de exclusión molecular y se evaluó el efecto de las fracciones obtenidas en las actividades antimicrobianas del neutrófilo. La formación de NETs se analizó mediante cuantificación de ADN extracelular y microscopia de fluorescencia, la actividad de quimiotaxis por migración en placas transwell, fagocitosis por el ensayo de protección con gentamicina, producción de ROS por oxidación del reactivo dihidrorodamina y degranulación de elastasa y mieloperoxidasa por densidad óptica. Encontramos que el sobrenadante con antígenos E-S inhibieron la liberación de NETs, sin alterar quimiotaxis, fagocitosis, producción de ROS y degranulación de elastasa y mieloperoxidasa. Del sobrenadante que contenía los antígenos E-S se obtuvo una fracción con dos proteínas de peso molecular aproximado de 65 y 75 kDa que presentó actividad inhibitoria de liberación de NETs. Los neutrófilos expuestos a la fracción ES mantuvieron un núcleo delobulado, similar a las primeras etapas de formación de NETs, sin observarse las estructuras fibrosas indicativas de liberación de NETs. Además, observamos que el pre-tratamiento de neutrófilos con la fracción ES no afectó las actividades de fagocitosis, quimiotaxis, producción de ROS y degranulación.

1. INTRODUCCIÓN

Los neutrófilos son células polimorfonucleares que representan del 40-60% de las células en circulación sanguínea, pertenecen al sistema inmune en humanos, siendo de las primeras células en llegar a los sitios de infecciones microbianas, debido a que son potentes efectores en la inmunidad innata. Una vez que llegan a los sitios de infección, pueden eliminar a los patógenos por diversos mecanismos entre los cuales se incluye fagocitosis, degranulación, eliminación por especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y formación de trampas extracelulares (NETs, por sus siglas en inglés) [1]. Las NETs, se identificaron en el año 2004 y fueron descritas como una estrategia antimicrobiana que implica la extrusión de una matriz compuesta de ácido desoxirribonucleico (ADN) y gránulos líticos, una vez fuera de la célula, esta matriz captura a microorganismos patógenos evitando la diseminación a tejidos u órganos vecinos y los elimina por la exposición a altas concentraciones de radicales libre de oxígeno que son de producción propia del neutrófilo y por efecto de las proteínas contenidas en sus gránulos [2].

A pesar de ser células con potentes antimicrobianos y una importante capacidad de eliminar a patógenos, su actividad antimicrobiana debe ser regulada cuidadosamente, ya que la generación excesiva de ROS, la gran cantidad de degranulación hacia el exterior, así como la formación de NETs, pueden generar un daño masivo a los tejidos e incluso contribuir a la patogenia de varias patologías. Previamente se ha identificado la implicación de la producción incontrolada de NETs en la patología de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, entre las que destaca el lupus eritematoso sistémico (SLE,

por sus siglas en inglés), artritis reumatoide (RA, por sus siglas en inglés), diabetes mellitus, vasculitis, fibrosis quística, entre otras [3]. Por otro lado, diversos microorganismos han desarrollado estrategias para evadir o eliminar la formación de NETs, ya sea bloqueando vías de señalización implicadas en su formación o liberación o mediante la producción de proteínas con capacidad de degradación o inhibición [4-6]. Algunos parásitos pueden inducir la liberación de NETs y, además, se ha demostrado que pueden evadir esta respuesta debido a componentes de su estructura, o bien, por la secreción de proteínas que pueden evitar la formación o la liberación de dichas estructuras [7]. Nematodos, como *Trichinella spiralis*, desencadenan la formación de NETs debido a su tamaño macroscópico, no obstante, ha desarrollado mecanismos de defensa, en donde están implicados sus productos de excreción-secreción, que le permiten eludir el sistema inmune del hospedero y permitir la sobrevivencia

1.1 Neutrófilos

Son leucocitos polimorfonucleares (PMN) que pertenecen al sistema inmune innato, posterior a un proceso de diferenciación las células maduras se liberan de la médula ósea y presentan vida media corta, aproximadamente 8 a 12 h en circulación, mientras que en tejido suelen permanecer más de 12 h [8]. La liberación de la médula ósea está estrechamente regulada en individuos sanos, incrementándose la liberación a circulación durante procesos infecciosos [3]. Al ser parte de la respuesta innata, constituyen la primera línea de defensa contra diversos patógenos ya sea bacterias, hongos, parásitos y/o virus, ya que se encuentran armados de proteínas antimicrobianas contenidas dentro de sus gránulos [9].

En el sitio de inflamación, los macrófagos y/u otras células detectan señales inflamatorias provenientes de bacterias, como lipopolisacárido (LPS) y N-formil-metionil-leucina-fenilalanina (fMLP), o quimioatrayentes y citocinas que envían hacia los neutrófilos maduros lo que les permite dejar la circulación sanguínea y rápidamente llegar al sitio de infección [1, 4]. En la superficie del neutrófilo se expresa la glicoproteína P-selectina de ligando 1 (PSGL-1) y L-selectina para el reconocimiento de señales inflamatorias, que al entrar en contacto con el endotelio se acoplan a las selectinas de células endoteliales dando como resultado la unión de neutrófilos a las paredes de vasos para continuar con el rodamiento a lo largo del endotelio y dar comienzo a la cascada de activación [3].

Los neutrófilos presentan tres tipos de gránulos, los primeros en formarse durante la maduración son los gránulos primarios también conocidos como azurófilos, contienen gran cantidad de péptidos y proteínas como mieloperoxidasa (MPO), defensinas, lisozima, serin proteasas (neutrófilo elastasa [NE]), catepsina G y proteinasa 3, y son llamados así por su habilidad para tomar el colorante básico azure A; los segundos en formarse son los gránulos específicos o secundarios que contienen lactoferrina, pentraxina 3, matriz metaloproteínasa-8 (MMP-8) y diversas proteínas que se localizan en la membrana plasmática; los gránulos terciarios, son más pequeños y los últimos en formarse, contienen gelatinasa, MMP-9 y matriz metaloproteínasa MT-6 [4]. Además, presentan lisosomas y vesículas secretorias, donde los primeros contienen enzimas hidrolasas ácidas y los últimos incluyen componentes de membrana que se encargan de reponer los componentes consumidos durante el proceso de fagocitosis [10, 11].

Para eliminar a los microorganismos patógenos, el neutrófilo reconoce a los patógenos a través de sus receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés),

tales como receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés), tipo lectina C (CLR, por sus siglas en inglés), sensores citoplásmicos de ácidos nucleicos, entre otros, y desencadena diversos mecanismos antimicrobianos, además estimula otras células del sistema inmune como macrófagos, células dendríticas y linfocitos T, potenciando la actividad de estas células contra patógenos [12]. Sus mecanismos antimicrobianos incluyen, la entrada del patógeno dentro de una vacuola al neutrófilo, mecanismo conocido como fagocitosis, seguido de la producción de ROS, tóxicas para el microorganismo, sumado a las ROS, los gránulos pueden fusionarse a la vacuola o bien ser liberados al exterior de la célula permitiendo la eliminación del patógeno, o liberar NETs para generar un entorno letal esencial para la destrucción de los patógenos [13].

1.2 Fagocitosis y estallido respiratorio

La fagocitosis es el principal mecanismo para eliminar patógenos y restos celulares mediante un proceso regulado por receptores (FcR- γ o CLR) donde los patógenos o partículas, previamente opsonizadas generalmente por IgG, son internalizadas en una vacuola llamada fagosoma, consecutivamente los gránulos de neutrófilo se fusionan al fagosoma, proceso llamado maduración del fagosoma adquiriendo propiedades letales debido a la producción de un ambiente perjudicial y tóxico para los microorganismos patógenos [3, 8]. Una vez que el neutrófilo internaliza el patógeno dentro de la vacuola, ésta es dirigida hacia el endosoma temprano caracterizado por un pH 6.0-6.5, moléculas de antígeno endosómico temprano 1 (EEA1, por sus siglas en inglés), receptores de transferrina y Rab5, una guanosina trifosfatasa (GTPasa), el proceso de maduración continua formándose el endosoma tardío, caracterizado por un pH 5.5-6.0, vesículas, las

GTPasas Rab7 y Rab9 y proteínas de membranas asociadas a lisosomas (LAMP, por sus siglas en inglés), finalmente conduce a la formación del lisosoma, el cual se caracteriza por un pH más ácido (≤ 5.0) y concentraciones importantes de proteasas que determinará la degradación de los microorganismos patógenos [14]. En la figura 1 se resume el mecanismo de fagocitosis realizada por los neutrófilos. El proceso de fagocitosis realizado por los neutrófilos ocurre generalmente en menos de 30 segundos, contrapuesto a los macrófagos, de igual manera considerados fagocitos profesionales, donde el mecanismo puede tomar varios minutos para ingerir a los patógenos [15].

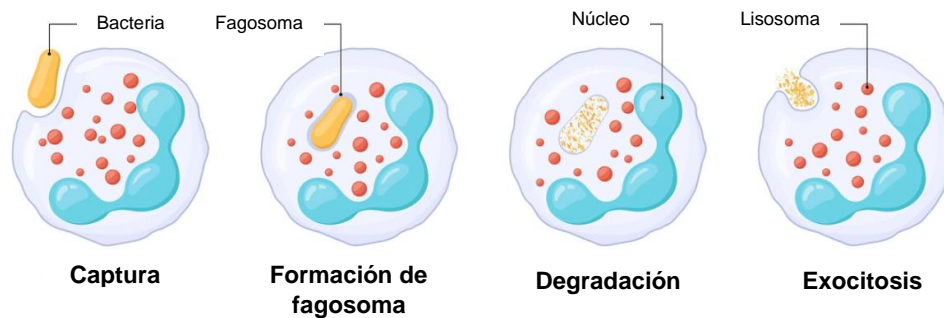


Figura 1. Proceso de fagocitosis por células fagocíticas profesionales. Imagen tomada de [16]

Simultáneamente al proceso de fagocitosis, los neutrófilos, además de otras células como los macrófagos, desencadenan un estallido respiratorio, donde se producen altas concentraciones de ROS por medio del complejo nicotin adenin dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH, por sus siglas en inglés) con potente capacidad antimicrobiana. Anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y radicales hidroxilos (HO^-) son algunas ROS generadas [11]. El complejo de NADPH requiere de la traslocación de diferentes subunidades (p47, p67, p40) hacia el complejo localizado en la membrana, completándose con gp91, gp22 y Rac2. Una vez formado el complejo NADPH oxidasa se ensambla en la

membrana del neutrófilo para comenzar la cascada de oxígeno reactivo y reducir el oxígeno molecular a superóxido, este se dismuta y forma H_2O_2 ; la MPO puede reaccionar con el H_2O_2 y producir diversas especies reactivas, como los ácidos hipoclorosos (HOCl), un potente antimicrobiano [3]. En general, el radical HO^\cdot , las cloraminas y HOCl, son capaces de inactivar proteínas de hierro y azufre, proteínas de membrana y los orígenes de replicación de ADN, desempeñando un papel fundamental en la eliminación de microorganismos patógenos [11]. La activación del complejo NADPH sucede por dos mecanismos, el primero involucra la activación de la proteína quinasa C (PKC, por sus siglas en inglés), por estímulos que desencadenan la fosforilación de componentes del citosol que son esenciales para el ensamblaje de las subunidades del complejo NADPH; el segundo mecanismo sucede a través de la activación del acoplamiento de proteínas G por estímulos inflamatorios [17].

1.3 Degranulación

La degranulación implica la liberación de ROS y proteínas antimicrobianas que se encuentran dentro de los gránulos [13]. Este proceso es definido como la secreción o producción de sustancias proinflamatorias derivadas de los gránulos ante la estimulación, estas sustancias son liberadas de los neutrófilos por degranulación o exocitosis de gránulos secretores que están unidos a la membrana [18].

Como se mencionó anteriormente, los neutrófilos contienen cuatro tipos de gránulos, los gránulos primarios (azurófilos), secundarios (específicos), terciarios y vesículas secretoras. Los gránulos primarios son los primeros en producirse, contienen MPO y serin

proteasas de neutrófilo como neutrófilo elastasa (NE), catepsina G, proteinasa 3, entre otras [19]. Las serin proteasas son esenciales para eliminar bacterias, mediante escisión de componentes de la membrana bacteriana, pérdida de la integridad de la membrana o bien, por medio de la inactivación de factores de virulencia necesarios para la patogénesis bacteriana [20]. Los gránulos secundarios se caracterizan por la presencia de lactoferrina, calprotectina, y lisozimas. La calprotectina es crítica en la respuesta inmune debido a que inhibe el crecimiento microbiano por la quelación de Mn^{2+} y Zn^{2+} , por otro lado, la lactoferrina bloquea la entrada de patógenos uniéndose competitivamente a receptores celulares [21, 22]. Así mismo, los gránulos terciarios contienen pocas proteínas antimicrobianas, pero almacenan metaloproteasas como gelatinasa. Las vesículas secretoras son de origen endocítico y contienen proteínas plasmáticas, como la albúmina, que se incorporan a la superficie de la membrana durante la activación y proporcionan las proteínas necesarias para una firme adhesión al endotelio y migración a los tejidos [23]. Las membranas de las vesículas secretoras contienen abundantes receptores del complemento 1 (CR1), receptores de péptidos bacterianos formilados (fMLP), receptores de LPS, entre otros, los cuales se incorporan a la membrana plasmática tras la exocitosis [24]. En la tabla 1 se muestran los principales péptidos y proteínas granulares de neutrófilos.

Tabla 1. Proteínas granulares de neutrófilos humanos

Péptido o proteína antimicrobiana	Mecanismo antimicrobiano	Localización celular	Referencia
MPO	Generación de ácido hipocloroso Formación de redes	Gránulos primarios Lisosoma	[25]
AZU1	Actividad contra bacterias Gram negativas	Gránulos primarios	[12]
α -Defensinas	Actividad antibacteriana, fungicida y antiviral Inhibición de síntesis de ADN, ARN	Gránulos primarios	[26]
Catepsina G	Serin proteasa con actividad específica de tipo tripsina y quimiotripsina Escinde C3 del complemento	Gránulos primarios	[27]
NE	Escisión de componentes bacterianos	Gránulos primarios	[11]
Proteinasa 3	Actividad proteolítica Factores de degradación de virulencia	Gránulos primarios	[28]
LL-37	Formación de poros de membrana	Gránulos secundarios	[29]
Lactoferrina	Unión y transporte de hierro Estimula la señalización de TLR4	Gránulos secundarios	[30]
Calprotectina	Alteración del crecimiento bacteriano	Gránulos secundarios	[31]
Pentraxina 3	Receptor de reconocimiento de patrones en la inmunidad innata	Gránulos secundarios	[32]
Matrix de metaloproteinasa 9	Escisión de gelatina tipo I y V y de colágeno tipo IV y V	Gránulos terciarios	[12]
Catelicidina	Actividad antibacteriana por unión a LPS	Gránulos terciarios	[33]

Una vez que ocurre la estimulación de receptores los gránulos se trasladan a la membrana plasmática o del fagosoma, se acoplan y fusionan con la membrana para finalizar con la liberación del contenido. El proceso de exocitosis ocurre en cuatro pasos, 1) el primer paso implica el reclutamiento de gránulos del citoplasma hacia la membrana blanco e involucra la remodelación del citoesqueleto de actina y ensamblaje de microtúbulos, 2) seguido de la unión y acoplamiento de vesículas, 3) posteriormente ocurre un cebado de

gránulos que los activa para la fusión y 4) finalmente se desarrolla una estructura de poro [18, 34].

1.4 Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)

Las NETs es un mecanismo descrito por Brinkmann y colaboradores en 2004, en donde los neutrófilos liberan su contenido hacia el exterior de la célula. Son estructuras compuestas de gránulos y proteínas antimicrobianas (NE, MPO, pentraxina, lactoferrina, catepsina G y la proteína incrementadora de permeabilidad bacteriana), y componentes nucleares, tales como ADN e histonas [35], sin embargo, también se ha descrito que puede contener ADN mitocondrial. Este mecanismo antimicrobiano ocurre mediante un proceso de muerte celular denominado NETosis, que es diferente de apoptosis y necrosis [3]. Las NETs son capaces de neutralizar, y eliminar a bacterias, hongos, parásitos y virus, además de evitar la diseminación de estos al contenerlos en las fibras [2]. Pueden ser activadas por moléculas químicas, como acetato de miristato de forbol (PMA, por sus siglas en inglés), citocinas como la interleucina-8 (IL-8), estructuras bacterianas, como LPS, microorganismos, o incluso plaquetas pueden desencadenar su liberación [13]. Existen dos mecanismos para la liberación de NETs, el primero involucra una NETosis lítica, la cual resulta de la liberación del contenido por ruptura de la membrana plasmática y por lo tanto pérdida total de las funciones del neutrófilo, mientras que el segundo mecanismo es denominado NETosis vital, donde la liberación de NETs suele ocurrir de manera rápida y no implica lisis celular [36].

La estimulación de receptores, como TLRs, o receptores de citocinas, pueden activar la PKC, la cual inicia una cascada de señalización para activar el complejo NADPH oxidasa. El mecanismo de formación aún no se encuentra completamente comprendido, sin embargo, se conoce que la vía de ROS y el complejo NADPH oxidasa están involucrados. Una vez activados, los neutrófilos atraviesan un proceso donde su núcleo lobulado se pierde, así como la diferencia entre eucromatina y heterocromatina. Seguido de esto, la membrana nuclear se disrumpe, lo que permite que los componentes comiencen a mezclarse. Finalmente, la membrana plasmática se rompe para liberar el contenido de la célula hacia el exterior [37]. En la figura 2 se esquematiza de manera breve el mecanismo de formación y liberación de fibras.

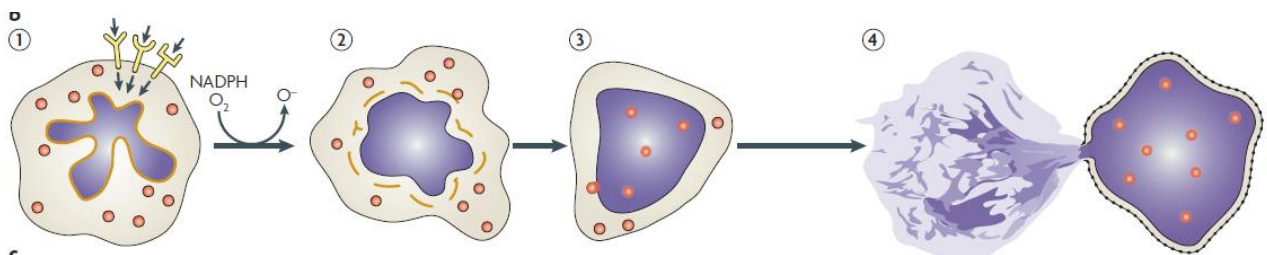


Figura 2. Esquema de mecanismos de formación de trampas extracelulares. 1) La activación de neutrófilo conduce a la formación de ROS, 2) La membrana nuclear se desintegra y se pierde la integridad de los gránulos, 3) El núcleo pierde los lóbulos y el material nuclear llena el espacio total de la célula, 4) La célula se redondea, contrae y finalmente se liberan las NETs. Imagen tomada de [38]

La MPO y NE son dos enzimas cuyo papel es crítico en la formación de NETs. Cuando se generan ROS, la MPO es estimulada, lo que desencadena la activación de NE y su translocación desde los gránulos primarios hacia el núcleo, donde llevará a cabo el procesamiento de histonas seguido de una alteración en el empaquetamiento de la cromatina [39].

Como se mencionó anteriormente, existen diferentes vías de formación de NETs, en donde la mayoría involucra la muerte celular (NETosis lítica) [40]. Uno de los mecanismos de formación es dependiente del complejo NADPH oxidasa en donde es necesario la formación de ROS [41]. Diversos estímulos pueden activar la enzima peptidil arginina desaminasa-4 (PAD-4) e inducir la citrulinación de histonas, paso importante en la formación de NETs. La generación de ROS es necesaria para la activación de PAD4, por lo que son vías que convergen en la liberación de fibras [42].

Staphylococcus aureus desencadena un proceso de NETosis independiente de ROS y de la lisis de neutrófilos, este mecanismo ocurre más rápido que la formación dependiente de ROS, e implica liberación de vesículas que contienen ADN que brotan de la membrana nuclear hacia el exterior para romperse y liberar la cromatina con proteínas antimicrobianas [43]. La figura 3 muestra el proceso de formación de NETs, así como las vías y moléculas involucradas.

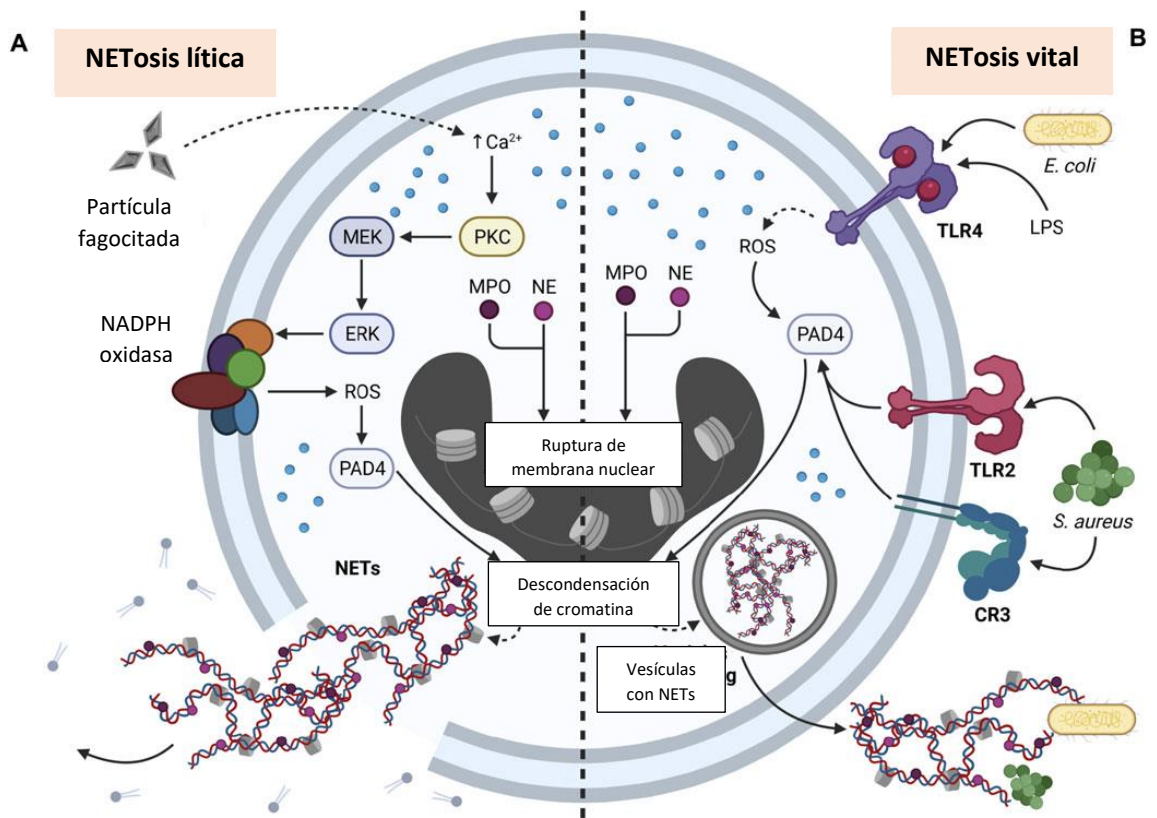


Figura 3. Proceso de formación de NETs y moléculas implicadas. Imagen tomada de [44]

Los neutrófilos son la principal fuente de ADN extracelular que se ha descrito en las trampas extracelulares, sin embargo, otro tipo de granulocitos como eosinófilos o basófilos, y células mononucleares, también se han reportado con capacidad de formar trampas extracelulares en respuesta a varios estímulos [45].

Además de cumplir su función de capturar y eliminar a microorganismos patógenos, son capaces de capturar ciertos materiales inertes como cristales inorgánicos o pueden degradar mediadores pro-inflamatorios y desencadenar un proceso inflamatorio, recientemente se conoce que pueden contribuir en procesos de fibrosis, lupus eritematoso

sistémico (SLE, por sus siglas en inglés), artritis reumatoide (RA), o incluso en afecciones como diabetes, cáncer, cicatrización de heridas y causar eventos trombocitopénicos [46].

La NETosis es una forma de muerte distinta de apoptosis y necrosis, debido a sus características morfológicas y a los eventos moleculares llevados a cabo como los antes mencionados. Además, difieren en el tiempo de generación de estos ya que a diferencia de la necrosis la cual sucede en minutos y la apoptosis la cual toma cerca de 16 horas en los neutrófilos, para la generación de NETs el periodo requiere de tres a cuatro horas generalmente [47, 48].

1.5 Papel de las trampas extracelulares de neutrófilos en patologías

Los neutrófilos, así como las NETs desempeñan un doble papel en la homeostasis del hospedero, ambos protegen al hospedero de enfermedades infecciosas, sin embargo, pueden causar alteraciones patológicas si no existe un proceso de control, o concurre un descontrol en la eliminación de dichos componentes, la presencia de NETs podría causar consecuencias serias y con ello originar diversos procesos fisiológicos [35, 49]. Las NETs contienen una alta concentración de moléculas potencialmente tóxicas, es por ello por lo que una fuerte unión mantiene a los componentes celulares impidiendo que diseminen a tejidos vecinos y ocasionen daño tisular. Se ha propuesto que las NETs son una fuente de autoantígenos en enfermedades autoinmunes, particularmente aquellas asociadas a autoanticuerpos contra proteínas derivadas de neutrófilos [50].

1.5.1 Lupus eritematoso sistémico (SLE)

SLE es una patología autoinmune multifactorial que involucra varios órganos, caracterizada por complejos autoinmunes y niveles elevados de interferón alfa (IFN- α) que son inducidos por los autoantígenos debido a la incorrecta eliminación de productos derivados de células apoptóticas o necróticas. En los pacientes con SLE, el material nuclear de las células que sufrieron NETosis se acumula, y estos autoantígenos son presentados a las células B para generar anticuerpos contra los componentes derivados de los neutrófilos. La formación de inmunocomplejos activa el sistema del complemento e induce inflamación, daño vascular, y trombosis [51]. Se ha informado por otros autores que los inmunocomplejos activan a células dendríticas para producir IFN- α , estos complejos son originados por NETosis. A su vez, IFN- α induce la expresión de LL37 y péptido de neutrófilo humano en la superficie del neutrófilo lo que promueve liberación de NETs [52, 53].

Además de la elevada producción de IFN- α , los pacientes con SLE presentan un mayor porcentaje de granulocitos de baja densidad (LDG, por sus siglas en inglés), que, en comparación con los neutrófilos de densidad normal, presentan una capacidad fagocítica alterada, fenotipo proinflamatorio, producción elevada de IFN tipo I, citotoxicidad hacia células endoteliales generando daño vascular, y una mayor capacidad de liberar NETs [54]. Diversos estudios han demostrado que pacientes con SLE presentan una limitada capacidad para degradar NETs. En estos pacientes, las NETs se encuentran protegidas por los autoanticuerpos evitando que puedan ser degradadas correctamente por las enzimas DNasa 1 o incluso por la presencia de inhibidores de DNasa 1 en el suero de estos pacientes, esto ocasiona un incremento de la vida media de las NETs tornándose más

persistentes y prolongadas [46]. Lood C. *et al.*, bloquearon la producción de ROS mitocondriales y por lo tanto la subsecuente NETosis espontánea en un modelo murino de SLE resultando en una menor gravedad de la enfermedad comparados con ratones con SLE sin bloqueo de ROS [55]. Modelos murinos con desarrollo de SLE y que además presentan defectos en la NADPH oxidasa muestran fenotipos autoinmunes más graves [55]. La eliminación alterada de NETs por defectos en la degradación también se encuentra correlacionada con glomerulonefritis y pleuritis. Esta degradación alterada en asociación con la afectación de órganos proporciona un cierto marcador de diagnóstico y una posibilidad de blanco terapéutico [56]. Por otro lado, se conoce que las NETs pueden activar la vía clásica y alternativa del complemento, por lo que defectos en las vías del complemento, posiblemente debido a su capacidad para opsonizar el material apoptótico, están de igual manera asociados a SLE [52, 54].

1.5.2 Artritis reumatoide (RA)

La RA es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por una inflamación sinovial que ocasiona lesiones en cartílagos y huesos de articulaciones. En la RA los neutrófilos activados de tejidos sinoviales liberan proteasas citotóxicas, que dañan el cartílago, citocinas y quimiocinas como TNF-11 y TNFS13B implicados en la activación de linfocitos B. Después de ser activados por complejos autoinmunes, dichos complejos se acumulan en la superficie de la articulación dando como resultado un fagosoma incompleto (fagocitosis frustrada) lo que provoca que se liberen grandes concentraciones de moléculas citotóxicas y agentes oxidantes al medio en la superficie del cartílago [52,

57]. El líquido sinovial de estos pacientes se infiltra con neutrófilos que forman NETs con mayor facilidad respecto a neutrófilos de individuos sanos, además, en el suero de pacientes con RA se encuentran anticuerpos contra proteínas citrulinadas (ACPA, por sus siglas en inglés) como el caso de las histonas citH2A, citH2B y citH4, concentraciones altas de ROS y MPO, y las enzimas PAD-2 y PAD-4 [35, 49]. En las articulaciones de pacientes RA, los antígenos citrulinados inducen respuestas autoinmunes que conducen a la generación de autoanticuerpos anti-NET. Los ACPA, contienen proteínas nucleares, citoplasmáticas, proteínas asociadas a membrana y proteínas extracelulares que estimulan la liberación de enzimas PAD para la conversión de argininas en citrulinas que son reconocidos como autoantígenos [58]. Las proteínas citrulinadas y los complejos autoinmunes que contienen varios antígenos citrulinados tienen mayor inmunogenicidad y la presencia en las articulaciones esta correlacionada con la gravedad de la enfermedad [59]. En un estudio realizado por Mor-Vaknin *et al.*, mostraron que un bloqueo de NETosis y de citrulinación de histonas, resultó en reducción de inflamación y de síntomas en articulaciones de ratones con RA inducida [60, 61]. En otro estudio diferente, ratones deficientes de la enzima PAD-4 manifestaron artritis con una menor severidad, así como títulos de anticuerpos reducidos [62].

Las NETs promueven la activación y liberación de citocinas por sinoviocitos similares a fibroblastos ocasionando daño articular y un incremento en la propagación de un ciclo de inducción de NETs y formación de autoanticuerpos [63]. Otra característica de pacientes con RA es la presencia de neutrófilos LDG que expresan niveles bajos del receptor TNF1 y TNF2 en la superficie lo que induce una menor respuesta a la estimulación de TNF [64].

1.5.3 Vasculitis de vasos pequeños

La vasculitis de vasos pequeños (SVV, por sus siglas en inglés), es una enfermedad autoinmune caracterizada por la presencia de ANCA contra MPO y proteinasa 3 (PR3) que causan inflamación y destrucción de vasos pequeños. Los ANCA, así como los anticuerpos dirigidos contra MPO y PR3 pueden desencadenar NETosis, generando un ciclo que provoca una desregulación de liberación de NETs que es capaz de inducir daño de células endoteliales. Las NETs influyen en la progresión de la enfermedad de SVV por el efecto citotóxico de las histonas liberadas en vasos sanguíneos [65, 66]. Estudios realizados por otros autores informaron que IgG aislada de pacientes con SVV inducía la formación de NETs *in vitro* [67]. Los componentes de las NETs pueden ser responsables de la unión de plaquetas y coagulantes sanguíneos lo que contribuye en la formación de trombos, en los pacientes con SVV suele ocurrir episodios tromboembólicos venosos [68]. También se ha demostrado que la presencia de histonas de NETs puede favorecer la formación de trombos, la presencia de plaquetas puede estimular a los neutrófilos para que liberen NETs [69, 70].

1.5.4 Fibrosis quística (FQ)

La FQ es una enfermedad pulmonar derivada de una mutación en el gen regulador de la conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR, por sus siglas en inglés), provocando una alteración en el transporte de iones Na^+ y Cl^- y niveles elevados de mucosidad [60]. La alteración en el transporte de iones a través del epitelio aumenta la viscosidad del moco lo que interfiere con el aclaramiento mucociliar creando un ambiente

susceptible a infecciones bacterianas, lo que origina que los pacientes con FQ presenten infecciones recurrentes [71]. Las infecciones en pacientes con FQ provocan una entrada de neutrófilos, deficientes en el estallido respiratorio y una descontrolada degranulación, a pulmones generando un estado de inflamación crónica y daño tisular local [72].

La concentración masiva de neutrófilos y la liberación de NETs propician la acumulación de ADN, histonas, MPO y NE, causantes de daño epitelial, agravando la patología pulmonar [61]. Estudios realizados en el esputo de pacientes con FQ han revelado que contiene grandes cantidades de NETs, representando una fuente importante de proteasas en el pulmón. Además de MPO y NE, la catepsina G y proteinasa 3 también contribuyen al exceso de proteasas que pueden favorecer el daño pulmonar. Las NETs pueden ser un estímulo proinflamatorio en la FQ, desempeñando un papel antimicrobiano reducido, debido a que, a pesar de la gran cantidad de neutrófilos activados, los pacientes con FQ sufren infecciones microbianas recurrentes y suelen ser colonizados por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Aspegillus fumigatus*, principalmente [73, 74]. Las cepas clínicas de *P. aeruginosa* de FQ pueden adquirir resistencia a la eliminación por NETs [75].

La función de neutrófilos con una NETosis reducida puede favorecer la reducción de la inflamación. Las terapias actuales incluyen DNasas, anticuerpos anti-histonas y anti-proteasas. Uno de los tratamientos para reducción de la viscosidad del esputo es degradación del ADN presente en el moco por medio de DNasas recombinantes de humano (rhDNase), conllevando el riesgo de liberar moléculas activas y altamente tóxicas para el epitelio pulmonar [76]. Los anticuerpos anti-proteasas se emplean en terapias con la finalidad de suprimir la actividad de las proteasas, mientras que los anticuerpos anti-

histonas se ha demostrado ser protectores del daño pulmonar ocasionado por NETs en modelos murino con lesiones pulmonares, sin embargo, pueden ser altamente inmunogénicos y promover autoinmunidad [77, 78].

Las terapias disponibles pueden reducir algunos síntomas y retrasar la progresión de la enfermedad pulmonar, pero no logran ser suficientemente efectivas y suelen tener efectos adversos significativos.

1.6 Evasión de trampas extracelulares de neutrófilos

Las NETs permiten contener a los patógenos y evitar su diseminación, sin embargo, debido a que son un importante mecanismo de defensa del sistema inmune del hospedero, los microorganismos han desarrollado estrategias que le permiten contrarrestar este mecanismo de eliminación [4].

Los microorganismos pueden emplear estrategias que les permita inhibir la liberación de las NETs, degradar o resistir a estas trampas, incluso pueden utilizar las tres estrategias como es el caso de *Streptococcus pyogenes*. Como previamente se mencionó, la generación de ROS es un paso esencial en la inducción de NETs, varios patógenos pueden inhibir la vía de generación de dichos oxidantes, ya sea interfiriendo con la activación de la vía Raf-ERK, situada río arriba del complejo NADPH oxidasa, o bien la citocina IL-10 generada por patógenos, puede bloquear la generación de ROS.

Otro mecanismo utilizado por los microorganismos es la capacidad de degradar el ADN utilizando nucleasas producidas por ellos mismos o pueden emplear la enzima catalasa y

suprimir el desencadenamiento del estallido respiratorio por parte del complejo de la enzima NADPH [1].

Un método empleado por los microorganismos patógenos para evitar la muerte por parte de los neutrófilos es garantizar una producción menor de trampas extracelulares. Esto se logra modificando la superficie del patógeno, mimetizando moléculas de su superficie para reducir o limitar el grado en que se activan los neutrófilos y por lo tanto disminuir la liberación de NETs. Por otro lado, microorganismos con cápsulas de polisacáridos pueden evitarlas, aumentando la virulencia del patógeno [4]. En la tabla 2 se describen algunas estrategias empleadas por los patógenos para la evasión de NETs.

Tabla 2. Mecanismos de evasión de NETs por patógenos

Estrategia de evasión	Molécula o proceso involucrado	Microorganismo	Efecto	Referencia
Degradación	Nuc	<i>Staphylococcus aureus</i>	Degrada ADN de nucleótidos a mononucleótidos	[79]
	Sda1	<i>Streptococcus</i> Grupo A	Evita el reconocimiento de TLR9 Evita el reconocimiento por fagocitos	[80]
	EndA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Degrada estructura de NETs	[81]
	Dns y Xds	<i>Vibrio cholerae</i>	Degrada NETs y utiliza el ADN como fuente de nutrientes	[82]
Resistencia	Cápsula	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Evita el reconocimiento Promueve la sobrevivencia dentro de NETs	[83]
	Biopelícula	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacterias mucosas resisten a NETs	[84]
	Toxina adenilato ciclasa	<i>Bordetella pertussis</i>	Inhibe el estallido respiratorio Previene la migración de gránulos	[85]
	Streptolisina O	<i>Streptococcus</i> Grupo A	Previene la liberación de NE e IL-8	[80]
Supresión/ Inhibición	Eap	<i>S. aureus</i>	Limita la actividad de proteasas de serina de neutrófilo	[86]
	Elastasa	<i>P. aeruginosa</i>	Degrada proteínas granulares	[87]
	RodA	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Promueve el enmascaramiento de componentes del hongo	[88]

A pesar de que ya se han descrito estos mecanismos en microorganismos, aún existe poca información relacionada a la inhibición o degradación de estas trampas extracelulares por parte de otros microorganismos patógenos, inclusive se desconoce el mecanismo completo de algunas vías inhibidas en la generación de NETs.

1.7 *Trichinella spiralis*

Los helmintos causan infecciones que inducen inmunidad tipo Th2 caracterizada por una producción de citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-21, IL-33 e IgE, incluyendo una movilización de granulocitos como eosinófilos, basófilos y mastocitos [89].

T. spiralis es el nematodo responsable de la trichinellosis, causando cerca de 10,000 infecciones en humanos por año a nivel mundial. El género *Trichinella* incluye 8 especies, *T. spiralis* es la especie más común que puede infectar a mamíferos, siendo los humanos más susceptibles a la infección. Puede establecerse en músculo esquelético del hospedero por periodos largos, sobrevivir hasta el término de vida de roedores, mientras que en humanos puede permanecer por años [90]. Los adultos hembra llegan a medir 1.4-4 mm, los adultos macho 1.4-1.8 mm y la larva muscular (LM) aproximadamente 1 mm [91]. Presenta un ciclo de vida completando sus tres etapas de desarrollo en un solo hospedero, la infección comienza con la ingesta de carne infectada cruda o poco cocida conteniendo la LM, las cuales son liberadas después de la digestión de la carne para atravesar un proceso de maduración y convertirse en adulto. La etapa de reproducción ocurre en intestino delgado, en este sitio las LM atraviesan cuatro mudas hasta convertirse en adultos, los gusanos macho y hembra se aparean y liberan larvas recién nacidas (NBL, por

sus siglas en inglés). Cada adulto hembra produce aproximadamente 1,500 NBL, estas se diseminan a través del torrente sanguíneo hasta situarse en el músculo esquelético, penetran en el sarcolema de las fibras para madurar, se enrollan y encapsulan en una célula nodriza, lugar inmunológicamente privilegiado compuesta de colágeno y componentes celulares que le proporciona nutrientes y oxígeno, posterior a un proceso de 20 días se convierten en LM [89, 91, 92]. En la figura 4 se describe el ciclo de vida de *T. spiralis*.

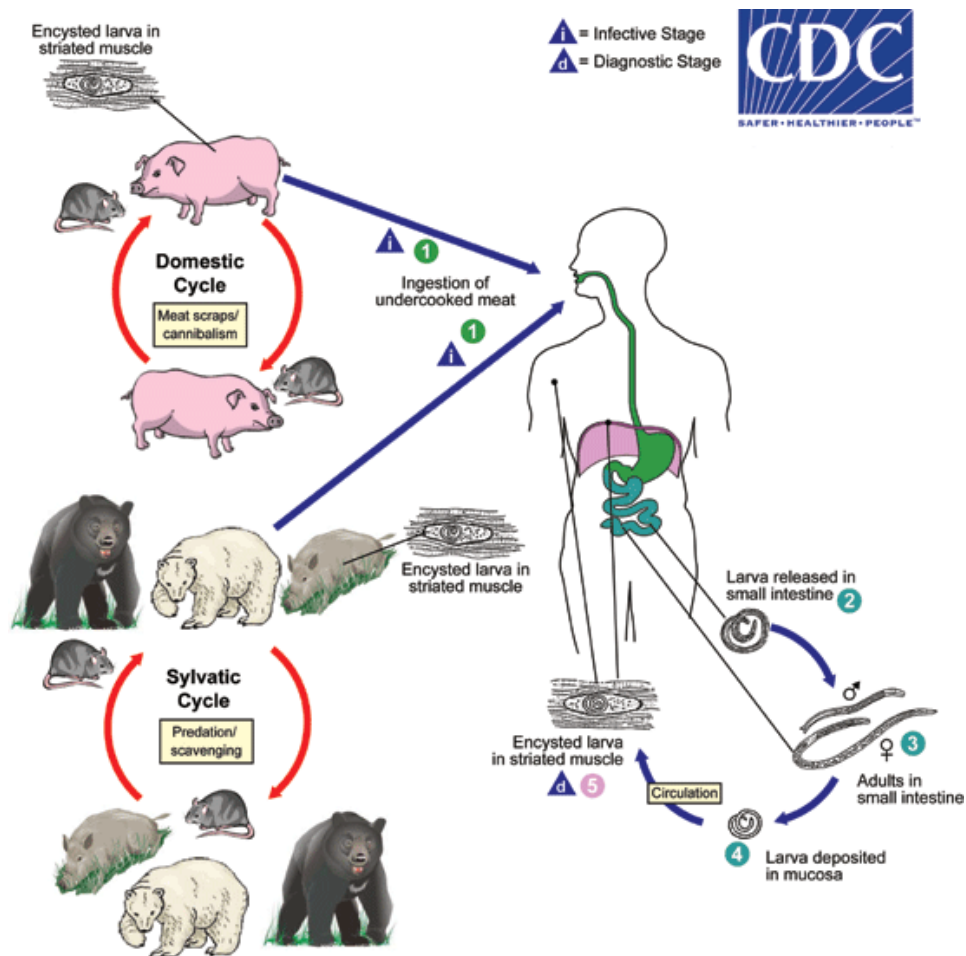


Figura 4. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*. La trichinellosis es causada por ingestión de carne poco cocida o cruda que contienen larvas enquistadas. Imagen tomada de <https://www.cdc.gov/parasites/trichinellosis/biology.html>

La enfermedad se clasifica en dos fases, la primera fase denominada fase entérica comienza posterior a la ingesta de carne contaminada y se caracteriza por náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal superior debido a la invasión de la mucosa intestinal por LM y adultos, suele tener una duración de dos a seis semanas disminuyendo los síntomas, la segunda fase denominada fase sistémica comienza una vez que las larvas entran a circulación linfática y sanguínea, alcanzando el músculo provocando síntomas sistémicos como mialgias, inflamación, así como, fiebre, sudoración y debilidad muscular [91, 93, 94].

La fase entérica de la infección por *T. spiralis* induce una respuesta inmune temprana caracterizada por la inducción de una respuesta de tipo Th1, a medida que se produce la diseminación de las NBL predomina la respuesta de tipo Th2, responsable de la expulsión del parásito. En la etapa entérica se observa un incremento de IL-12, IL-1 β , IFN- γ y TNF- α . Además, la exposición a *T. spiralis* activa los leucocitos T CD4⁺, que conduce a la secreción de IL-10, IL-4, polarizando la respuesta inmune al tipo Th2 que, a su vez, produce IL-4, IL-5 e IL-13 para estimular la síntesis de IgE y desencadenar reacciones de hipersensibilidad inmediata lo que promueve la expulsión de *T. spiralis* del intestino [95].

Durante las etapas de vida de *T. spiralis*, proteínas de superficie y los productos o antígenos excretorios-secretorios (E-S) son involucrados en la respuesta inflamatoria; estos antígenos son de interés, debido a que provocan una respuesta inmune protectora y son útiles en el diagnóstico de la trichinellosis [96]. Los antígenos E-S son un grupo de proteínas secretadas por los gránulos del esticosoma al inicio de la fase intestinal y en la fase muscular y se han caracterizado como cistatinas, serpinas, glucanos, mucinas, lectinas u homólogos de citocinas que pueden involucrarse en el procesamiento de antígenos

(Tabla 3). Los E-S pueden actuar de múltiples maneras, reducen la inflamación causada por la invasión del musculo, modulan la respuesta inmune lo que protege al parásito como al hospedero y están involucrados en el proceso biológico de la célula nodriza [97].

Tabla 3. Proteínas E-S de *T. spiralis*

Proteína E-S	Función	Peso Molecular	Referencia
Glicoproteína 53 kda	Maduración de células dendríticas Regula el balance Th1/Th2	53 kDa	[98]
Proteína similar a cistatina	Induce respuesta mixta Th1/Th2	~46 kDa	[99]
Paramiosina	Diferenciación de células T reguladoras Interferencia con activación del complemento	102 kDa	[100]
Glicoproteína Ts87	Estimula la respuesta Th1/Th2	38 kDa	[101]
Calreticulina	Reduce la activación mediada por C1q de la vía clásica del complemento	45.5 kDa	[102]
Cistatina	Suprime citocinas proinflamatorias e interfiere con el procesamiento de antígenos a través de la depleción de expresión de MHC clase II	13.2 kDa	[103]
Glutación-S-transferasa	Participa en la regulación de maduración y función de células dendríticas e induce la respuesta de tipo Th2	30.8 kDa	[104]

El grupo particular de glicoproteínas de LM, llamado grupo 1 de larvas de *T. spiralis* o TSL-1, interactúan con las células inmunes del hospedero induciendo una respuesta inflamatoria de protección hacia la reinfección y a su vez, permiten la supervivencia del

nematodo en el organismo [105]. Los antígenos E-S desarrollan un importante papel inmunomodulador interfiriendo con la respuesta inmune del hospedero [106]. Pueden interactuar con células musculares, enterocitos, y células inmunes como macrófagos y células dendríticas, desencadenando respuestas Th2 y antiinflamatorias con la activación de las células T reguladoras, o bien, suprimiendo la producción de citocinas proinflamatorias [98, 105, 107].

Los parásitos co-evolucionan con los mamíferos y desarrollan estrategias de activación de la respuesta Th2 y de células T reguladoras para sobrevivir en el hospedero. Se ha demostrado que la secreción de proteínas biofuncionales dentro de los antígenos E-S les permite regular la respuesta inmune local o sistémica del hospedero, tal es el caso de antígenos E-S de *Brugia malayi* que están involucrados en la atenuación del desarrollo de diabetes tipo 1 con disminución de citocinas proinflamatorias y aumento de la citocina IL-10 en modelo murino [108, 109].

2. ANTECEDENTES

Las NETs son consideradas un potente mecanismo de defensa del sistema inmune para combatir enfermedades infecciosas, sin embargo, un defecto en la producción o bien, una desregulación del proceso conduce a patologías graves que pueden generar autoinmunidad. En diversos estudios se ha demostrado que una formación excesiva de redes y su consiguiente deficiente eliminación contribuyen a la inflamación. Por lo que, una regulación del proceso de NETosis puede ser punto clave en las alteraciones patológicas.

A pesar de que las redes de neutrófilos son efectivas contra una gran variedad de microorganismos, ciertos patógenos pueden ser resistentes a la eliminación por estas estructuras. Chang *et al.*, estudiaron la DNasa A (SpnA) de *S. pyogenes*, demostrando que la nucleasa le confiere a la bacteria una evasión de la respuesta inmune por degradación del ADN asociado a los NETs, incrementando su supervivencia [110]. Por otro lado, Beiter *et al.*, estudiaron la enzima EndA una endonucleasa producida por *S. pneumoniae*, agente causal más común de la neumonía adquirida en la comunidad, encontrando que dicha enzima le permite degradar eficientemente el ADN extracelular y escapar de las NETs [81]. *Pseudomonas aeruginosa*, es un patógeno que ha desarrollado un mecanismo para atenuar la producción de NETs. Este microorganismo expresa en su superficie ácidos siálicos, capaces de unirse e inducir una cascada de señalización en el neutrófilo, activando Siglec-9, el cual suprime el estallido respiratorio y por lo tanto la formación de NETs. Se ha demostrado que cepas de *P. aeruginosa* que carecen de estos ácidos conducen a una mayor producción de NETs [111].

Las NETs representan un papel importante en la defensa contra los parásitos, las fibras pueden capturar y restringir a los parásitos para eliminarlos [112]. Se ha descrito que en parásitos de mayor tamaño la fagocitosis no es un mecanismo eficaz debido a que los parásitos no son engullidos, por lo que, se ha sugerido que la NETosis desempeña un papel fundamental contra nemátodos y helmintos [113]. Como ya se ha visto, la DNasa es un importante factor de virulencia que le permite a otros microorganismos escapar de la muerte por las trampas extracelulares y por lo tanto permite que la enfermedad progrese. La enzima también se ha detectado en los antígenos E-S y en proteínas de superficie de *T. spiralis* de sus tres etapas de vida. TsDNasa II de *T. spiralis* es metabólicamente activa y puede contrarrestar las trampas extracelulares que consisten en ADN y proteasas durante una infección por *T. spiralis*. La neutralización de la actividad de la DNasa puede mejorar las capacidades de adhesión de células del sistema inmune [114].

Los antígenos E-S de parásitos desempeñan un papel importante en la modulación de la respuesta inmune ocasionando un fenotipo de respuesta de tipo Th2, esenciales para su supervivencia al inhibir la reacción inflamatoria y promover la apoptosis de células efectoras [108]. Recientemente, los antígenos E-S se han evaluado como estrategias terapéuticas, debido a que contienen propiedades inmunorreguladoras que suprimen enfermedades inflamatorias [115]. Algunos estudios han demostrado el efecto de los antígenos E-S en el tratamiento de enfermedades autoinmunes en modelos murino, caracterizando moléculas derivadas de los parásitos [116-119].

A pesar de que, ciertos factores de virulencia pueden inhibir o degradar NETs, dichas enzimas secretadas y utilizadas por los microorganismos como mecanismos inhibitorios pueden servir para estudios futuros donde sean utilizadas como tratamiento para diversas enfermedades, aunque los mecanismos de inhibición de NETs no se encuentran completamente elucidados, estudios previos pueden utilizarse como base para seguir evaluando.

3. JUSTIFICACIÓN

Microorganismos patógenos han desarrollado estrategias que les permiten evadir la respuesta inmune del hospedero, como las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). Uno de los mecanismos de evasión es la secreción de proteínas que le permiten degradar, resistir o evadir las NETs, mediante el bloqueo de vías de señalización esenciales para la formación de estas trampas. El conocimiento acerca de estas estrategias, la identificación y caracterización de las proteínas con capacidad inhibitoria podría establecer una alternativa de tratamiento de padecimientos autoinmunes donde la participación de las NETs es significativa para la progresión de la enfermedad.

Por lo que, en la presente investigación se pretende determinar la capacidad inhibitoria de proteínas secretadas por *Trichinella spiralis*, hacia la formación de trampas extracelulares de neutrófilo.

4. HIPÓTESIS

Proteínas secretadas por *Trichinella spiralis* inhiben la formación de trampas extracelulares de neutrófilos, mediante el bloqueo de vías de señalización intracelular, sin afectar su capacidad antimicrobiana (quimiotaxis, fagocitosis, ROS y degranulación).

5. OBJETIVOS

Aislar la fracción proteica secretada por *Trichinella spiralis* con capacidad inhibitoria de la formación de trampas extracelulares de neutrófilos, así como analizar las vías de señalización intracelular implicadas en la inhibición de NETs.

5.1 Específicos

- 5.1.1 Evaluar los antígenos excretos-secretos (E-S) de *T. spiralis* en la formación de NETs y actividades antimicrobianas.
- 5.1.2 Evaluar las fracciones proteicas de E-S de *T. spiralis* implicadas en la inhibición de NETs.
- 5.1.3 Analizar las vías de señalización intracelular implicadas en la inhibición de NETs por parte de la fracción proteica secretada por *T. spiralis*

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Área de trabajo

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología y el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRCEI), ambos pertenecientes a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.2 Cepas microbianas y condiciones de cultivo

Se utilizaron aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y *Candida albicans* proporcionadas por el laboratorio de Bacteriología del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas. Cada aislado clínico se mantuvo como cultivo de reserva a -80°C con glicerol (10% v/v). Para la activación de las cepas, a partir de los cultivos de reserva, se tomó una asada y se inoculó en 3 mL de caldo infusión cerebro corazón (ICC) y se incubaron a 37°C por 18-24h.

6.3 Obtención de los antígenos E-S de *Trichinella spiralis*

Para la obtención de los antígenos E-S se empleó la cepa CHN2 de *T. spiralis* donada por el Dr. Romel Hernández Bello, responsable del Laboratorio de Parasitología del CRCEI, la cual fue mantenida en ratones de la cepa BALB/c con 5-6 semanas de edad. Para ello, ratones hembra fueron infectadas vía oral con 400 LM de *T. spiralis* por 30 días. Posteriormente, las LM se recuperaron del músculo esquelético del ratón mediante digestión enzimática con 1% de pepsina-HCl por 3 h a 37°C, seguido de dos lavados con

salina al 85% [120]. En placas de 12 pozos, se sembraron 2500 LM/mL en medio RPMI (Sigma Aldrich, México) suplementado con L-glutamina 2 mM y penicilina-estreptomicina 1 U por 48 h a 37°C con una atmósfera de 5% CO₂. El sobrenadante conteniendo los antígenos E-S fue recolectado, la concentración de proteínas se determinó mediante el kit de ensayo de proteínas BCA Pierce (Thermo Fisher, México) y para observar el perfil de proteínas presentes, una alícuota de 20-30 µg/mL fue separada por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio al 10% (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie (Bio-Rad, USA).

6.4 Purificación de polimorfonucleares

Se recolectó 4 mL de sangre venosa de voluntarios sanos en tubos con EDTA (BD, México). Para obtener las células polimorfonucleares (PMN) realizamos un gradiente con 72, 63, 54, 45% de concentración de Percoll (Thermo Fisher, México). Los PMN fueron obtenidos entre la fase 72% y 63%, se determinó la viabilidad celular mediante la visualización y cuantificación por exclusión del colorante azul tripán en cámara de Neubauer [121]. En la figura 5 se esquematiza el gradiente de separación por densidad para la obtención de PMN.

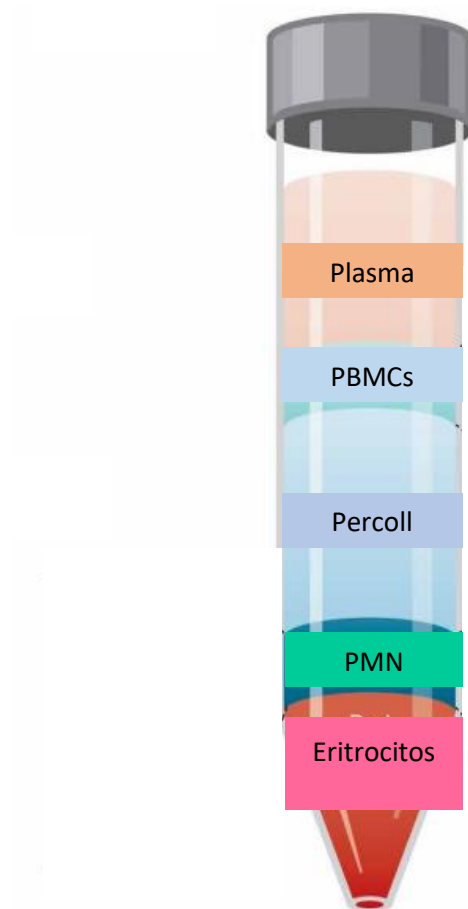


Figura 5. Gradiente obtenido posterior a la separación por densidad de sangre de donadores. PBMCs: célula mononuclear de sangre periférica; PMN: polimorfonucleares.

6.5 Inducción y cuantificación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)

Para la inducción de la formación de NETs se emplearon estímulos químicos, como el PMA, y estímulos fisiológicos, como *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans*. En placas de 24 pozos, fueron sembrados 1×10^5 neutrófilos/pozo en Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) suplementado con Ca^{2+} y Mg^{2+} (Sigma Aldrich, México), por 15 min a 37°C para permitir la adherencia. Las cepas microbianas fueron empleadas a una multiplicidad de

infección (MOI) 100 y el PMA a 10 μ M para inducir la formación de NETs. Los neutrófilos estimulados se incubaron a 37°C por 3 h con 5% CO₂, posteriormente se tiñeron con 5 μ M del colorante Sytox green (Molecular Probes, USA) y se cuantificó la formación de NETs mediante intensidad de fluorescencia en Fluoroskan (Thermo Fisher, USA) y su visualización se realizó mediante microscopía de fluorescencia (Carl Zeiss). Adicionalmente, determinamos la expansión del área nuclear mediante cambios en la morfología y tamaño del núcleo, de 500 células por condición con el software ImageJ [122].

6.6 Efecto de los antígenos E-S de *T. spiralis* en la formación de NETs

Para la evaluación del efecto de los antígenos E-S sobre la formación de NETs, se sembró 1x10⁵ neutrófilos/pozo en microplacas de 24 pozos con diferentes concentraciones de antígenos E-S (5, 10, 25, 50, 100 μ g/ml) por 60 min e incubadas a 37°C. Posteriormente, los neutrófilos fueron estimulados con 5 μ M de PMA y aislados clínicos de *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans*, seguido de la incubación por 3 h a 37°C con 5% CO₂. Finalmente, cada tratamiento fue teñido con 5 μ M de Sytox green para cuantificar la formación de NETs.

6.7 Ensayo de viabilidad celular por exclusión de azul tripán

La evaluación de viabilidad celular posterior a la inducción de NETs se realizó mediante la tinción con azul tripán. Para esto, neutrófilos sin tratamiento, incubados con los antígenos E-S por 3 h, estimulados con PMA por 3 h o pre-incubados con los antígenos

E-S y posteriormente estimulados con PMA por 3 h, se evaluó la viabilidad al término de cada condición por exclusión del colorante azul tripán de al menos 200 células por campo.

6.8 Fraccionamiento de proteínas de antígenos E-S de *T. spiralis*

Para la separación de proteínas presentes en el sobrenadante de cultivo de LM de *T. spiralis* se empleó la técnica de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC, por sus siglas en inglés), y se utilizó una columna de filtración molecular Superdex 200, 10/300 de 24 ml, con intervalo de resolución molecular de 10,000 a 600,000 Da, en un equipo automatizado marca AKTA de General Electric (GE) modelo Avant 25. Como primer paso se realizó la eliminación de partículas del sobrenadante, para este fin se tomó 1 ml del sobrenadante de antígenos E-S de *T. spiralis* y se filtró a través de una membrana de nylon hidrofílica con tamaño de poro de 0.45 μm , el filtrado se recolectó y se cargó 500 μl en el capilar de toma del equipo utilizando una jeringa. La fase móvil se explica con más detalle en la tabla 4. La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 0.5 ml/min. Las fracciones se recolectaron en volúmenes de 600 μl y se almacenaron a -80°C .

Tabla 4. Fase móvil de fraccionamiento de proteínas por exclusión molecular con Superdex 200

Fase A2	Agua (lavado de columna)
Fase A1	PBS (equilibrado de la columna y elución de la muestra)
Fase B2	Etanol 20% en agua (almacenamiento de la columna)

6.9 Ensayo de migración por quimiotaxis

Para este ensayo seguimos la metodología descrita por Justus *et al.* 2010, con breves modificaciones. En microplacas transwell de 24 pozos con filtros de 8 μM (Corning, USA) se sembraron 1×10^6 neutrófilos y se pre-incubaron con los antígenos o la fracción de E-S por 60 min a 37°C y 5% CO_2 . Se añadieron 100 nM de N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLP, Thermo Fisher, USA) en el fondo del pozo, garantizando la formación del gradiente quimioatractivo por tener contacto con el filtro transwell que contenía los neutrófilos, se incubó a 37°C por 3 h y finalmente los filtros se removieron y se observó la migración de los neutrófilos al fondo del pozo utilizando un microscopio invertido Carl Zeiss. Para analizar el número de células que migraron, de cinco a diez campos fueron contados con ayuda del software ImageJ [123]

6.10 Ensayo de fagocitosis

El ensayo se realizó siguiendo la metodología descrita por Novakowski *et al.* 2017, con breves modificaciones. Para esta metodología empleamos *Escherichia coli* ATCC 25922 susceptible a gentamicina (0.05 mg/ml, Sigma Aldrich), que fue crecida hasta la mitad de su fase logarítmica (aproximadamente 3.5 h) a 600 nm en caldo ICC, posteriormente cada cepa se ajustó a 1×10^7 UFC/ml y se opsonizó con suero humano al 20% (v/v) por 30 min a 37°C . Seguido de esto, 1×10^6 neutrófilos fueron sembrados en microplacas de 24 pozos y pre-incubados con los antígenos o la fracción E-S durante 60 min a 37°C , después, la cepa en cuestión fue añadida y se incubó por 30 min para permitir la unión bacteriana e internalización. Posterior, se removió el sobrenadante a los 30, 45 y 60 min y se añadió

0.05 mg/ml de gentamicina por 60 min para eliminar las bacterias no internalizadas. Los neutrófilos se lisaron con tritón X-100 y se realizaron diluciones seriadas que fueron sembradas en agar soya tripticaseína e incubadas a 37°C por 24 h. Finalmente el crecimiento bacteriano fue determinado para obtener las UFC/ml correspondientes al número de bacterias internalizadas.

6.11 Producción de ROS

La producción de ROS se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Bonfim-Mendoca *et al.* 2014. Para este ensayo, 1×10^6 neutrófilos se pre-incubaron con los antígenos o la fracción E-S por 60 min a 37°C, posteriormente las células se estimularon con 5 μ M de PMA por 60 min a 37°C. Por último, los neutrófilos se incubaron con 0.5 μ M de dihidrorodamina 123 (DHR) por 30 min protegidos de la luz, fueron lavados y resuspendidos en PBS, para su lectura por citometría de flujo. La fluorescencia se detectó en el canal FL1, con 30,000 eventos/gate empleando un citómetro de flujo BD Acurri C6 (BD Bio-sciences, USA). Los datos fueron analizados usando el software FlowJo y reportados como porcentaje de intensidad de fluorescencia de células positivas [124].

6.12 Ensayo de degranulación de elastasa y MPO

La liberación de elastasa de neutrófilo y MPO se midió de acuerdo con el protocolo propuesto por Metzler *et al.* 2014 con breves modificaciones. En microplacas de 96 pozos se sembraron 1×10^6 neutrófilos y se pre-incubaron con los antígenos o la fracción E-S por

60 min a 37°C, posterior a la incubación, los neutrófilos se estimularon con 100 nM de fMLP seguido de la adición de 20 nM de sustrato de elastasa I (Sigma aldrich), inmediatamente se realizaron lecturas a 410 nm en un lector de microplacas a 37°C, se obtuvieron lecturas cada hora por 24 h. Para determinar la liberación de MPO, posterior a la pre-incubación con la fracción E-S y la estimulación con fMLP, se añadió 0.1 mg/ml de O-fenilenediamine (Sigma Aldrich) más 50 mM de H₂O₂, inmediatamente se realizaron lecturas a 450 nm en un lector de microplacas a 37°C y se obtuvieron lecturas cada hora por 24 h [125].

6.13 Determinación de la localización de MPO y calprotectina en neutrófilos durante la formación de NETs.

Para evaluar la localización de MPO y calprotectina durante la formación de NETs, realizamos ensayos de inmunofluorescencias. Los neutrófilos se pre-incubaron con los antígenos o la fracción E-S por 60 min a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, las células pre-incubadas fueron estimuladas con PMA y aislados microbianos (*P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans*) durante 3 h a 37°C y 5% CO₂, seguido de una fijación con 4% de paraformaldehído (Sigma Aldrich, México) por 30 min a temperatura ambiente, subsecuentemente, los tratamientos se permeabilizaron con 0.1% de Triton x-100 por 5 minutos y se bloquearon con 10% de suero humano por 30 min. Las células se lavaron con PBS y se incubaron con una dilución 1:200 de anti-mieloperoxidasa (Agilent Technologies, USA) y 1:400 de anti-calprotectina (Abcam, USA) a 4°C por toda la noche. Las células se lavaron con PBS y se incubaron con anticuerpo IgG anti-ratón o anti-conejo

acoplados a Alexa Flúor 568 y 488 (Molecular Probes, USA) por 60 min a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Finalmente, los tratamientos se contra-tiñeron con 5 μ M de Hoechst (Invitrogen, USA) y fijadas con Prolong Gold antifade (Invitrogen, USA). Las imágenes fueron capturadas con microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan en 40X y fueron analizadas con el software ImageJ.

6.14 Evaluación de la activación de PKC

Para este ensayo, evaluamos la activación de PKC. Para este fin se utilizó la técnica de Western blot, como se describe a continuación. Neutrófilos (1×10^6) fueron pre-incubados con 5 μ g/ml de la fracción inhibitoria por 60 min a 37°C, posteriormente se estimularon con 4 μ M de PMA para activar PKC por 3 h a 37°C. Seguido de esto, los neutrófilos fueron lisados con dodecilsulfato sódico (SDS, por sus siglas en inglés) al 10% y cuantificados por el método de Pierce BCA, de 20-30 μ g de proteína fueron separados mediante SDS-PAGE por aproximadamente 90 min, una vez separado el sobrenadante, las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, por sus siglas en inglés) a 20 V por 40 min en condiciones semihúmedas. Una vez trasferidas las proteínas en la membrana PVDF, se realizó el bloqueo de proteínas inespecíficas con caseína comercial al 2.5% por 60 min a temperatura ambiente, posterior a una serie de lavados con solución salina amortiguada con Tween-Tris 1X (TTBS, por sus siglas en inglés) se añadió el anticuerpo anti-PKC alfa (ab32376, Abcam), durante toda la noche, con moderada agitación a 4°C. Después de la incubación con el anticuerpo primario y de una serie de tres lavados con TTBS de 5 min cada lavado, se añadió el

anticuerpo secundario anti-cabra IgG HRP (Thermo Fisher, USA) por 45 min, con moderada agitación a temperatura ambiente. Finalmente, se retiró el anticuerpo secundario, la membrana se lavó tres veces con TTBS por 5 min cada lavado y se colocó en la placa de revelado bajo condiciones de oscuridad y con el kit SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher, USA).

6.15 Evaluación de la citrulinación de Histona H3⁺

La citrulinación de la histona H3⁺ se evaluó mediante la técnica de inmunofluorescencia, descrita anteriormente y como se detalla a continuación. Para esto, neutrófilos se pre-incubaron con 5 µg/ml de la fracción de antígenos E-S por 60 min a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, las células pre-tratadas fueron estimuladas con un moi 100 de *C. albicans* durante 3 h a 37°C y 5% CO₂, seguido de una fijación con 4% de paraformaldehído (Sigma Aldrich, México) por 30 min a temperatura ambiente, subsecuentemente, los tratamientos se permeabilizaron con 0.1% de Triton x-100 por 5 minutos y se bloquearon con 10% de suero humano por 30 min. Las células se lavaron con PBS y se incubaron con una dilución 1:200 de anti-histona H3⁺ (citrulline R2+R8+R17, abcam ab5103) a 4°C por toda la noche. Las células fueron lavadas con PBS y se incubaron con anticuerpo IgG anti-conejo acoplado a Alexa Flúor 568 (Molecular Probes, USA) por 60 min a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Finalmente, los tratamientos se contra-tiñeron con 5 µM de Hoechst y Sytox green (Invitrogen, USA) y montadas con Prolong Gold antifade (Invitrogen, USA). Las imágenes se capturaron con microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan en 40X y se analizaron con el software ImageJ.

6.16 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, los datos del efecto de los antígenos E-S y la fracción E-S se sometieron a un análisis de varianza. Las diferencias de las medias entre tratamientos se compararon usando la Prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). El análisis estadístico y los gráficos se realizaron con el software GraphPad Prisma 8.

7. RESULTADOS

7.1 Obtención de antígenos E-S de *T. spiralis*

Después de realizar la tinción del gel de acrilamida con azul de coomassie, obtuvimos un patrón de bandas que se muestra en la figura 6. Observamos que las proteínas presentes en el sobrenadante de cultivo de *T. spiralis* presentaron peso molecular comprendido entre 10-80 kDa. Se encontraron las proteínas de 43, 45 y 54 kDa, reportadas por otros autores que se encuentran en los antígenos E-S de *T. spiralis* con función inmunomoduladora en el hospedero. Se obtuvo una concentración de proteínas en un rango de 0.8-1.0 mg/ml en el sobrenadante de cultivo de *T. spiralis*.

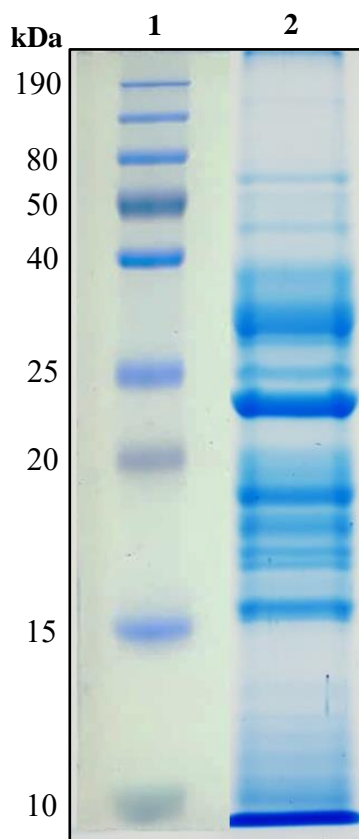


Figura 6. Proteínas presentes en el sobrenadante de cultivo de *T. spiralis*. El sobrenadante de cultivo de LM de *T. spiralis* fue cargado en un gel de acrilamida al 12%. Carril 1: Marcador de peso molecular (kDa), carril 2: Sobrenadante E-S de *T. spiralis*.

7.2 Efecto de los antígenos E-S de *T. spiralis* sobre la formación de trampas extracelulares de neutrófilos

Para este ensayo, los neutrófilos se estimularon con el inductor químico PMA, y estímulos fisiológicos, como *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans*. En general, encontramos que los antígenos E-S de *T. spiralis* inhibieron la liberación de fibras provenientes de neutrófilo correspondientes a cada estímulo.

Se evaluaron diferentes concentraciones de antígenos E-S (5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) para determinar la concentración inhibitoria de la liberación de fibras. En la Figura 7 se muestra el efecto de las concentraciones de antígenos E-S; observamos una reducción de la intensidad de fluorescencia en todas las concentraciones analizadas, por lo que decidimos utilizar 5 $\mu\text{g/ml}$ de antígenos E-S para los experimentos posteriores.

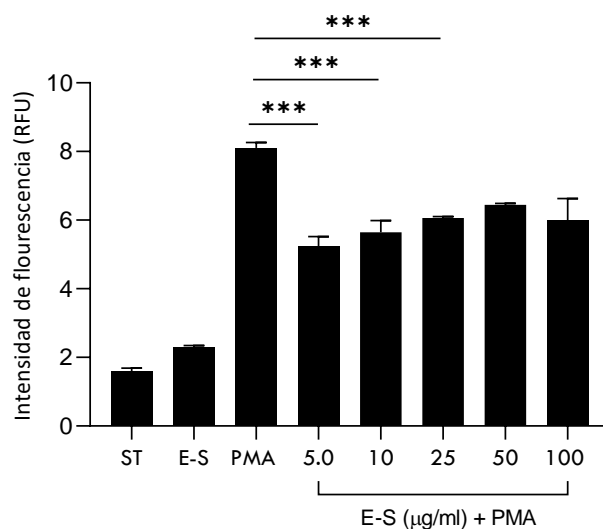
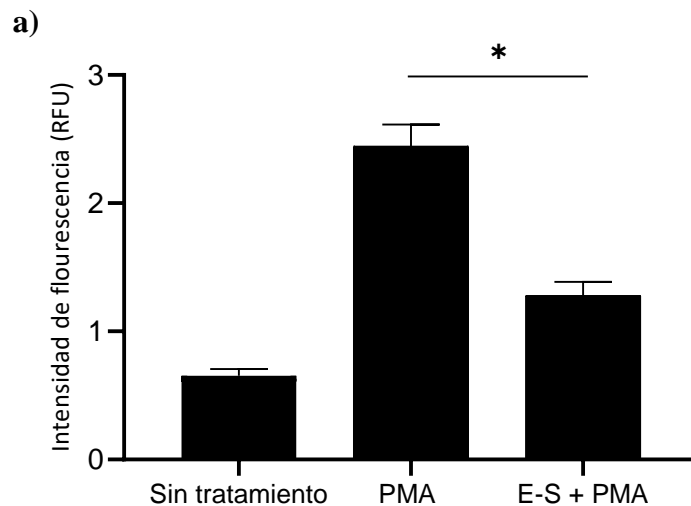


Figura 7. Curva de concentración de antígenos E-S de *T. spiralis* para la inhibición de NETs. Los neutrófilos fueron pre-incubados con diferentes concentraciones de antígenos E-S durante 60 min y luego se estimularon con PMA. ST: Sin tratamiento, PMA: Acetato de forbol 12-miristato 13. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y cada condición se probó por triplicado. * $P < 0.05$

En la figura 8 a, se muestra el efecto de los antígenos E-S sobre la formación de NETs estimuladas con PMA, en la cual se observa una reducción de la intensidad de fluorescencia estadísticamente significativa comparada a neutrófilos que no recibieron el pre-tratamiento de antígenos E-S. Mientras que en los neutrófilos estimulados con PMA la intensidad de fluorescencia incremento en comparación a neutrófilos no tratados. En el inciso b, se muestran microscopias representativas del efecto de los antígenos E-S sobre neutrófilos estimulados con PMA, en los neutrófilos no tratados no se observó las fibras y por el contrario se observaron las células con núcleos multilobulados; neutrófilos estimulados con PMA liberaron las fibras formadas de material nuclear y granular posterior a su estimulación, mientras que los neutrófilos pre-incubados con los antígenos E-S y estimulados con PMA, no se observó la liberación de fibras aunque se observó que el núcleo permaneció en un estado delobulado (pérdida de lóbulos).



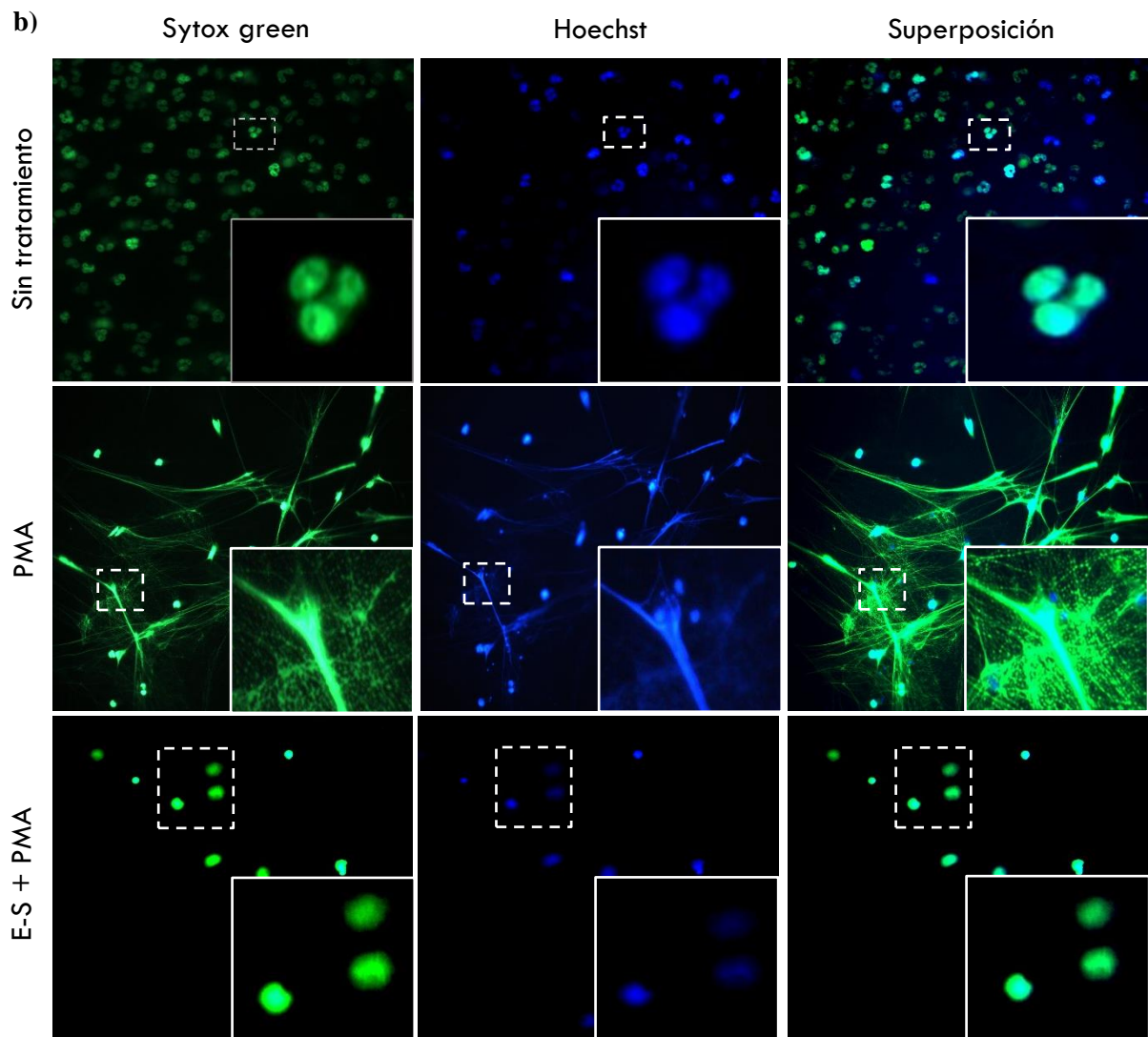


Figura 8. Efecto de antígenos E-S de *T. spiralis* sobre la formación de NETs. a) intensidad de fluorescencia de neutrófilos expuestos a los antígenos E-S y estimulados con PMA, b) microscopías de neutrófilos expuestos a los antígenos E-S. Magnificación 40X. Los neutrófilos fueron teñidos con Sytox green (ADN extracelular) y Hoescht (ADN total). PMA: Acetato de forbol 12-miristato 13. En los recuadros se muestra un acercamiento de la zona indicada con líneas punteadas. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y cada condición se probó por triplicado. * $P < 0.05$

A su vez, evaluamos la viabilidad de los neutrófilos posterior a los diferentes tratamientos, en la figura 9 se muestra que el 86% de los neutrófilos permanecieron viables posterior al tratamiento con E-S, muy similar a número de neutrófilos que no recibieron ningún tratamiento (90% de viabilidad), mientras que neutrófilos estimulados con PMA,

únicamente el 25% son viables y el resto (75%) sufrieron un proceso de muerte celular. El pre-tratamiento con E-S y la posterior estimulación con PMA ocasiona que únicamente el 43% de los neutrófilos sean viables.

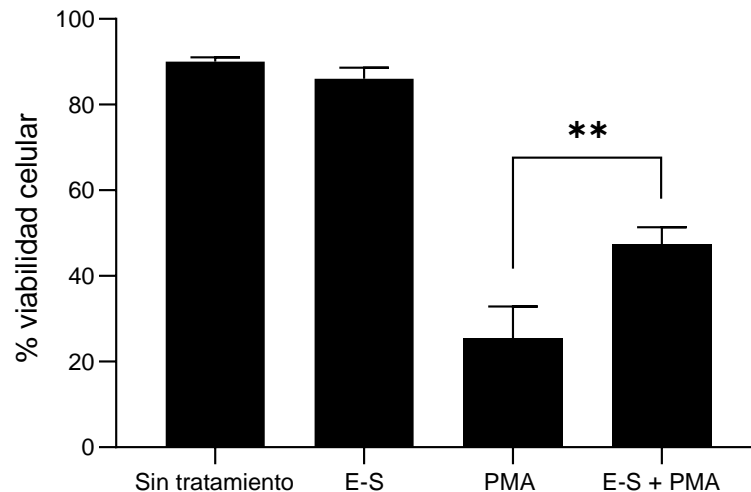
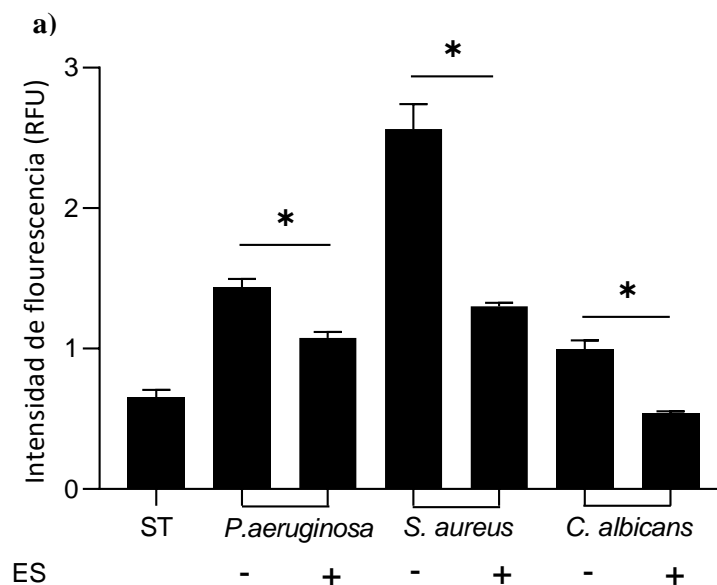


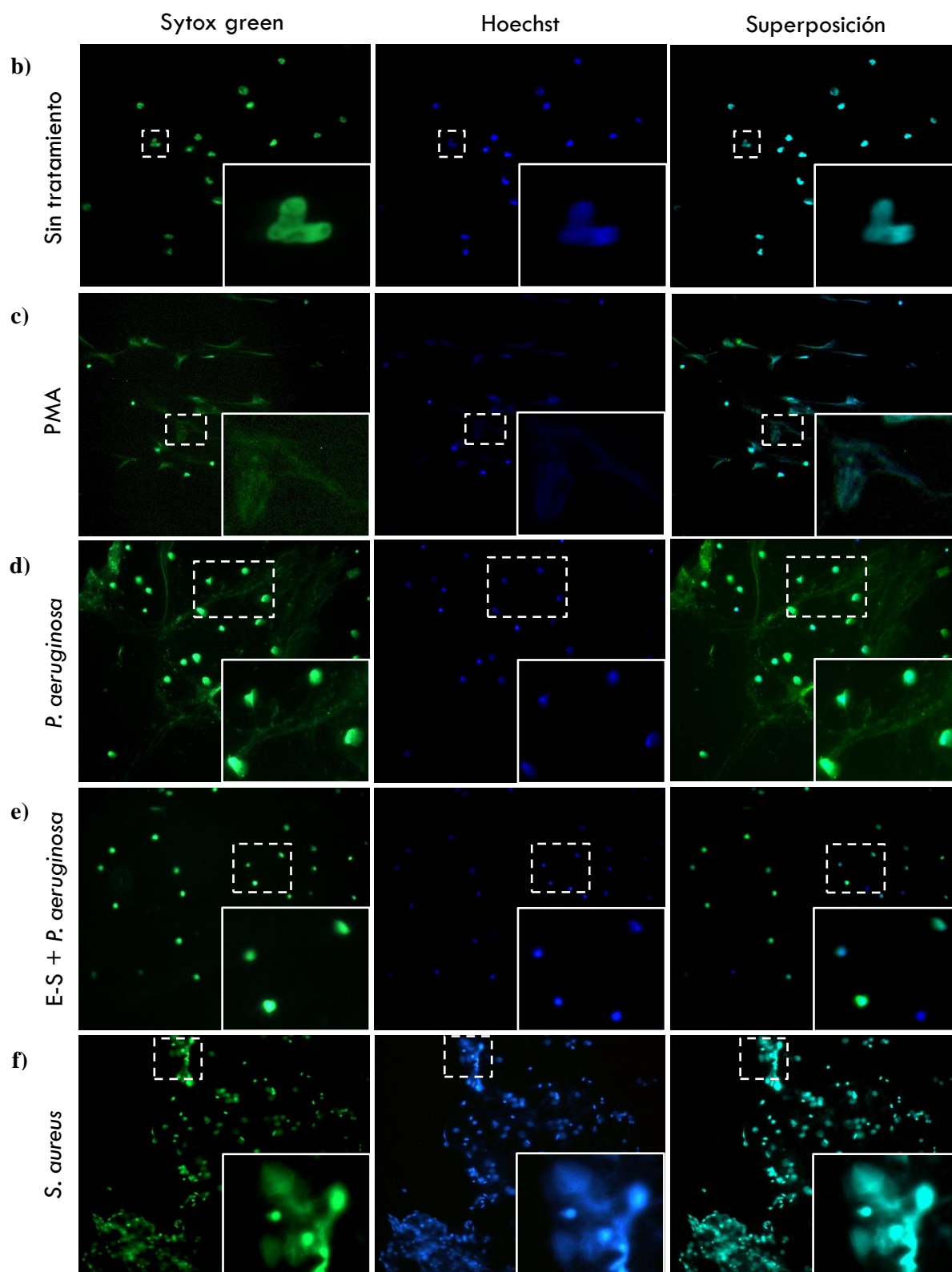
Figura 9. Viabilidad de neutrófilos. La viabilidad celular al término del tiempo de incubación para cada condición se determinó por exclusión con azul tripán. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y cada condición se probó por triplicado. * $P < 0.05$

De igual manera, se evaluó el efecto de los antígenos E-S en la formación de fibras por patógenos microbianos. En la figura 10 a, se muestra la intensidad de fluorescencia de neutrófilos estimulados con *P. aeruginosa*, en la cual encontramos un incremento en la intensidad de fluorescencia, mientras que neutrófilos que fueron previamente incubados con los antígenos E-S se mostró una reducción de la fluorescencia estadísticamente significativa comparada a neutrófilos expuestos únicamente a *P. aeruginosa*. Nuestros datos fueron confirmados mediante microscopías de fluorescencias en las cuales se observó la liberación de fibras cuando los neutrófilos se estimularon con *P. aeruginosa*

(Figura 10 b), mientras que la pre-incubación con antígenos E-S no permitió la liberación de fibras y los neutrófilos permanecieron con el núcleo delobulado (Figura 10 c).

En el caso de los neutrófilos estimulados con *S. aureus*, se observó un aumento de la intensidad de fluorescencia (Figura 10) estadísticamente significativa comparada a los neutrófilos que no recibieron estímulo. En las microscopías de la figura 10 d-e, se muestra la liberación de fibras, por el contrario, en neutrófilos pre-incubados con los antígenos E-S, la intensidad de fluorescencia se observó una reducción, mismo efecto que se observó en las microscopías en las cuales no se observaron las fibras provenientes de neutrófilos. Finalmente, en neutrófilos estimulados con *C. albicans* se observó un incremento en la intensidad de la fluorescencia, la cual se redujo en los neutrófilos pre-tratados con los antígenos E-S, de manera significativa, como se observa en la figura 10, en las microscopías se observa que los neutrófilos estimulados con *C. albicans* liberaron las fibras, mientras que los neutrófilos permanecieron en estado delobulado sin liberar fibras cuando fueron pre-tratados con los antígenos E-S (figura 10 f-g)





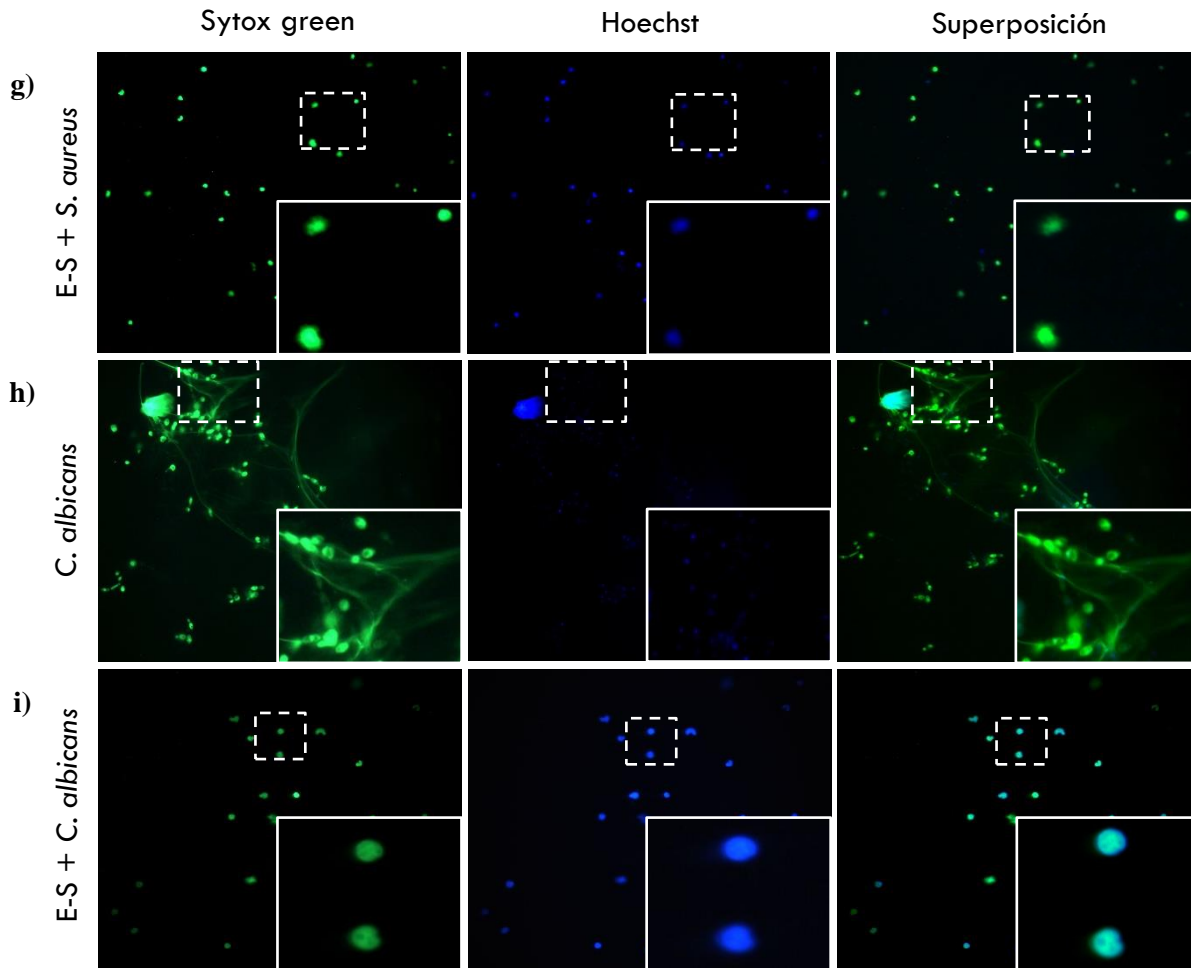


Figura 10. Efecto de los antígenos E-S de sobre las NETs estimuladas por patógenos. a) intensidad de fluorescencia de neutrófilos expuestos a los antígenos E-S y estimulados con *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans*. b-c) microscopías de neutrófilos expuestos a los antígenos E-S y estimulados con *P. aeruginosa*; d-e) microscopías de neutrófilos expuestos a los antígenos E-S y estimulados con *S. aureus*; f-g) microscopías de neutrófilos expuestos a los antígenos E-S y estimulados con *C. albicans*. Magnificación 40X. Los neutrófilos fueron teñidos con Sytox green (ADN extracelular) y Hoescht (ADN total). ST: Sin tratamiento. En los recuadros se muestra un acercamiento de la zona indicada con líneas punteadas. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y cada condición se probó por triplicado. * $P < 0.05$

7.3 Efecto de los antígenos E-S de *T. spiralis* sobre las funciones antimicrobianas de neutrófilos

Determinamos el efecto de los antígenos E-S de *T. spiralis* en la migración por quimiotaxis, fagocitosis, producción de ROS y degranulación de elastasa de neutrófilo y mieloperoxidasa.

7.3.1 Migración por quimiotaxis

La migración por quimiotaxis se analizó mediante la visualización de las células en el fondo del pozo empleando un microscopio invertido. En la figura 11 a) se muestran imágenes de neutrófilos que migraron al fondo del pozo. Neutrófilos sin tratamiento, 9.4% de las células totales migraron al fondo del pozo, el mismo efecto se observó en los neutrófilos incubados con los antígenos E-S. Por otro lado, neutrófilos estimulados con fMLP, 73% de las células totales se encontraron al fondo del pozo, mientras que el 68.5% de los neutrófilos pre-incubados con los antígenos E-S migraron. En la figura 11 b, se expresa la migración de neutrófilos en porcentaje.

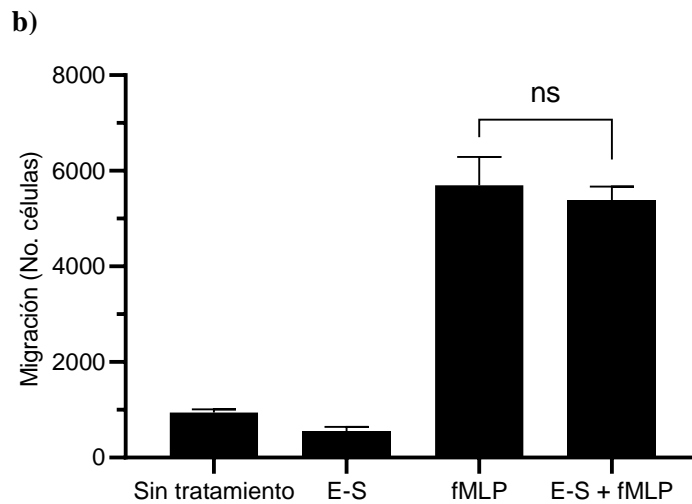
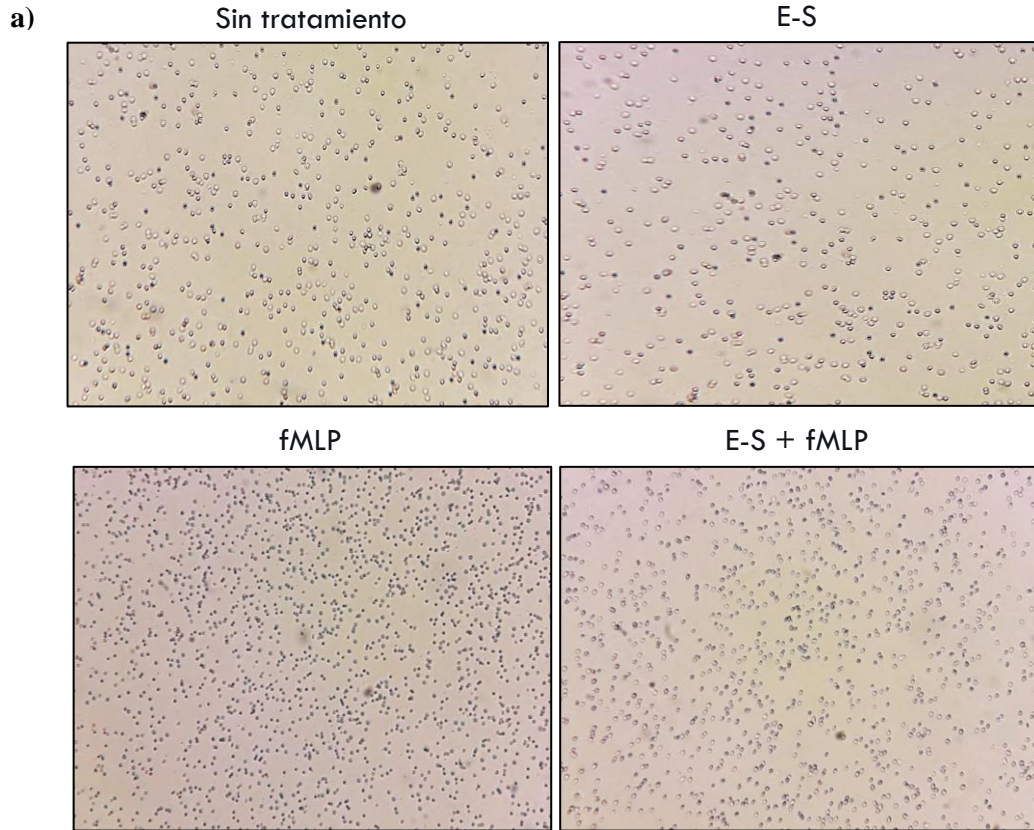


Figura 11. Migración de neutrófilos por quimiotaxis. a) Imágenes representativas de neutrófilos en fondo del pozo. Magnificación 10X. b) Porcentaje de células que migraron. fMLP: N-Formil-Metionina-Leucina-Fenilalanina. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y cada condición se probó por triplicado. * $P < 0.05$

7.3.2 Fagocitosis de neutrófilos

Para la evaluación de la fagocitosis se empleó la cepa *E. coli* ATCC 25922, en la figura 12 se muestra la internalización de *E. coli* a los 30, 45 y 60 min de interacción neutrófilo-bacteria. Encontramos que a los tiempos evaluados los neutrófilos fagocitaron a *E. coli* incrementando la fagocitosis dependiente del tiempo. Al exponer a los neutrófilos previamente con los antígenos E-S, no se observó diferencia significativa en el proceso de destrucción de *E. coli* respecto a neutrófilos sin el pre-tratamiento con E-S, obteniendo con esto que los neutrófilos engullen y eliminaron *E. coli*.

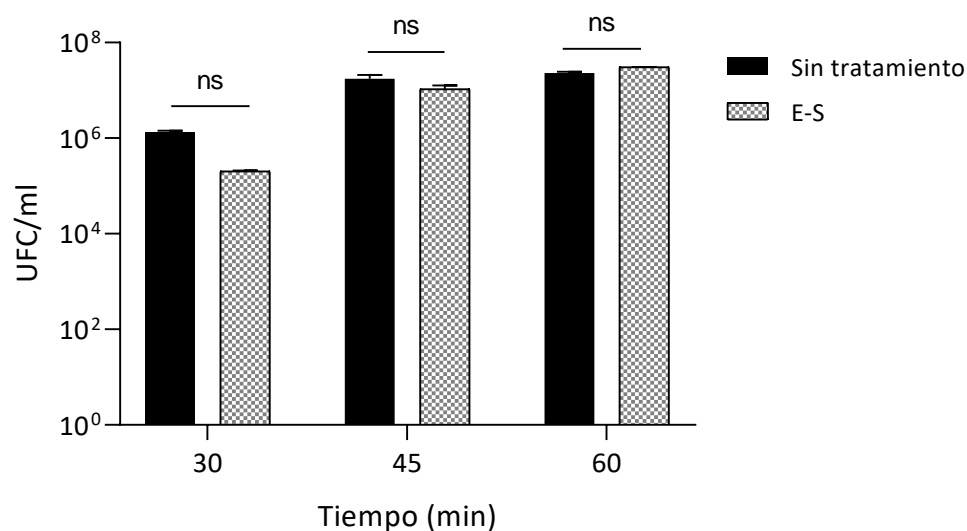
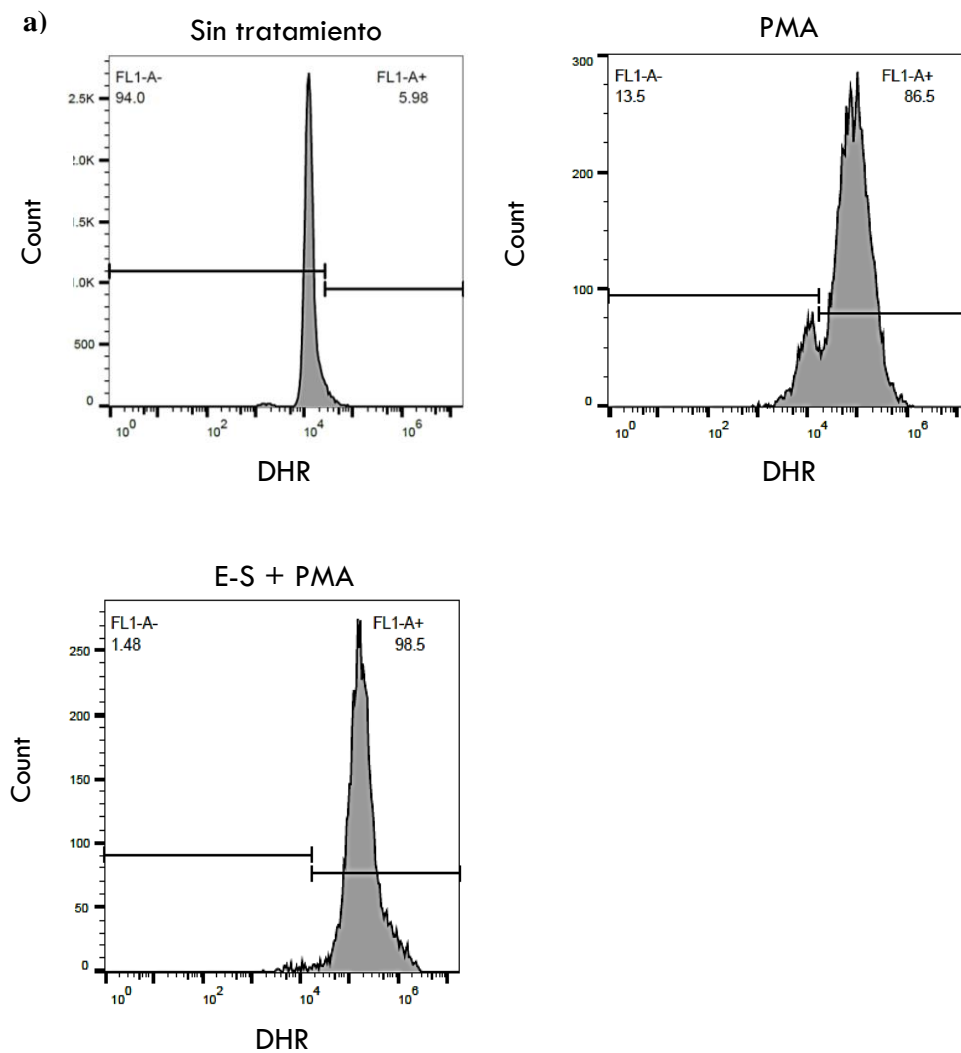


Figura 12. Fagocitosis de *E. coli* a 30, 45 y 60 minutos. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y cada condición se probó por triplicado. * $P < 0.05$

7.3.3 Producción de ROS

La producción de ROS se evaluó mediante la oxidación de DHR por enzimas peroxidasa, como la MPO presente en el neutrófilo. En la Figura 13 a, se muestran los histogramas

obtenidos por citometría de flujo de cada tratamiento. De los neutrófilos sin tratamiento, únicamente el 5.9% fueron positivos a la tinción con DHR, mientras que los neutrófilos que recibieron el estímulo con PMA, el 86.5% de las células llevaron a cabo la producción de ROS. En cuanto al pre-tratamiento de los neutrófilos con los antígenos E-S, el 98.5% de las células produjeron ROS, comparado a los neutrófilos sin el pre-tratamiento con E-S sin mostrar diferencia significativa (Figura 13 b)



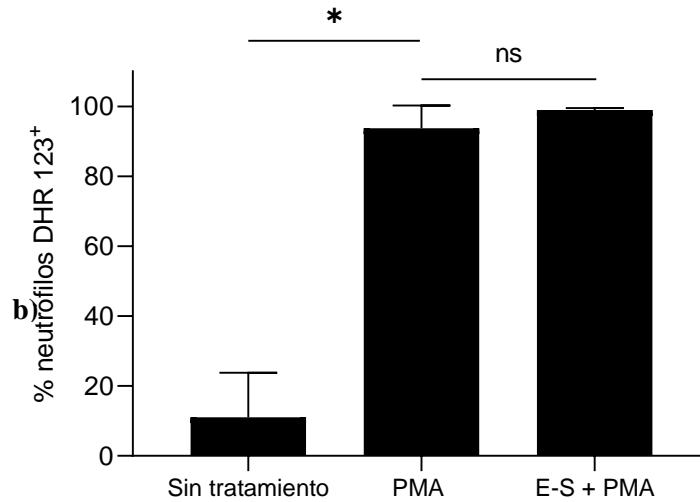


Figura 13. Medición de la producción de ROS por oxidación de DHR. a) Histogramas de Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) por citometría de flujo de la medición de ROS. b) Porcentaje de células positivas para DHR 123⁺ de cada tratamiento. PMA: Acetato de forbol 12-miristato 13; DHR: Dihidrorodamina. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y cada condición se probó por triplicado. * $P < 0.05$

7.3.4 Degranulación de elastasa de neutrófilo y MPO

En cuanto a la degranulación de elastasa, en la figura 14 se muestra que cuando los neutrófilos fueron lisados se evidenció un incremento en la absorbancia a 410 nm, indicativo de liberación de la enzima, con respecto a neutrófilos que no recibieron estímulo alguno. Por otro lado, neutrófilos estimulados con fMLP como inductor de degranulación, mostraron incremento en la absorbancia dependiente del tiempo, mientras que el pre-tratamiento con los antígenos E-S no mostró diferencia significativa en la absorbancia con respecto a los neutrófilos que no fueron pre-tratados, por consiguiente, no afectó la degranulación de elastasa.

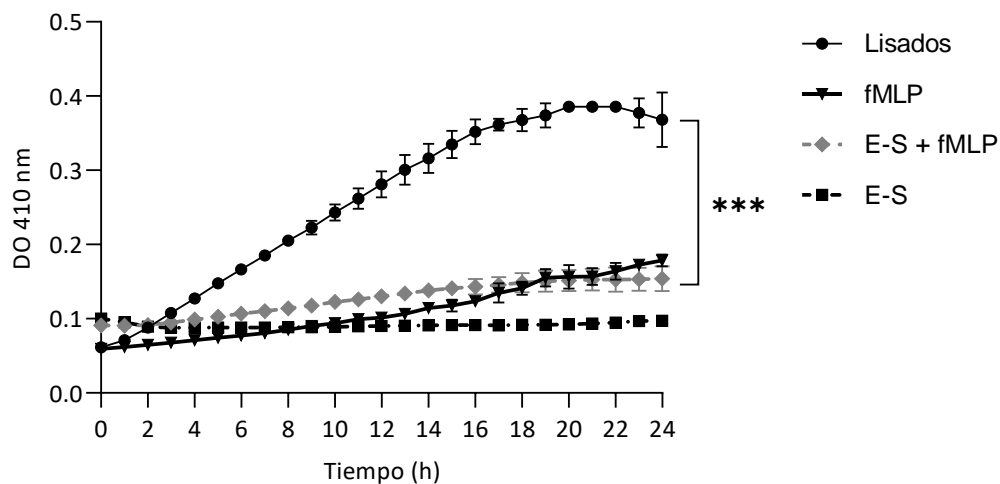


Figura 14. Degranulación de elastasa. Lecturas de densidad óptica a 410 nm. fMLP: N-Formil-Metionina-Leucina-Fenilalanina. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y cada condición se probó por triplicado. $*P < 0.05$

La degranulación de MPO se muestra en la figura 15, en donde al igual que en la cuantificación de liberación de elastasa, empleamos neutrófilos lisados como control para obtener la máxima liberación de la enzima. De neutrófilos estimulados con fMLP se obtuvo un incremento de absorbancia dependiente del tiempo, el efecto se conservó en neutrófilos pre-tratados con los antígenos E-S ya que se mostró un incremento de absorbancia, sin mostrar diferencia significativa.

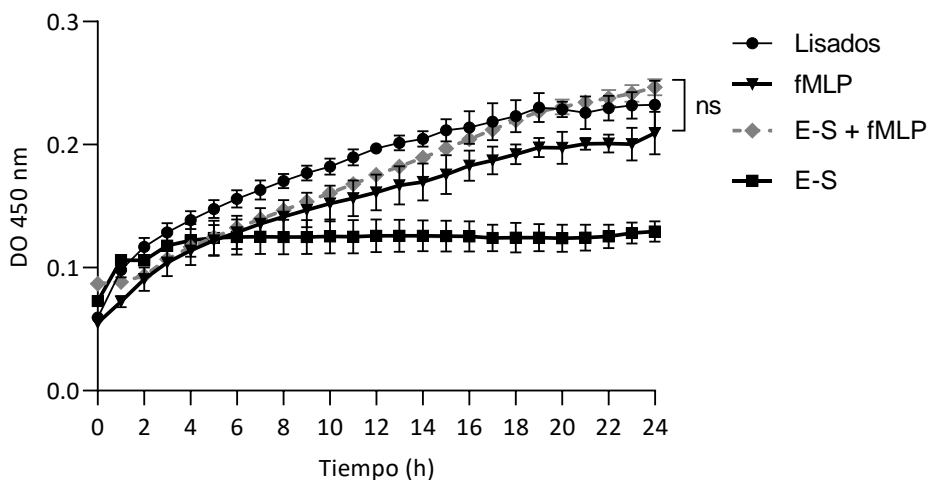


Figura 15. Degranulación de MPO. Lecturas de densidad óptica a 450 nm. fMLP: N-Formil-Metionina-Leucina-Fenilalanina. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y cada condición se probó por triplicado. * $P < 0.05$

7.4 Fraccionamiento de proteínas E-S de *T. spiralis*

Del fraccionamiento de las proteínas del sobrenadante de cultivo de *T. spiralis* que contenía los antígenos E-S se generó el cromatograma que se muestra en la figura 16. Se muestran 4 picos proteicos (señalados con asterisco) obtenidos en 30 fracciones de 500 μ l. Se evaluó el efecto de cada fracción sobre las funciones antimicrobianas de los neutrófilos.

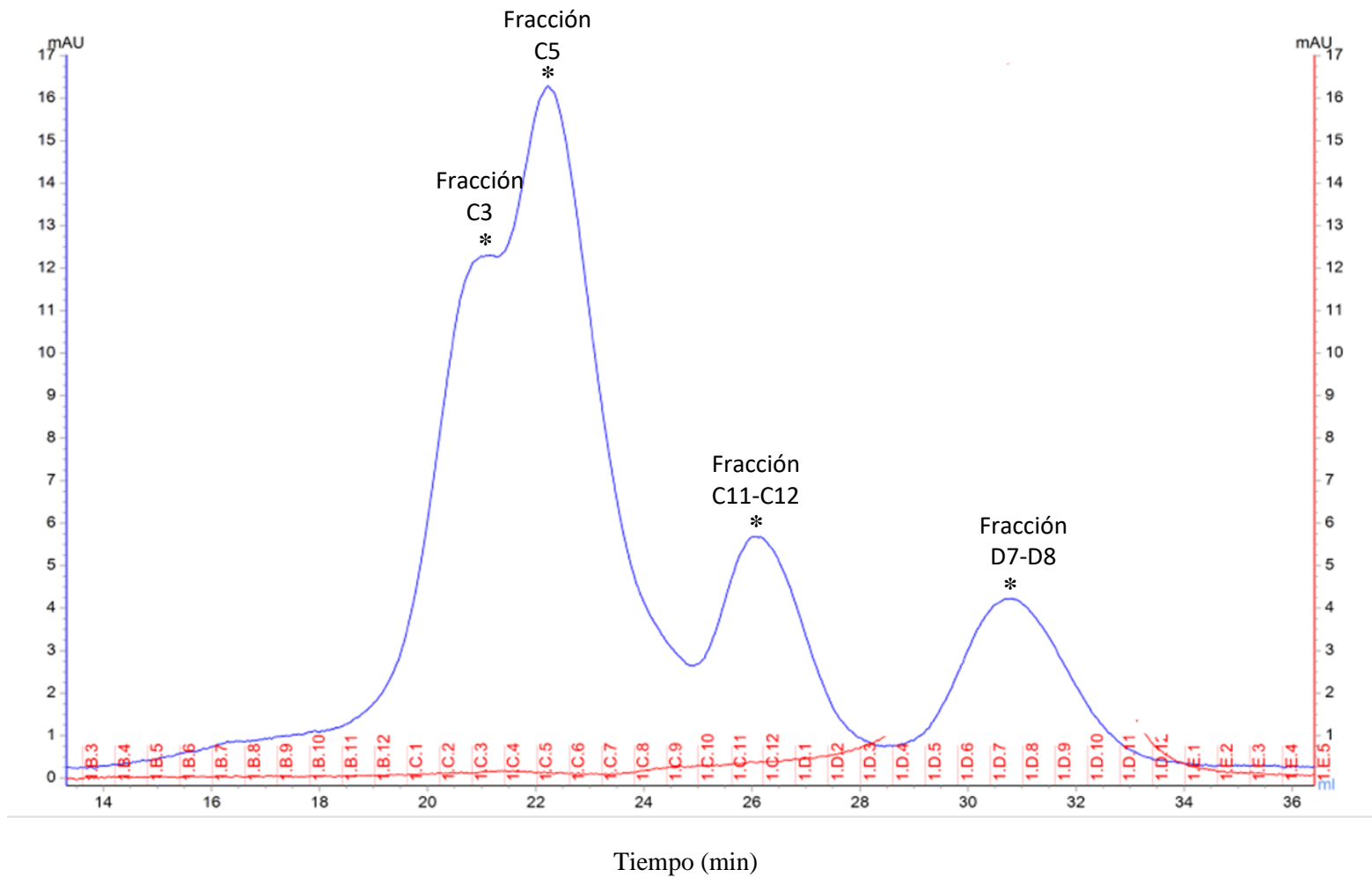


Figura 16. Cromatograma de separación del sobrenadante de cultivo de *T. spiralis* con antígenos E-S por cromatografía de exclusión por tamaño.

7.5 Efecto de las fracciones de antígenos E-S de *T. spiralis* sobre la formación de NETs

Cada fracción fue evaluada respecto a la capacidad de inducir formación de redes por parte de los neutrófilos. Particularmente, la fracción C3 inhibió la liberación de redes. En la figura 17 se muestran las microscopías obtenidas del efecto de la estimulación de neutrófilos con PMA, el pre-tratamiento con la fracción C3, así como de las fracciones C2 y C4, fracciones que no alteraron la liberación de redes.

Obtuvimos que el pre-tratamiento con la fracción C3 no permitió la liberación de redes por parte de neutrófilos que fueron estimulados con PMA, comparado a neutrófilos sin el pre-tratamiento con la fracción C3 donde se observaron fibras después de estimular a los neutrófilos. Los neutrófilos pre-tratados con la fracción C3 a pesar de que no liberaron su contenido en forma de redes al exterior, los lóbulos del núcleo se perdieron, ocupando el núcleo una mayor área del citoplasma y en una fase delobulada. El pre-tratamiento con las fracciones C2 y C4 no alteró la liberación de redes y se observó las fibras comparado a neutrófilos sin el pre-tratamiento.

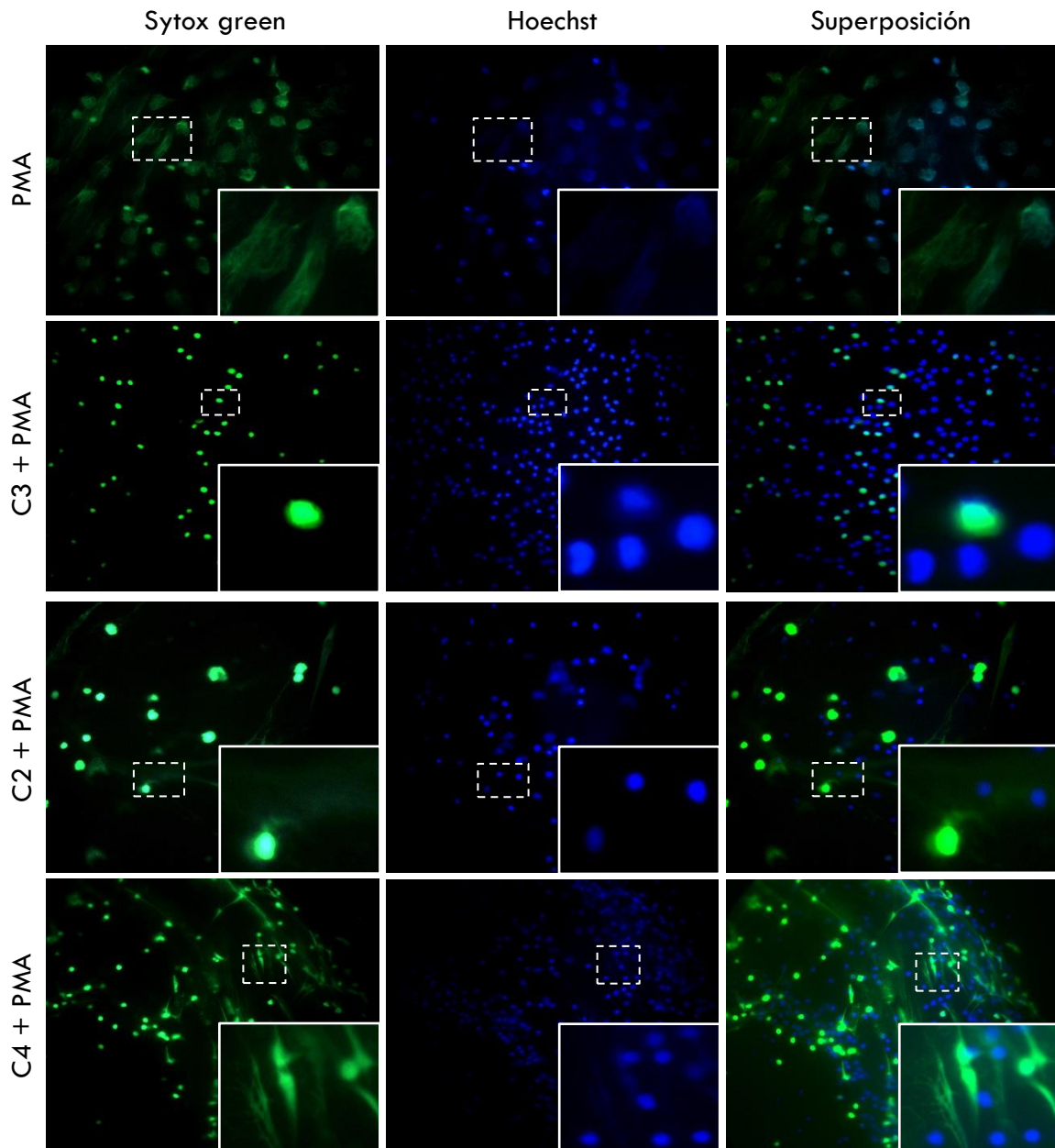


Figura 17. Efecto de las fracciones de antígenos E-S de *T. spiralis* sobre la formación de NETs. Microscopías de neutrófilos expuestos a fracciones E-S y estimulados posteriormente con PMA. Magnificación 40X. Los neutrófilos fueron teñidos con Sytox green (ADN extracelular) y Hoescht (ADN total). PMA: Acetato de forbol 12-miristato 13. En los recuadros se muestra un acercamiento de la zona indicada con líneas punteadas. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y cada condición se probó por triplicado. * $P < 0.05$

La figura 18 nos permite visualizar el área nuclear de células. Los neutrófilos sin tratamiento presentan un área nuclear aproximada de 80 μm^2 , mientras que neutrófilos estimulados con PMA, las fibras liberadas miden más de 120 μm^2 , en las células pre-tratadas con la fracción C3 el tamaño del núcleo fue menor a 100 μm^2 , presentando un tamaño similar a los neutrófilos sin estimular. Por el contrario, el pre-tratamiento de neutrófilos con la fracción C2 y C4, fracciones que no interrumpieron la liberación de fibras, mostró áreas nucleares mayores a 120 μm^2 .

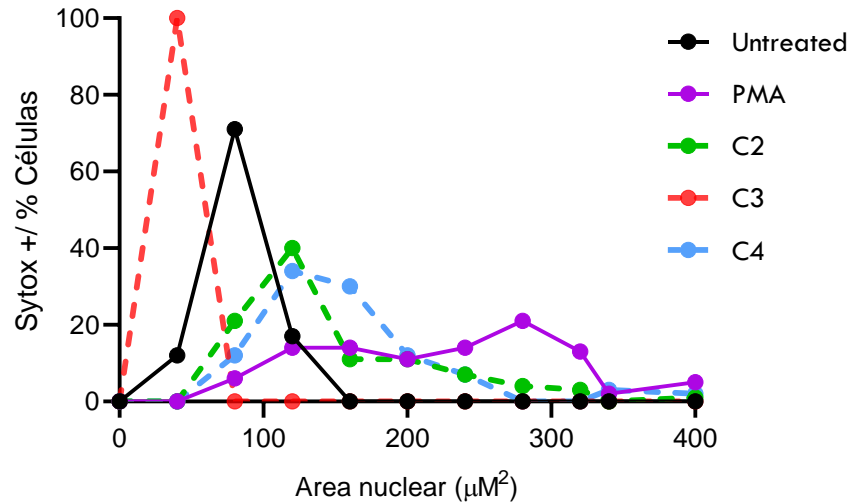


Figura 18. Área nuclear de neutrófilos pre-estimulados con las fracciones de antígenos E-S de *T. spiralis*. Neutrófilos se pre-incubaron con las fracciones de E-S y posteriormente fueron estimulados con PMA. La cuantificación nuclear se realizó con el software ImageJ. PMA: Acetato de forbol 12-miristato 13. C2, C3, C4: Fracción C2, C3 y C4. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y cada condición se probó por triplicado.

Posteriormente, se realizó una inmunofluorescencia marcando a los neutrófilos con anticuerpos anti-mieloperoxidasa y anti-calprotectina como se menciona en la metodología y que se muestra en la figura 19. Los neutrófilos estimulados con PMA, y pre-tratados con las fracciones C2 y C4 y posteriormente estimulados con PMA

desencadenaron la formación de fibras, localizándose MPO y calprotectina en las fibras.

En los neutrófilos pre-tratados con la fracción C3, tanto la MPO como la calprotectina se localizaron en el citoplasma, sin desencadenar la liberación de fibras al exterior.

Una vez determinada la fracción inhibitoria de la liberación de fibras, los ensayos posteriores se realizaron únicamente con la fracción C3.

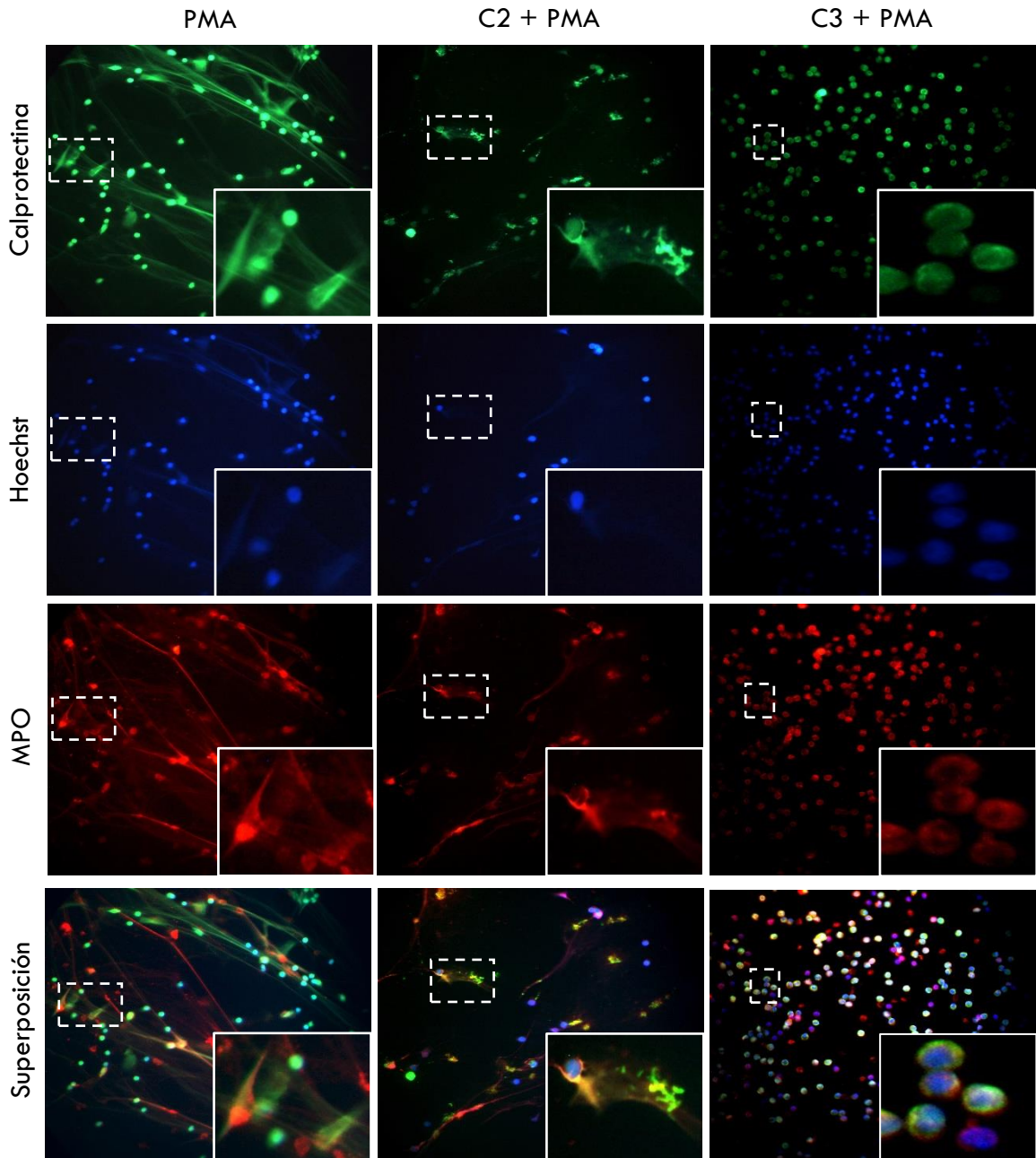


Figura 19. Efecto de las fracciones sobre la formación de NETs. Inmunofluorescencias de neutrófilos expuestos a fracciones E-S y estimulados posteriormente con PMA. Magnificación 40X. Los neutrófilos fueron teñidos con anti-calprotectina (verde), anti-mieloperoxidasa (rojo) y Hoescht (ADN total). PMA: Acetato de forbol 12-miristato 13. MPO: Mieloperoxidasa. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y cada condición se probó por triplicado.

A la par de lo anterior, se realizó una curva de concentración de la fracción C3 que se muestra en la figura 20. Se obtuvo que en la concentración de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de la fracción C3 aún se observó el efecto inhibitorio de la liberación de fibras, mientras que a una concentración menor (1.25 $\mu\text{g/ml}$) el efecto ya no se conservó, observándose que el pretratamiento a esta concentración no alteró la formación y liberación de fibras al exterior. Por lo anterior, se seleccionó la concentración de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de fracción C3 para emplearse en los ensayos posteriores.

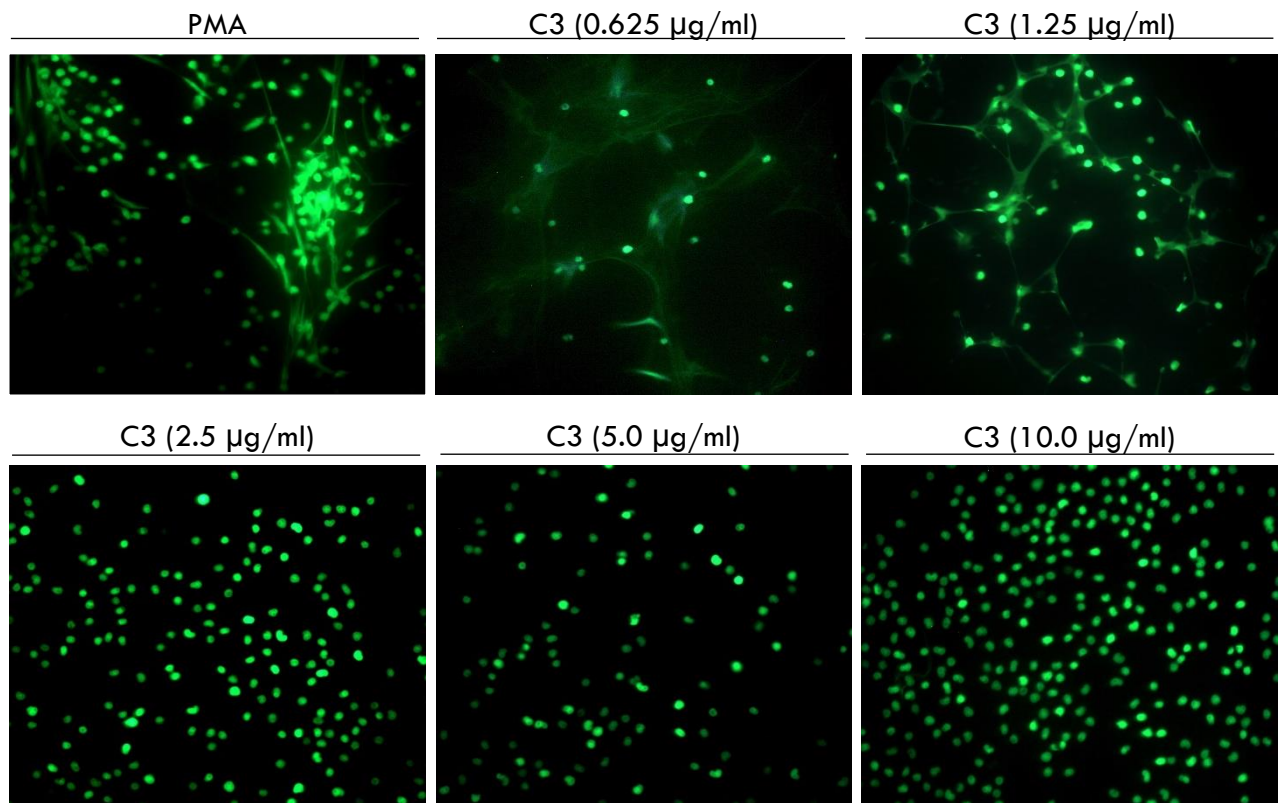


Figura 20. Curva de concentración de las fracciones sobre la formación de NETs. Microscopías de neutrófilos expuestos a la fracción C3 de E-S y estimulados posteriormente con PMA. Magnificación 40X. Los neutrófilos fueron teñidos con sytox green (ADN extracelular). PMA: Acetato de forbol 12-miristato 13. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y cada condición se probó por triplicado.

Posteriormente se evaluó el efecto de la fracción C3 sobre las actividades antimicrobianas, quimiotaxis, fagocitosis, degranulación de elastasa y MPO empleando la concentración menor en la que se obtuvo una inhibición de liberación de fibras.

7.6 Efecto de la fracción inhibitoria sobre la quimiotaxis

La evaluación de la quimiotaxis se analizó siguiendo el protocolo mencionado anteriormente. Encontramos que neutrófilos pre-incubados con la fracción C3 no se alteró la quimiotaxis, al no mostrar diferencia significativa respecto a neutrófilos que no recibieron el pre-tratamiento de la fracción C3. Además, no se encontró diferencia significativa entre el pre-tratamiento con el sobrenadante completo de antígenos E-S y el pre-tratamiento exclusivo con la fracción C3 en la quimiotaxis (Figura 21).

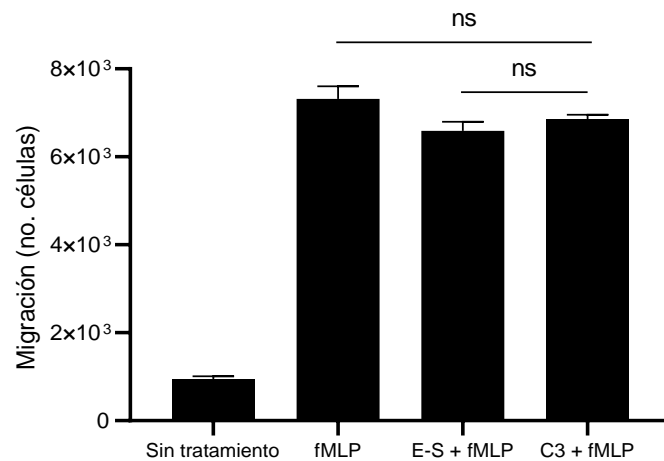


Figura 21. Migración de neutrófilos pre-tratados con la fracción C3. Porcentaje de células que migraron. fMLP: N-Formil-Metionina-Leucina-Fenilalanina; E-S: Excreción-secreción; C3: fracción C3 de E-S. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y cada condición se probó por triplicado. * $P < 0.05$

7.7 Efecto de la fracción inhibitoria sobre la fagocitosis de neutrófilos

De igual manera, la fagocitosis de *E. coli* por parte de neutrófilos se realizó como anteriormente se describió. En la figura 22 se muestra el pre-tratamiento de neutrófilos con la fracción C3 que no afectó la internalización de *E. coli*, al no encontrarse diferencia significativa con los neutrófilos sin el pre-tratamiento con la fracción C3, y sin diferencia significativa en la fagocitosis de *E. coli* con respecto a los neutrófilos tratados con el sobrenadante de antígenos E-S completo.

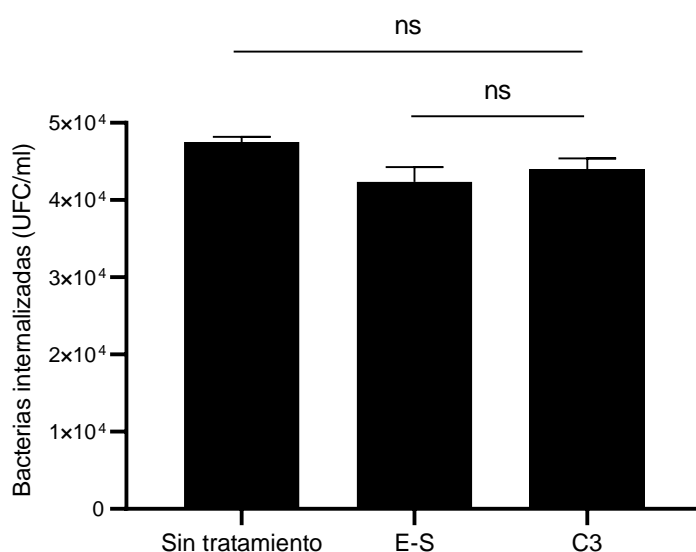


Figura 22. Fagocitosis de *E. coli* por neutrófilos pre-tratados con la fracción C3. C3: Fracción C3. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y cada condición se probó por triplicado. * $P < 0.05$

7.8 Efecto de la fracción inhibitoria sobre la degranulación de elastasa y MPO

Para la evaluación de liberación de elastasa, en la figura 23 se muestra la liberación máxima de elastasa con neutrófilos lisados, mientras que en neutrófilos que fueron estimulados con fMLP se obtuvo un incremento en la absorbancia correspondiente a liberación de elastasa, por otro lado, a pesar de que en los neutrófilos pre-tratados con la fracción C3 también se obtuvo un incremento en la absorbancia fue menor a comparación de los neutrófilos sin el pre-tratamiento aunque sin mostrar diferencia significativa. Además, la degranulación de elastasa de neutrófilos pre-tratados con el sobrenadante completo no mostró diferencia significativa de los pre-tratados con la fracción C3.

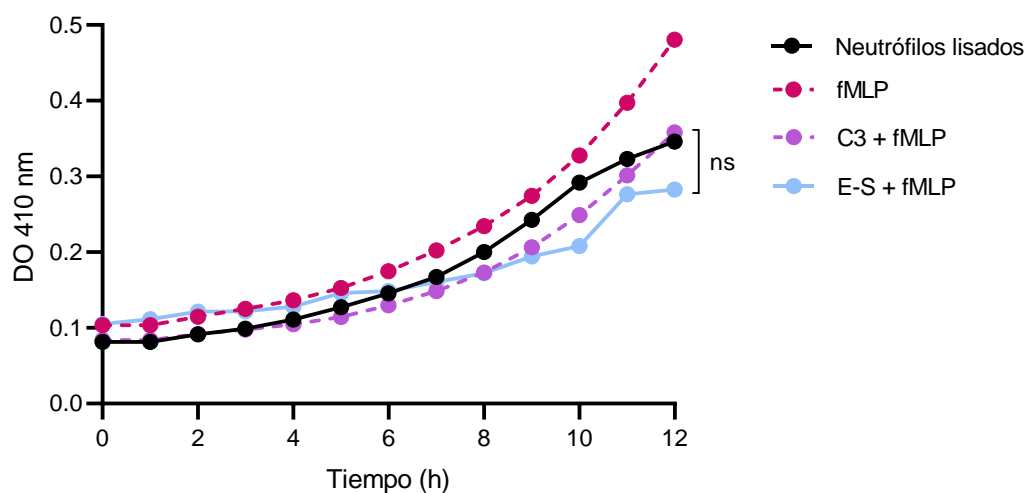


Figura 23. Degranulación de elastasa. Lecturas de densidad óptica a 410 nm. fMLP: N-Formil-Metionina-Leucina-Fenilalanina. C3: Fracción C3. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y cada condición se probó por triplicado. * $P < 0.05$

En cuanto a la degranulación de MPO, la figura 24 muestra el incremento de absorbancia de los neutrófilos estimulados con fMLP correspondiente a liberación de MPO el mismo

efecto se obtuvo en neutrófilos pre-tratados con el sobrenadante de antígenos E-S, así como en neutrófilos pre-tratados con la fracción C3, sin mostrar diferencia significativa.

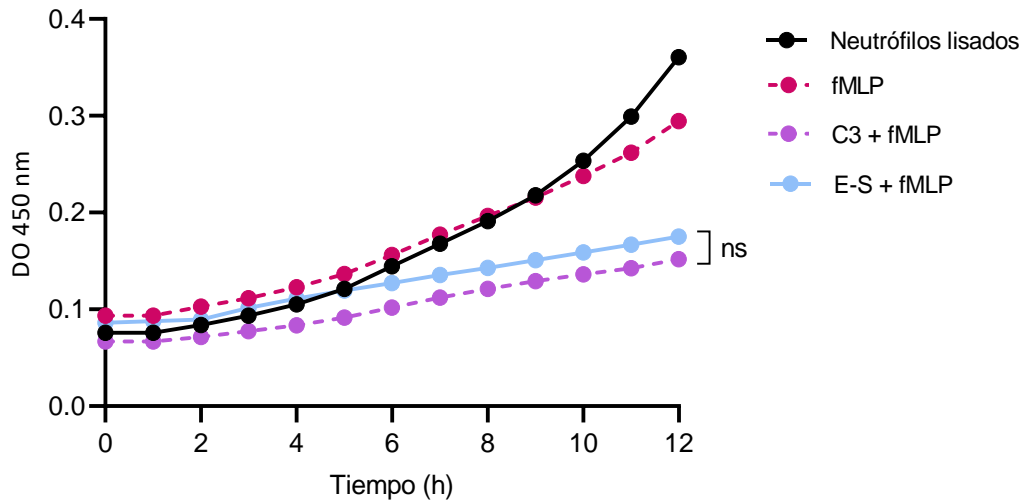


Figura 24. Degranulación de MPO. Lecturas de densidad óptica a 450 nm. fMLP: N-Formil-Metionina-Leucina-Fenilalanina. C3: Fracción C3. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y cada condición se probó por triplicado. * $P < 0.05$

7.9 Implicación de la vía de señalización activada por PKC y citrulinación de histona H3⁺ en neutrófilos pre-tratados con la fracción inhibitoria

Una de las principales vías que se activan en la formación de trampas extracelulares es la vía de raf-MEK-ERK. La estimulación con PMA desencadena la formación de trampas dependiente de ROS, involucrando la activación de PKC, proteína que le precede a la activación de raf-MEK-ERK. La evaluación de la activación de PKC se realizó mediante ensayo de Western Blot empleando PMA como estímulo e inductor de la vía.

En nuestros resultados se muestra que los neutrófilos estimulados con PMA, se obtuvo una banda con peso molecular de 70 kDa correspondiente al peso molecular de la proteína PKC α , de igual manera, en los neutrófilos pre-tratados con la fracción C3 se obtuvo una banda de peso molecular correspondiente a PKC α , lo que sugiere que la vía de señalización que le precede a PKC se encuentra activa aún y con el pre-tratamiento de neutrófilos con la fracción C3 (Figura 25).

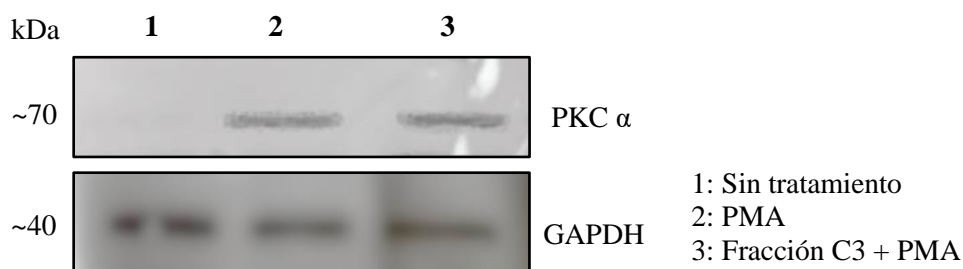


Figura 25. Vía de señalización de Raf-MEK-ERK. Activación de PKC por estimulación de neutrófilos con PMA. PMA: Acetato de forbol 12-miristato 13. GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Por otro lado, se evaluó la citrulinación de la histona H3⁺ por medio de la activación de la enzima PAD-4 por estímulos microbianos para la cual se empleó a *C. albicans*. En la figura 26 se muestran las inmunofluorescencias de neutrófilos sin estímulo, los cuales fueron negativos para la marca de H3⁺ cit, mientras que neutrófilos estimulados con *C. albicans*, mostraron marca de H3⁺ cit en citoplasma y en las fibras liberadas visualizándose la citrulinación por una tinción de color rojo. Del pre-tratamiento con la fracción C3 se obtuvo la marca de citrulinación de H3⁺ en los neutrófilos, a pesar de no liberar las fibras al exterior, indicando un proceso de activación de la vía desencadenada por PAD4.

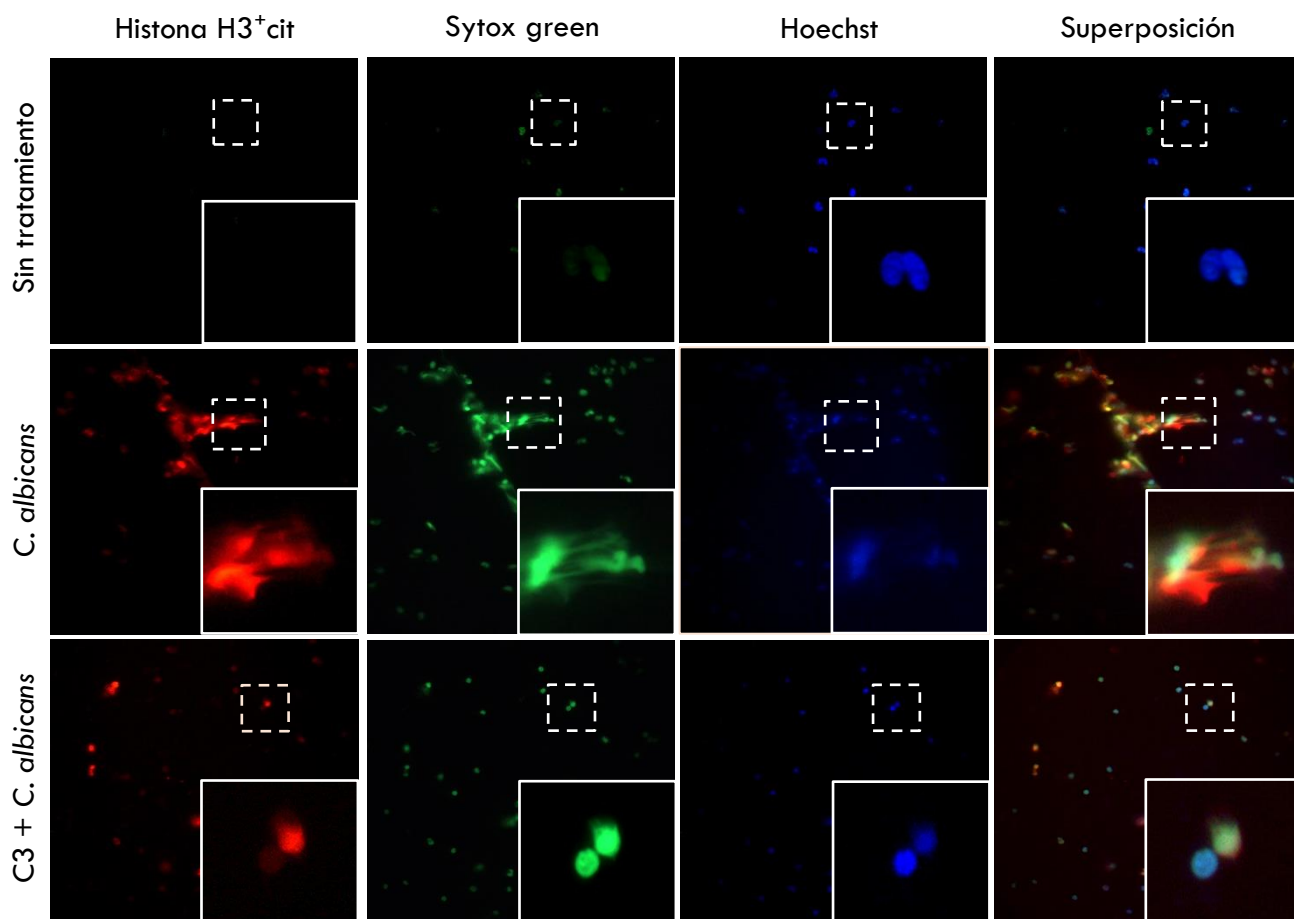


Figura 26. Citrulinación de histona H3⁺. Los neutrófilos fueron teñidos con anti-histona H3⁺, Sytox green (ADN extracelular) y Hoescht (ADN total). En los recuadros se muestra un acercamiento de la zona indicada con líneas punteadas. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y cada condición se probó por triplicado.

7.10 Caracterización de proteínas en fracción C3

La figura 27 muestra la presencia de dos proteínas de peso molecular aproximado de 65 a 70 kDa presentes en la fracción C3, señaladas con flechas.

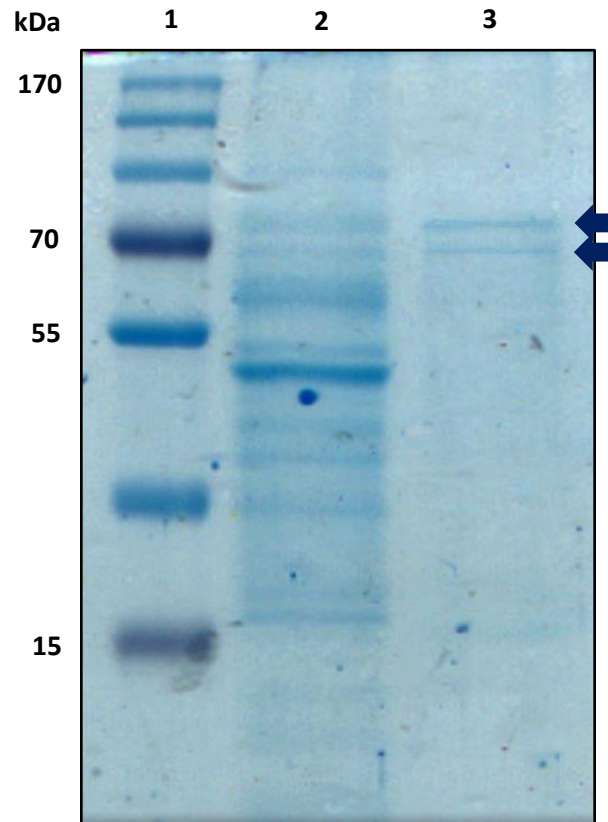


Figura 27: Proteínas presentes en la fracción C3 del sobrenadante de antígenos E-S de *T. spiralis*. La fracción C3 fue cargada en un gel de acrilamida al 12%. Las flechas señalan dos proteínas de peso molecular de 65 y 75 kDa. Carril 1: Marcador de peso molecular (kDa), carril 2: Sobrenadante de antígenos E-S de *T. spiralis*, carril 3: Fracción C3 de E-S de *T. spiralis*.

Seguido de esto, se evaluó si las proteínas presentes en la fracción C3 presentan la capacidad de degradar el material nuclear empleando como control positivo una DNasa.

La figura 28 muestra a neutrófilos incubados con el sobrenadante completo de antígenos E-S, estimulados con PMA y neutrófilos tratados con la fracción C3 posterior al estímulo con PMA. El post-tratamiento de los neutrófilos con la fracción C3 no alteró la formación de fibras, así como su liberación, observándose las fibras teñidas con sytox green en las microscopías de la figura 28, muy similares a las fibras observadas de neutrófilos

estimulados con PMA sin el post-tratamiento de la fracción C3, por el contrario, las fibras liberadas por el estímulo con PMA fueron degradadas por la DNasa encontrándose únicamente a células que no liberaron fibras.

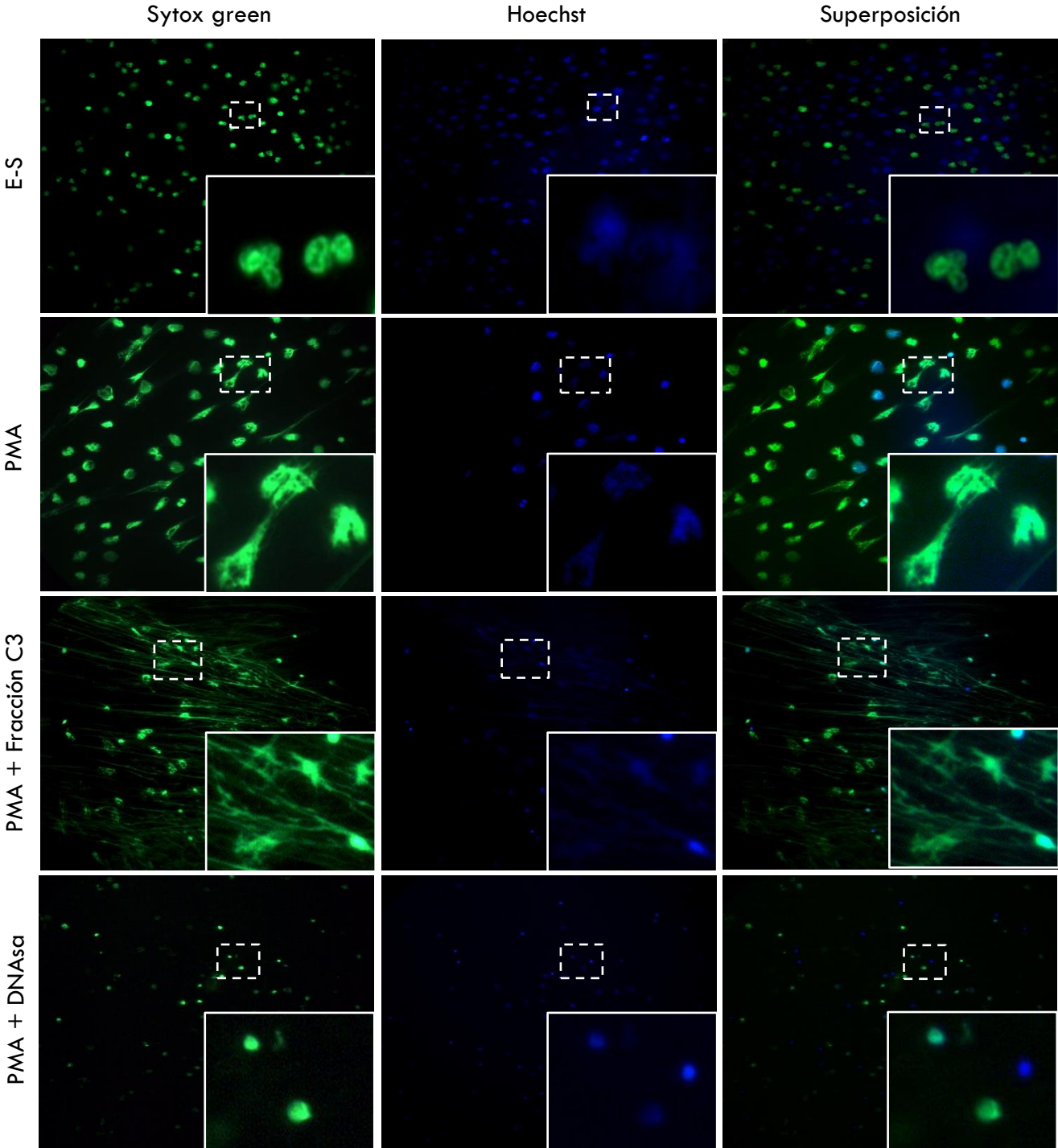


Figura 28. Efecto de la fracción C3 posterior al estímulo de neutrófilos con PMA. Microscopías de neutrófilos estimulados con PMA y posteriormente expuestos a la fracción C3. Control positivo se empleó DNasa. Magnificación 40X. Los neutrófilos fueron teñidos con sytox green (ADN extracelular) y Hoechst (ADN total). PMA: Acetato de forbol 12-miristato 13. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y cada condición se probó por triplicado.

8. DISCUSIÓN

Los neutrófilos son las primeras células del sistema inmune que se activan contra los microorganismos patógenos, son producidos en la médula ósea por un proceso de diferenciación de células madre hematopoyéticas a células progenitoras mieloides. Durante el proceso de infección se estima que la cantidad de neutrófilos aumenta de 1×10^{11} a 1×10^{12} de neutrófilos por día, con una vida media menor a 24 h, incrementándose de dos a tres veces en los tejidos [36, 40]. Al ser la primera defensa contra infecciones microbianas presentan un arsenal de proteínas antimicrobianas, entre ellas enzimas hidrolíticas y ROS, con la capacidad de eliminar a los patógenos [126]. A la par de que realizan sus funciones antimicrobianas, desencadenan mecanismos de muerte celular indispensables para mantener el número de neutrófilos en el organismo en homeostasis [127], debido a que una respuesta inespecífica de neutrófilos podría ocasionar daño al tejido.

La NETosis es un mecanismo de muerte celular en el cual el núcleo aumenta su tamaño y la cromatina se decondensa, liberando hebras de ADN al exterior del neutrófilo que además contienen proteínas citosólicas y granulares [38, 128]. Estas estructuras representan una estrategia de captura, inmovilización y eliminación de patógenos. Diversos microorganismos, así como estructuras bacterianas y/o fúngicas, inducen la activación de neutrófilos que tienen como propósito la formación de NETs con la finalidad de contener la infección microbiana, y su posterior eliminación del microorganismo. A pesar de la cantidad de patógenos que desencadenan las NETs y son susceptibles de su eliminación por parte de estas estructuras, ciertos microorganismos desarrollaron

estrategias para contrarrestar este mecanismo por parte del neutrófilo, resistiendo, degradando o evadiendo las NETs [129, 130].

En nuestro estudio, los neutrófilos fueron estimulados con el inductor químico PMA y con algunos microorganismos provenientes de muestras clínicas, tales como *P. aeruginosa* y *S. aureus*, así como con la levadura *C. albicans*; cada estímulo desencadenó la formación de trampas extracelulares. Sin embargo, la previa exposición a un conjunto de proteínas secretadas por el nemátodo *T. spiralis* evitó la liberación de las fibras formadas al exterior de neutrófilos estimulados. Este grupo de proteínas, denominado antígenos E-S, son además de proteínas, glicanos, lípidos y ácidos nucleicos que afectan el tejido y células del sistema inmune del hospedero, permitiendo que *T. spiralis*, además de otros parásitos, pueda establecerse y sobrevivir en el hospedero por largos periodos. Estos antígenos son secretados en las tres etapas de vida del parásito y desempeñan un papel importante en el ciclo biológico del parásito, facilitando diferentes procesos como la penetración en el hospedero, migración, nutrición, así como la reproducción [131-133].

A pesar de que existen pocos estudios de los antígenos de E-S de *T. spiralis* y su efecto en el sistema inmune, en un estudio *in vitro*, realizados por Bai *et. al*, demostraron que los antígenos E-S presentan un efecto inmunomodulador, debido a que el pre-tratamiento de la línea celular J774A.1 de macrófagos murinos con antígenos E-S de *T. spiralis* suprime de manera significativa la producción de citocinas proinflamatorias, tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12, de macrófagos inducidos por LPS [107]. En relación con la función inmunomoduladora, nuestros resultados coinciden con lo reportado previamente, en donde una primera incubación con antígenos de E-S de *T. spiralis*, se limita la liberación de estructuras fibrosas por parte del neutrófilo.

La función antimicrobiana de las NETs ya se encuentra mayormente descrita, se ha demostrado que las NETs desempeñan un doble papel en la homeostasis del hospedero, debido a que también causan alteraciones patológicas. Moléculas presentes en las fibras como MPO, NE, histonas, material nuclear como ADN, son autoantígenos en enfermedades autoinmunes sistémicas, como SLE, vasculitis, entre otras. Además, se ha destacado que los neutrófilos de pacientes con patologías autoinmunes son más propensos a desarrollar NETosis y defectuosos en la eliminación de células, así como de sus productos [49, 129]. La liberación aumentada y descontrolada de NETs origina una subpoblación de neutrófilos de baja densidad denominados LDG, que se caracterizan por un fenotipo disfuncional y activo con mayor producción de citocinas proinflamatorias y una capacidad de desencadenar NETosis espontánea [134]. Esto conlleva a desarrollar estrategias de limitación de formación de trampas extracelulares de neutrófilos en donde el contexto de estas células es una liberación de NETs descontrolada que afectan a individuos susceptibles o con alteraciones patológicas inflamatorias o autoinmunes.

En nuestro trabajo, los antígenos de E-S de *T. spiralis* no permitieron que las estructuras de trampas extracelulares fueran liberadas al exterior de los neutrófilos, pese a que el mecanismo de formación pudiera estarse llevando a cabo en las células, debido a que el neutrófilo permanece en una fase delobulada.

Se ha demostrado que el mecanismo de NETosis se desarrolla en respuesta a diferentes nemátodos. En estudios realizados por Bouchery *et al.*, las NETs fueron liberadas en respuesta a la penetración de *Nippostrongylus brasiliensis* en piel, sin embargo, en estados tardíos de la infección no se observaron NETs sobre las larvas del nemátodo debido a una

destrucción rápida de las estructuras por una DNasa-II, altamente conservada en nemátodos y parte de los productos E-S [135].

Los anquilostomas (*Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*), expresan enzimas antioxidantes que pueden interrumpir la formación de NETs; se ha observado que cultivar neutrófilos en presencia de H₂O₂ y productos de parásitos se obtiene una reducción de NETs [136, 137].

Chauhan *et al.* encontraron que los productos secretados por helmintos interfieren en el flujo de calcio, fosforilación de AMPK y la autofagia que conllevan a la alteración de la formación de NETs [136].

En la literatura existe muy pocos estudios de evaluación de los antígenos E-S de *T. spiralis* y su efecto en los neutrófilos, nuestro estudio es de los primeros trabajos de evaluación del efecto de los antígenos E-S sobre las NETs. A pesar de esto, los hallazgos nos muestran la posibilidad de encontrar alternativas de eliminación o limitación de dichas estructuras en individuos con formación aberrante o espontánea.

Para complementar nuestro análisis, se evaluó el efecto de los antígenos de E-S de *T. spiralis* sobre las otras actividades antimicrobianas del neutrófilo, fagocitosis, degranulación, migración por quimiotaxis, y producción de ROS.

Nuestros resultados demostraron que los antígenos de E-S no afectaron ninguna de las actividades antimicrobianas probadas, lo cual es de particular interés en la búsqueda de la eliminación o limitación de NETs sin la alteración de otras actividades antimicrobianas del neutrófilo, ya que, en un contexto de enfermedades infecciosas en individuos susceptibles, los neutrófilos puedan combatir la infección sin liberar trampas extracelulares y no agudizar la patología inflamatoria o autoinmune.

Los neutrófilos son considerados fagocitos eficientes, debido a que cuenta con receptores que reconocen a los patógenos, presentan una maquinaria compleja que interviene en la internalización de los microorganismos invasores para iniciar mecanismos de degradación y eliminación de las partículas absorbidas, en cuestión de segundos de interacción con el patógeno. Después de un reordenamiento del citoesqueleto, la membrana plasmática del fagocito se extiende y rodea a su objetivo, originando un proceso que crea una vacuola unida a la membrana denominada fagosoma [14, 15]. En el estudio realizado por Semnani *et al.*, encontraron que monocitos expuestos al nemátodo *B. malayi* y a sus antígenos de E-S causó una reducción de fagocitosis de *E. coli* opsonizada [138]. Wang *et al.*, reportaron en su estudio que en la línea celular Ana-1 de macrófagos se observó una reducción de engullir y eliminar a microorganismos después del tratamiento con antígenos de E-S de *Toxoplasma gondii*, favoreciendo con ello la sobrevivencia del parásito dentro del macrófago [139]. Por el contrario de lo reportado por otros autores, en nuestro estudio, el tratamiento previo de los neutrófilos con los antígenos E-S de *T. spiralis* no afectó la capacidad del neutrófilo de engullir y eliminar a *E. coli*, ya que no se obtuvo diferencia significativa con los neutrófilos que no recibieron una previa incubación con los antígenos E-S, a pesar de que las moléculas presentes en el grupo de E-S entre los diferentes parásitos puede variar.

El estallido respiratorio se produce por activación del complejo NADPH oxidasa, involucrado en el mecanismo de formación de NETs por la vía lítica, así como en el proceso de fagocitosis. Las ROS desempeñan un papel fundamental en la eliminación de los microorganismos a través de la descarboxilación, desaminación, peroxidación de proteínas y/o lípidos [8]. La exposición previa de los neutrófilos con los antígenos de E-S

de *T. spiralis* no mostró diferencia significativa en la producción de ROS respecto a neutrófilos que no recibieron un pre-tratamiento con los antígenos de E-S.

La producción de radicales libres de oxígeno previenen el crecimiento y la proliferación de los parásitos dentro de macrófago del hospedero; el protozooario *Leishmania* causa una disminución de los niveles de anión superóxido, O_2^- , H_2O_2 y NO lo que origina que el parásito pueda sobrevivir dentro del fagolisosoma en el macrófago [140, 141]. Los productos de E-S del nemátodo *Anisakis simplex* dirige a una mayor producción de ROS, lo que conlleva a un daño tisular [142]. A diferencia de lo reportado por otros autores, en nuestro análisis, los productos de E-S no causaron un aumento de los niveles de ROS.

Por otro lado, los péptidos catiónicos de neutrófilos proporcionan actividad microbicida al interaccionar con los componentes de la membrana con carga negativa de los patógenos, dando lugar a la formación de poros. Durante el proceso de degranulación, las proteínas de los gránulos primarios y secundarios se dirigen al fagosoma con la finalidad de minimizar el daño al tejido. Se ha descrito que algunos patógenos inhiben la degranulación de los neutrófilos para promover su sobrevivencia en el hospedero, mientras que otros inducen el proceso de exocitosis para favorecer su virulencia [143]. Como se mostró previamente, los antígenos de E-S de *T. spiralis* no alteraron la degranulación de elastasa y mieloperoxidasa al no mostrar diferencia significativa en la liberación de ambas enzimas con respecto a los neutrófilos que no recibieron el pre-tratamiento de los antígenos E-S. En la literatura no se ha descrito el efecto de los antígenos de E-S de *T. spiralis* sobre el mecanismo de exocitosis de elastasa de neutrófilo y mieloperoxidasa, sin embargo, el no alterar el mecanismo de degranulación podría ser explicado como un factor de favorecimiento de sobrevivencia del parásito en el hospedero. En su estudio, *Carlsen et*

al., encontraron que los amastigotes de *Leishmania braziliensis* significativamente inducen una mayor activación de neutrófilos, así como estallido respiratorio, degranulación y liberación de citocinas en comparación a la especie de *L. amazonensis* [144].

Cuando ocurre un daño se generan señales que establecen gradientes quimioatrayentes que los neutrófilos detectan y traducen en una respuesta de migración [126, 145]. En nuestro estudio, empleamos un péptido de N-formilo, fMLP, derivado de proteínas bacterianas como inductor de quimiotaxis, y obtuvimos que el pre-tratamiento con los antígenos de E-S de *T. spiralis* no afectó la migración de los neutrófilos comparado a los neutrófilos sin el tratamiento de antígenos de E-S. Diferente a nuestros resultados, en un estudio realizado por Bruschi *et al.*, reportaron que la quimiotaxis de neutrófilos se ve reprimida por *T. spiralis*, constituyendo un mecanismo por el cual el parásito podría desviar las células inflamatorias alrededor de sí mismo [146].

A pesar de que el proceso de quimiotaxis de los neutrófilos se encuentra ya descrito, el efecto que productos de nemátodos como los antígenos de E-S puede tener sobre células del sistema inmune aún no queda completamente elucidado, nuestro análisis demostró el efecto de productos de nemátodos sobre los neutrófilos pudiendo aportar información relevante sobre los antígenos E-S y la modulación del sistema inmune.

Las proteínas identificadas y reportadas dentro del proteoma de *T. spiralis* se han caracterizado como proteasas de serina, DNasas, glicoproteínas, factores de transcripción, sin embargo, aunque se han encontrado varias proteínas secretadas, aún no se caracterizan completamente. La separación del sobrenadante nos permitió evaluar fracciones individuales encontrándose en cada fracción una o dos proteínas, y obtuvimos que en la

fracción C3 la liberación de fibras se vio interrumpida. Posterior a la separación en gel de acrilamida encontramos dos proteínas con peso molecular alrededor de 65 y 75 kDa. Se ha reportado una proteasa de serina con peso molecular de 71.62 kDa, con función biológica descrita de actividad catalítica, hidrolítica, peptidasa, por mencionar algunas [147]. Una proteína clasificada como tripsina con peso molecular de 53.9 kDa también se ha reportado, sin embargo, no todas las proteínas presentes en el proteoma se encuentran caracterizadas [148], es posible que las proteínas presentes en la fracción responsable de la actividad inhibitoria de la liberación no estén caracterizadas.

El mecanismo de NETosis es un proceso que involucra diferentes vías de activación que convergen en cambios drásticos en la morfología del neutrófilo para finalizar con la muerte celular. PMA activa la PKC que induce la activación de la vía Raf-MEK-ERK, la producción de ROS por el complejo NADPH oxidasa, activación de MPO y liberación de elastasa de neutrófilo de los gránulos primarios, esta última migra hasta el núcleo para escindir las histonas, seguido de una desintegración de la membrana nuclear, expansión de la cromatina y finalmente muerte celular con liberación de NETs. Sin embargo, los patógenos pueden activar diferentes receptores y quinasas de los cuales aún no se conoce del todo la vía de señalización involucrada en la formación de NETs [149]. Las proteínas granulares son potencialmente dañinas por lo que la activación y liberación de su contenido está altamente regulado. Un paso crítico en la formación de NETs es la generación de ROS, a pesar de esto, se han descrito vías de formación de fibras independientes del complejo de NADPH [60].

La citrulinación de histonas, realizado por las enzimas PAD, es otro paso significativo en la formación de NETs que se lleva a cabo río abajo de la producción de ROS [149]. Este

trabajo analizó dos pasos claves en el proceso de formación de NETs, la activación de una proteína río arriba de la producción de ROS, PKC, y la citrulinación de la histona H3⁺, en ambos análisis se encontró la activación de los dos pasos de formación de NETs a partir de neutrófilos estimulados con PMA y *C. albicans*, sin embargo, con el pre-tratamiento de los antígenos de E-S de *T. spiralis*, los neutrófilos, en los cuales previamente se demostró que no liberaron fibras, se observó la activación de PKC así como la Histona H3⁺ citrulinada, lo que nos sugiere que estos pasos no están involucrados en la inhibición de la liberación de fibras por parte de los antígenos de E-S. La vía Raf-Mek-Erk y la citrulinación de H3⁺ no son las únicas vías que se activan para liberar NETs, el proceso para la formación de fibras depende del estímulo que active al neutrófilo, todo esto para finalizar con la muerte de neutrófilo y la liberación de fibras, es posible que otro paso río abajo en el proceso de formación este alterado y evite la liberación cuando los neutrófilos se exponen a los antígenos de E-S.

Estos resultados demuestran que en los antígenos E-S se encontró una proteína inhibitoria de la liberación de NETs además de no alterar otros mecanismos antimicrobianos de los neutrófilos. Los hallazgos nos permiten continuar con la investigación en la búsqueda de un inhibidor de NETs en individuos susceptibles con enfermedades autoinmunes o inflamatorias. La información de la proteína responsable de la actividad inhibitoria puede ser de interés en el entendimiento de la inhibición del mecanismo de liberación de fibras, así como de la vía involucrada en dicha alteración.

9. CONCLUSIONES

- Los antígenos de E-S de *Trichinella spiralis* inhiben la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos estimulados por PMA e inductores microbianos (*P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans*).
- Los antígenos de E-S de *T. spiralis* no altera el proceso de migración por quimiotaxis de neutrófilos.
- Los antígenos de E-S de *T. spiralis* no altera la fagocitosis de *E. coli* opsonizada por neutrófilos.
- Los antígenos de E-S de *T. spiralis* no altera la producción de ROS por neutrófilos estimulados con PMA.
- Los antígenos de E-S de *T. spiralis* no afecta la degranulación de elastasa y mieloperoxidasa del neutrófilo.
- La fracción C3 del sobrenadante completo de E-S presenta actividad inhibitoria de liberación de NETs.
- En la fracción C3 se encuentran dos proteínas de peso molecular de 65 y 75 kDa responsables de la inhibición de liberación de NETs.
- La fracción C3 no afecta la activación de PKC- α .
- La fracción C3 no afecta la citrulinación de histona H3⁺.

10. PERSPECTIVAS

- Identificar la proteína encargada de inhibir la liberación de trampas extracelulares
- Caracterizar la proteína, así como analizar la función por la cual se inhibe la liberación de NETs
- Elucidar el mecanismo de inhibición de liberación de fibras
- Evaluar el efecto de la proteína inhibitoria en un modelo *in vivo* de enfermedad inflamatoria
- Evaluar el efecto de la proteína inhibitoria en un modelo *in vivo* de enfermedad autoinmune

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Papayannopoulos, V. and A. Zychlinsky, *NETs: a new strategy for using old weapons*. Trends in Immunology, 2009. **30**(11): p. 513-521.
2. Urban, C.F., et al., *Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms*. Cell Microbiol, 2006. **8**(4): p. 668-76.
3. Amulic, B., et al., *Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease*. Annual Review of Immunology, 2012. **30**(1): p. 459-489.
4. Cooper, P.R., L.J. Palmer, and I.L. Chapple, *Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe?* Periodontol 2000, 2013. **63**(1): p. 165-97.
5. Burgener, S.S. and K. Schroder, *Neutrophil Extracellular Traps in Host Defense*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2020. **12**(7).
6. Ríos-López, A.L., et al., *Avoiding the trap: Mechanisms developed by pathogens to escape neutrophil extracellular traps*. Microbiological Research, 2021. **243**: p. 126644.
7. Guimarães-Costa, A.B., et al., *3'-Nucleotidase/Nuclease Activity Allows Leishmania Parasites To Escape Killing by Neutrophil Extracellular Traps*. Infection and Immunity, 2014. **82**(4): p. 1732-1740.
8. Mayadas, T.N., X. Cullere, and C.A. Lowell, *The multifaceted functions of neutrophils*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 181-218.
9. Rosales, C., et al., *Neutrophils: Their Role in Innate and Adaptive Immunity*. Journal of Immunology Research, 2016. **2016**: p. 1469780.

10. Segal, A.W., *How neutrophils kill microbes*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 197-223.
11. Teng, T.S., et al., *Neutrophils and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered*. *J Immunol Res*, 2017. **2017**: p. 9671604.
12. Mantovani, A., et al., *Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity*. *Nature Reviews Immunology*, 2011. **11**(8): p. 519-531.
13. Liu, F.C., et al., *Role of neutrophil extracellular traps following injury*. *Shock*, 2014. **41**(6): p. 491-8.
14. Lee, W.L., R.E. Harrison, and S. Grinstein, *Phagocytosis by neutrophils*. *Microbes Infect*, 2003. **5**(14): p. 1299-306.
15. Nordenfelt, P. and H. Tapper, *Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils*. *J Leukoc Biol*, 2011. **90**(2): p. 271-84.
16. Jakimiuk, K., et al., *Flavonoids as inhibitors of human neutrophil elastase*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2021. **36**(1): p. 1016-1028.
17. Liou, K.T., et al., *The anti-inflammatory effect of honokiol on neutrophils: mechanisms in the inhibition of reactive oxygen species production*. *Eur J Pharmacol*, 2003. **475**(1-3): p. 19-27.
18. Lacy, P., *Mechanisms of Degranulation in Neutrophils*. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 2006. **2**(3): p. 98.
19. Kasperkiewicz, P., et al., *Design of a Selective Substrate and Activity Based Probe for Human Neutrophil Serine Protease 4*. *PLOS ONE*, 2015. **10**(7): p. e0132818.
20. Stapels, D.A., B.V. Geisbrecht, and S.H. Rooijackers, *Neutrophil serine proteases in antibacterial defense*. *Curr Opin Microbiol*, 2015. **23**: p. 42-8.

21. Corbin, B.D., et al., *Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses*. Science, 2008. **319**(5865): p. 962-5.
22. Embleton, N.D., et al., *Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential*. Semin Fetal Neonatal Med, 2013. **18**(3): p. 143-149.
23. Häger, M., J.B. Cowland, and N. Borregaard, *Neutrophil granules in health and disease*. Journal of Internal Medicine, 2010. **268**(1): p. 25-34.
24. Faurschou, M. and N. Borregaard, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation*. Microbes and Infection, 2003. **5**(14): p. 1317-1327.
25. Klebanoff, S.J., *Myeloperoxidase: friend and foe*. J Leukoc Biol, 2005. **77**(5): p. 598-625.
26. Cardot-Martin, E., et al., *α -Defensins partially protect human neutrophils against Panton-Valentine leukocidin produced by Staphylococcus aureus*. Letters in Applied Microbiology, 2015. **61**(2): p. 158-164.
27. Jones, H.R., et al., *The role of neutrophils in inflammation resolution*. Semin Immunol, 2016. **28**(2): p. 137-45.
28. Korkmaz, B., et al., *Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases*. Pharmacol Rev, 2010. **62**(4): p. 726-59.
29. Frasca, L. and R. Lande, *Role of defensins and cathelicidin LL37 in auto-immune and auto-inflammatory diseases*. Curr Pharm Biotechnol, 2012. **13**(10): p. 1882-97.
30. Luerman, G.C., et al., *Application of proteomics to neutrophil biology*. Journal of Proteomics, 2010. **73**(3): p. 552-561.

31. D'Incà, R., et al., *Calprotectin and lactoferrin in the assessment of intestinal inflammation and organic disease*. International Journal of Colorectal Disease, 2007. **22**(4): p. 429-437.
32. Daigo, K., et al., *The proteomic profile of circulating pentraxin 3 (PTX3) complex in sepsis demonstrates the interaction with azurocidin 1 and other components of neutrophil extracellular traps*. Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(6): p. M111.015073.
33. O'Donoghue, A.J., et al., *Global Substrate Profiling of Proteases in Human Neutrophil Extracellular Traps Reveals Consensus Motif Predominantly Contributed by Elastase*. PLOS ONE, 2013. **8**(9): p. e75141.
34. Burgoyne, R.D. and A. Morgan, *Secretory Granule Exocytosis*. Physiological Reviews, 2003. **83**(2): p. 581-632.
35. Wartha, F., et al., *Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis*. Curr Opin Microbiol, 2007. **10**(1): p. 52-6.
36. Brinkmann, V., *Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade*. J Innate Immun, 2018. **10**(5-6): p. 414-421.
37. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2007. **176**(2): p. 231-41.
38. Brinkmann, V. and A. Zychlinsky, *Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs*. Nature Reviews Microbiology, 2007. **5**(8): p. 577-582.
39. Papayannopoulos, V., et al., *Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps*. Journal of Cell Biology, 2010. **191**(3): p. 677-691.

40. Ley, K., et al., *Neutrophils: New insights and open questions*. Sci Immunol, 2018. **3**(30).
41. Vorobjeva, N.V. and B.V. Pinegin, *Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of formation and role in health and disease*. Biochemistry (Moscow), 2014. **79**(12): p. 1286-1296.
42. Tan, C., M. Aziz, and P. Wang, *The vitals of NETs*. J Leukoc Biol, 2021. **110**(4): p. 797-808.
43. Guimarães-Costa, A.B., et al., *ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death*. Journal of Parasitology Research, 2012. **2012**: p. 929743.
44. Favor, O.K., et al., *Centrality of Myeloid-Lineage Phagocytes in Particle-Triggered Inflammation and Autoimmunity*. Frontiers in Toxicology, 2021. **3**.
45. Daniel, C., et al., *Extracellular DNA traps in inflammation, injury and healing*. Nature Reviews Nephrology, 2019. **15**(9): p. 559-575.
46. Jorch, S.K. and P. Kubes, *An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease*. Nat Med, 2017. **23**(3): p. 279-287.
47. Christofferson, D.E. and J. Yuan, *Necroptosis as an alternative form of programmed cell death*. Curr Opin Cell Biol, 2010. **22**(2): p. 263-8.
48. Proskuryakov, S.Y., A.G. Konoplyannikov, and V.L. Gabai, *Necrosis: a specific form of programmed cell death?* Exp Cell Res, 2003. **283**(1): p. 1-16.
49. Delgado-Rizo, V., et al., *Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview*. Frontiers in Immunology, 2017. **8**.
50. Papayannopoulos, V., *Neutrophil extracellular traps in immunity and disease*. Nature Reviews Immunology, 2018. **18**(2): p. 134-147.

51. van Dam, L.S., et al., *Clinical Implications of Excessive Neutrophil Extracellular Trap Formation in Renal Autoimmune Diseases*. *Kidney International Reports*, 2019. **4**(2): p. 196-211.
52. Leffler, J., et al., *Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease*. *J Immunol*, 2012. **188**(7): p. 3522-31.
53. Lande, R., et al., *Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus*. *Sci Transl Med*, 2011. **3**(73): p. 73ra19.
54. Yu, Y. and K. Su, *Neutrophil Extracellular Traps and Systemic Lupus Erythematosus*. *J Clin Cell Immunol*, 2013. **4**.
55. Lood, C., et al., *Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease*. *Nat Med*, 2016. **22**(2): p. 146-53.
56. Campbell, A.M., M. Kashgarian, and M.J. Shlomchik, *NADPH oxidase inhibits the pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. *Sci Transl Med*, 2012. **4**(157): p. 157ra141.
57. Chapman, E.A., et al., *Caught in a Trap? Proteomic Analysis of Neutrophil Extracellular Traps in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus*. *Frontiers in Immunology*, 2019. **10**.
58. Song, W., et al., *Neutrophil Extracellular Traps Tied to Rheumatoid Arthritis: Points to Ponder*. *Frontiers in Immunology*, 2021. **11**.

59. Khandpur, R., et al., *NETs Are a Source of Citrullinated Autoantigens and Stimulate Inflammatory Responses in Rheumatoid Arthritis*. *Science Translational Medicine*, 2013. **5**(178): p. 178ra40-178ra40.
60. Grayson, P.C. and M.J. Kaplan, *At the Bench: Neutrophil extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune diseases*. *J Leukoc Biol*, 2016. **99**(2): p. 253-64.
61. Mor-Vaknin, N., et al. *DEK-targeting DNA aptamers as therapeutics for inflammatory arthritis*. *Nature communications*, 2017. **8**, 14252 DOI: 10.1038/ncomms14252.
62. Wright, H.L., R.J. Moots, and S.W. Edwards, *The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis*. *Nature Reviews Rheumatology*, 2014. **10**(10): p. 593-601.
63. Lee, K.H., et al., *Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review*. *Autoimmunity Reviews*, 2017. **16**(11): p. 1160-1173.
64. Apel, F., A. Zychlinsky, and E.F. Kenny, *The role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases*. *Nature Reviews Rheumatology*, 2018. **14**(8): p. 467-475.
65. Huang, J., et al., *Molecular mechanisms and therapeutic target of NETosis in diseases*. *MedComm*, 2022. **3**(3): p. e162.
66. Fousert, E., R. Toes, and J. Desai, *Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Take the Central Stage in Driving Autoimmune Responses*. *Cells*, 2020. **9**(4): p. 915.
67. Holdenrieder, S., et al., *Nucleosomal DNA fragments in autoimmune diseases*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1075**: p. 318-27.
68. Kambas, K., et al., *Tissue factor expression in neutrophil extracellular traps and neutrophil derived microparticles in antineutrophil cytoplasmic antibody*

- associated vasculitis may promote thromboinflammation and the thrombophilic state associated with the disease. Ann Rheum Dis, 2014. 73(10): p. 1854-63.*
69. Fuchs, T.A., et al., *Extracellular DNA traps promote thrombosis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. 107(36): p. 15880-15885.*
70. Maugeri, N., et al., *Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. J Thromb Haemost, 2014. 12(12): p. 2074-88.*
71. Skopelja, S., et al., *The role for neutrophil extracellular traps in cystic fibrosis autoimmunity. JCI Insight, 2016. 1(17): p. e88912.*
72. Martínez-Alemán, S.R., et al., *Understanding the Entanglement: Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Cystic Fibrosis. Front Cell Infect Microbiol, 2017. 7: p. 104.*
73. Law, S.M. and R.D. Gray, *Neutrophil extracellular traps and the dysfunctional innate immune response of cystic fibrosis lung disease: a review. Journal of Inflammation, 2017. 14(1): p. 29.*
74. Gray, R.D., B.N. McCullagh, and P.B. McCray, *NETs and CF Lung Disease: Current Status and Future Prospects. Antibiotics, 2015. 4(1): p. 62-75.*
75. Young, R.L., et al., *Neutrophil Extracellular Trap (NET)-Mediated Killing of Pseudomonas aeruginosa: Evidence of Acquired Resistance within the CF Airway, Independent of CFTR. PLOS ONE, 2011. 6(9): p. e23637.*
76. Zawrotniak, M. and M. Rapala-Kozik, *Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. Acta Biochim Pol, 2013. 60(3): p. 277-84.*

77. Dubois, A.V., et al., *Influence of DNA on the activities and inhibition of neutrophil serine proteases in cystic fibrosis sputum*. American journal of respiratory cell and molecular biology, 2012. **47**(1): p. 80-86.
78. Cadrillier, A., et al., *Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury*. The Journal of Clinical Investigation, 2012. **122**(7): p. 2661-2671.
79. Winstel, V., O. Schneewind, and D. Missiakas, *Staphylococcus aureus Exploits the Host Apoptotic Pathway To Persist during Infection*. mBio, 2019. **10**(6): p. e02270-19.
80. Uchiyama, S., et al., *Streptolysin O Rapidly Impairs Neutrophil Oxidative Burst and Antibacterial Responses to Group A Streptococcus*. Frontiers in Immunology, 2016. **6**.
81. Beiter, K., et al., *An endonuclease allows Streptococcus pneumoniae to escape from neutrophil extracellular traps*. Curr Biol, 2006. **16**(4): p. 401-7.
82. Seper, A., et al., *Vibrio cholerae Evades Neutrophil Extracellular Traps by the Activity of Two Extracellular Nucleases*. PLOS Pathogens, 2013. **9**(9): p. e1003614.
83. Cole, J.N. and V. Nizet, *Bacterial Evasion of Host Antimicrobial Peptide Defenses*. Microbiol Spectr, 2016. **4**(1).
84. Rybtke, M., et al., *Pseudomonas aeruginosa Biofilm Infections: Community Structure, Antimicrobial Tolerance and Immune Response*. J Mol Biol, 2015. **427**(23): p. 3628-45.
85. Eby, J.C., M.C. Gray, and E.L. Hewlett, *Cyclic AMP-Mediated Suppression of Neutrophil Extracellular Trap Formation and Apoptosis by the Bordetella*

- pertussis Adenylate Cyclase Toxin*. Infection and Immunity, 2014. **82**(12): p. 5256-5269.
86. Eisenbeis, J., et al., *The Staphylococcus aureus Extracellular Adherence Protein Eap Is a DNA Binding Protein Capable of Blocking Neutrophil Extracellular Trap Formation*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018. **8**.
87. Schmidtchen, A., et al., *Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37*. Mol Microbiol, 2002. **46**(1): p. 157-68.
88. Bruns, S., et al., *Production of Extracellular Traps against Aspergillus fumigatus In Vitro and in Infected Lung Tissue Is Dependent on Invading Neutrophils and Influenced by Hydrophobin RodA*. PLOS Pathogens, 2010. **6**(4): p. e1000873.
89. Ilic, N., A. Gruden-Movsesijan, and L. Sofronic-Milosavljevic, *Trichinella spiralis: shaping the immune response*. Immunologic Research, 2012. **52**(1): p. 111-119.
90. Logue, C.M., N.L. Barbieri, and D.W. Nielsen, *Chapter Eight - Pathogens of Food Animals: Sources, Characteristics, Human Risk, and Methods of Detection*, in *Advances in Food and Nutrition Research*, F. Toldrá, Editor. 2017, Academic Press. p. 277-365.
91. Mitreva, M. and D.P. Jasmer, *Biology and genome of Trichinella spiralis*. 2006.
92. Fabre, M.V., et al., *Immunity to Trichinella spiralis muscle infection*. Veterinary Parasitology, 2009. **159**(3): p. 245-248.
93. Kniel, K., *19 - Progress in intervention programs to eradicate foodborne helminth infections*, in *Advances in Microbial Food Safety*, J. Sofos, Editor. 2013, Woodhead Publishing. p. 385-397.

94. Rawla, P. and S. Sharma, *Trichinella Spiralis*, in *StatPearls*. 2023, StatPearls Publishing

Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).

95. Muñoz-Carrillo, J.L., et al., *Therapeutic Effects of Resiniferatoxin Related with Immunological Responses for Intestinal Inflammation in Trichinellosis*. Korean J Parasito, 2017. **55**(6): p. 587-599.
96. Ding, J., et al., *Trichinella spiralis: inflammation modulator*. Journal of Helminthology, 2020. **94**: p. e193.
97. Gómez-Morales, M.A., et al., *Differentiation of Trichinella species (Trichinella spiralis/Trichinella britovi versus Trichinella pseudospiralis) using western blot*. Parasites & Vectors, 2018. **11**(1): p. 631.
98. Cvetkovic, J., et al., *Immunomodulatory potential of particular Trichinella spiralis muscle larvae excretory–secretory components*. International Journal for Parasitology, 2016. **46**(13): p. 833-842.
99. Liu, X.D., et al., *Oral administration with attenuated Salmonella encoding a Trichinella cystatin-like protein elicited host immunity*. Exp Parasitol, 2014. **141**: p. 1-11.
100. Guo, K., et al., *Trichinella spiralis paramyosin activates mouse bone marrow-derived dendritic cells and induces regulatory T cells*. Parasites & Vectors, 2016. **9**(1): p. 569.
101. Yang, Y., et al., *Protective immune response induced by co-immunization with the Trichinella spiralis recombinant Ts87 protein and a Ts87 DNA vaccine*. Vet Parasitol, 2013. **194**(2-4): p. 207-10.

102. Zhao, L., et al., *Trichinella spiralis* Calreticulin Binds Human Complement C1q As an Immune Evasion Strategy. *Frontiers in Immunology*, 2017. **8**.
103. Kobpornchai, P., et al., *A novel cystatin derived from Trichinella spiralis suppresses macrophage-mediated inflammatory responses*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2020. **14**(4): p. e0008192.
104. Yang, D.Q., et al., *Functional characterization of a glutathione S-transferase in Trichinella spiralis invasion, development and reproduction*. *Vet Parasitol*, 2021. **297**: p. 109128.
105. Sofronic-Milosavljevic, L., et al., *Secretory Products of *Trichinella spiralis* Muscle Larvae and Immunomodulation: Implication for Autoimmune Diseases, Allergies, and Malignancies*. *Journal of Immunology Research*, 2015. **2015**: p. 523875.
106. Han, C., et al., *Immunomodulatory effects of Trichinella spiralis excretory-secretory antigens on macrophages*. *Experimental Parasitology*, 2019. **196**: p. 68-72.
107. Bai, X., et al., *Regulation of cytokine expression in murine macrophages stimulated by excretory/secretory products from Trichinella spiralis in vitro*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2012. **360**(1): p. 79-88.
108. Li, H., et al., *Therapeutic Efficacy of Excretory-Secretory Products of Trichinella spiralis Adult Worms on Sepsis-Induced Acute Lung Injury in a Mouse Model*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021. **11**.
109. Amdare, N., et al., *Brugia malayi soluble and excretory-secretory proteins attenuate development of streptozotocin-induced type 1 diabetes in mice*. *Parasite Immunol*, 2015. **37**(12): p. 624-34.

110. Chang, A., et al., *Functional analysis of Streptococcus pyogenes nuclease A (SpnA), a novel group A streptococcal virulence factor*. Mol Microbiol, 2011. **79**(6): p. 1629-42.
111. Khatua, B., K. Bhattacharya, and C. Mandal, *Sialoglycoproteins adsorbed by Pseudomonas aeruginosa facilitate their survival by impeding neutrophil extracellular trap through siglec-9*. J Leukoc Biol, 2012. **91**(4): p. 641-55.
112. Branzk, N. and V. Papayannopoulos, *Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease*. Semin Immunopathol, 2013. **35**(4): p. 513-30.
113. Díaz-Godínez, C. and J.C. Carrero, *The state of art of neutrophil extracellular traps in protozoan and helminthic infections*. Biosci Rep, 2019. **39**(1).
114. Qi, X., et al., *Characterization of Two Trichinella spiralis Adult-Specific DNase II and Their Capacity to Induce Protective Immunity*. Frontiers in Microbiology, 2018. **9**.
115. Loukas, A. and P. Prociv, *Immune responses in hookworm infections*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(4): p. 689-703, table of contents.
116. Smallwood, T.B., et al., *Helminth Immunomodulation in Autoimmune Disease*. Frontiers in Immunology, 2017. **8**.
117. Khan, W.I., et al., *Intestinal nematode infection ameliorates experimental colitis in mice*. Infect Immun, 2002. **70**(11): p. 5931-7.
118. He, Y., et al., *The inhibitory effect against collagen-induced arthritis by Schistosoma japonicum infection is infection stage-dependent*. BMC Immunology, 2010. **11**(1): p. 28.
119. Rzepecka, J., et al., *Prophylactic and therapeutic treatment with a synthetic analogue of a parasitic worm product prevents experimental arthritis and inhibits*

- IL-1 β production via NRF2-mediated counter-regulation of the inflammasome.* J Autoimmun, 2015. **60**: p. 59-73.
120. Morales-Montor, J., et al., *Molecular identification of a PGRMC-2 receptor in maturing oocytes of the zoonotic nematode parasite Trichinella spiralis.* Veterinary Parasitology, 2022. **302**: p. 109662.
121. Gonzalez, A.S., et al., *Induction and quantification of neutrophil extracellular traps.* Methods Mol Biol, 2014. **1124**: p. 307-18.
122. Martínez-Alemán, S., et al., *Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients induce neutrophil extracellular traps with different morphologies that could correlate with their disease severity.* International Journal of Medical Microbiology, 2020. **310**(7): p. 151451.
123. Taylor, R.G. and R.D. Welch, *Chemotaxis as an emergent property of a swarm.* J Bacteriol, 2008. **190**(20): p. 6811-6.
124. Bonfim-Mendonça, P.d.S., et al., *β -Glucan Induces Reactive Oxygen Species Production in Human Neutrophils to Improve the Killing of Candida albicans and Candida glabrata Isolates from Vulvovaginal Candidiasis.* PLOS ONE, 2014. **9**(9): p. e107805.
125. Metzler, K.D., et al., *Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity.* Blood, 2011. **117**(3): p. 953-9.
126. Németh, T., M. Sperandio, and A. Mócsai, *Neutrophils as emerging therapeutic targets.* Nature Reviews Drug Discovery, 2020. **19**(4): p. 253-275.
127. Pérez-Figueroa, E., et al., *Neutrophils: Many Ways to Die.* Frontiers in Immunology, 2021. **12**.

128. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. *Science*, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
129. Kaplan, M.J. and M. Radic, *Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity*. *The Journal of Immunology*, 2012. **189**(6): p. 2689-2695.
130. Borregaard, N., *Neutrophils, from marrow to microbes*. *Immunity*, 2010. **33**(5): p. 657-70.
131. Ríos-López, A.L., et al., *Trichinella spiralis excretory-secretory antigens selectively inhibit the release of extracellular traps from neutrophils without affecting their additional antimicrobial functions*. *Cellular Immunology*, 2022. **382**: p. 104630.
132. Abuzeid, A.M.I., et al., *Twenty-five-year research progress in hookworm excretory/secretory products*. *Parasites & Vectors*, 2020. **13**(1): p. 136.
133. Nagano, I., Z. Wu, and Y. Takahashi, *Functional genes and proteins of Trichinella spp*. *Parasitology Research*, 2009. **104**(2): p. 197-207.
134. Hidalgo, A., et al., *Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology*. *Cardiovasc Res*, 2022. **118**(13): p. 2737-2753.
135. Bouchery, T., et al., *Hookworms Evade Host Immunity by Secreting a Deoxyribonuclease to Degrade Neutrophil Extracellular Traps*. *Cell Host Microbe*, 2020. **27**(2): p. 277-289.e6.
136. Chauhan, A., et al., *Helminth derived factors inhibit neutrophil extracellular trap formation and inflammation in bacterial peritonitis*. *Scientific Reports*, 2021. **11**(1): p. 12718.

137. Doolan, R. and T. Bouchery, *Hookworm infections: Reappraising the evidence for a role of neutrophils in light of NETosis*. *Parasite Immunology*, 2022. **44**(6): p. e12911.
138. Semnani, R.T., et al., *Functional and Phenotypic Characteristics of Alternative Activation Induced in Human Monocytes by Interleukin-4 or the Parasitic Nematode *Brugia malayi**. *Infection and Immunity*, 2011. **79**(10): p. 3957-3965.
139. Wang, S., et al., *Toxoplasma gondii excretory/secretory antigens (TgESAs) suppress pro-inflammatory cytokine secretion by inhibiting TLR-induced NF- κ B activation in LPS-stimulated murine macrophages*. *Oncotarget*, 2017. **8**(51).
140. Van Assche, T., et al., *Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology*. *Free Radic Biol Med*, 2011. **51**(2): p. 337-51.
141. Gour, J.K., et al., *Identification of Th1-responsive leishmanial excretory–secretory antigens (LESAs)*. *Experimental Parasitology*, 2012. **132**(3): p. 355-361.
142. Messina, C.M., et al., *Anisakis pegreffii (Nematoda: Anisakidae) products modulate oxidative stress and apoptosis-related biomarkers in human cell lines*. *Parasites & Vectors*, 2016. **9**(1): p. 607.
143. Eichelberger, K.R. and W.E. Goldman, *Manipulating neutrophil degranulation as a bacterial virulence strategy*. *PLOS Pathogens*, 2020. **16**(12): p. e1009054.
144. Carlsen, E.D., et al., *Interactions between Neutrophils and *Leishmania braziliensis* Amastigotes Facilitate Cell Activation and Parasite Clearance*. *Journal of Innate Immunity*, 2015. **7**(4): p. 354-363.
145. de Oliveira, S., E.E. Rosowski, and A. Huttenlocher, *Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse*. *Nature Reviews Immunology*, 2016. **16**(6): p. 378-391.

146. Bruschi, F., et al., *Modulating effects by Trichinella spiralis sensu stricto excretory/secretory antigens of human neutrophil functions*. *Wiad Parazytol*, 1989. **35**(5): p. 391-400.
147. Liu, R.D., et al., *Proteomic analysis of Trichinella spiralis adult worm excretory-secretory proteins recognized by early infection sera*. *Vet Parasitol*, 2016. **231**: p. 43-46.
148. Wang, L., et al., *Identification of early diagnostic antigens from major excretory-secretory proteins of Trichinella spiralis muscle larvae using immunoproteomics*. *Parasites & Vectors*, 2014. **7**(1): p. 40.
149. Rosazza, T., J. Warner, and G. Sollberger, *NET formation – mechanisms and how they relate to other cell death pathways*. *The FEBS Journal*, 2021. **288**(11): p. 3334-3350.