



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco



**INSTITUTO NACIONAL
DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS**
ISMAEL COSÍO VILLEGAS

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

REPORTE DE SERVICIO SOCIAL EN EL INSTITUTO NACIONAL DE
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS "ISMAEL COSÍO VILLEGAS"

**ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA METODOLOGÍA
DEL WESTERN BLOT PARA MUESTRAS DE TRAMPAS
EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NET)**

**PROYECTO GENÉRICO CORRESPONDIENTE: SALUD, ALIMENTACIÓN Y
NUTRICIÓN**

Asesores

Asesor interno: Dra. Julia Pérez Ramos

Asesor externo: Dr. Miguel Ángel Negreros Amaya

Alumno

Ríos Rodríguez José Manuel

Ciudad de México, a 18 de julio del 2023

Lista de abreviaturas

BSA.	Albúmina sérica bovina.
CitH3.	Histona 3 citrulinada.
DNA.	Ácido desoxirribonucleico.
DAMP.	<i>Damage – associated molecular pattern.</i>
EDTA.	Ethylenediaminetetraacetic acid.
ELISA.	<i>Enzyme – linked immunosorbent assay.</i>
GAPDH.	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
H₂O₂.	Peróxido de hidrógeno.
HRP.	Peroxidasa de rábano picante.
IL-8.	Interlucina 8.
IFN-α/γ.	Interferón alfa / gamma.
LL-37.	Péptido antimicrobiano de catelicidina.
LPS.	Lipopolisacárido.
MIFC.	<i>Multispectral Image Flow Cytometry.</i>
NET.	<i>Neutrophil extracellular traps.</i>
NO.	Óxido nítrico.
PAD4.	Proteína Arginina-Deiminasa tipo IV.
PBS.	Phosphate buffered saline.
PMA.	Forbol-12-miristato-13-acetato.
PMN.	Polimorfonucleares.
RIPA.	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
ROS.	<i>Reactive oxygen species.</i>
RPMI.	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium.</i>
SDS-PAGE.	<i>Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.</i>
TBS-T.	TRIS-buffered saline with Tween 20.
WB.	Western Blot.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	5
3. MARCO TEÓRICO	6
3.1 Neutrófilos.....	6
3.2 Composición de las NET	7
3.3. Rol de las NET en la fisiología y patología.....	8
3.4. Inducción de las NET.....	8
3.5 Técnicas para la caracterización de los componentes de las NET.....	9
3.6 Western Blot	10
4. OBJETIVOS.....	11
4.1 Objetivo general.....	11
4.2 Objetivos específicos	11
5. METODOLOGÍA.....	12
5.1 Obtención y aislamiento de PMN	12
5.2 Inducción de NET.....	12
5.3 Lisado celular	12
5.4 Cuantificación de proteínas.....	13
5.5 Western Blot	13
6. RESULTADOS	15
6.1 Estandarización de la técnica de WB para la detección de Histona H3.....	15
6.2 Estandarización de la técnica de WB para la detección de citH3.....	15
6.3 Estandarización de la técnica de WB para la detección de PAD4.....	16
6.4 Estandarización de la técnica de WB para la detección de LL-37.....	17
6.5 Estandarización de la técnica de WB para la detección de β -actina	17
7. DISCUSIÓN.....	18
8. CONCLUSIONES.....	20
9. BIBLIOGRAFÍA.....	21

1. RESUMEN

La liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET, por sus siglas en inglés) resulta ser un mecanismo de defensa tanto benéfico como perjudicial para el hospedero, ya que puede desencadenar diversas patologías. Puesto que su análisis resulta ser importante en la investigación médica, se han utilizado técnicas para el estudio de las NET, como el uso del Western Blot (WB) para identificar la presencia de proteínas blanco que conforman a las NET. En el presente proyecto se determinaron las condiciones adecuadas para la identificación de algunas de las proteínas que están presentes en las NET, las cuales fueron Histona H3, Histona 3 citrulinada (citH3), Proteína Arginina-Deiminasa tipo IV (PAD4), Péptido Antimicrobiano de Catelicidina (LL-37) y β -actina, y como controles de carga se utilizaron a la enzima Gliceraldehído-3-fostafo deshidrogenasa (GAPDH) y β -actina. Para su estudio se extrajeron polimorfonucleares (PMN) de individuos sanos mediante venopunción y se estimularon con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) a las 0.5, 1, 2, 3 y 4 horas, teniendo a las 0 horas un control sin estímulo. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) con dodecilsulfato sódico (SDS) y se detectaron por WB mediante el uso de anticuerpos primarios y secundarios de ratón y/o conejo a diferentes títulos, así como su respectivo análisis de densitometría óptica para cada una de las proteínas. Dicho lo anterior, se estandarizaron las concentraciones de anticuerpos para la inmunodetección de proteínas que componen a las NET en el Laboratorio de la Clínica de Vasculitis Sistémicas Primarias del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

2. INTRODUCCIÓN

Las NET son redes microbicidas formadas principalmente por ácido desoxirribonucleico (DNA) nuclear, proteínas granulares e histonas que cumplen un rol importante en la inmunidad innata, evitando así la propagación microbiana en el hospedero. Si estas redes no son eliminadas por enzimas y células fagocíticas, su tiempo de permanencia en el organismo puede ser elevado, lo que podría llevar a la generación de autoanticuerpos y el desarrollo de enfermedades autoinmunes y no autoinmunes (Jorch y Kubes, 2017).

La creciente relevancia del papel de las NET en la fisiopatología ha llevado a diversos científicos a investigar su inducción, composición y efectos nocivos en la salud, así como a utilizar y optimizar diferentes técnicas de inmunología, microscopía y biología molecular para entender su mecanismo de acción *in vitro* e *in vivo* (Stoimenou *et al.*, 2022).

En los últimos años, las técnicas de la biología molecular han sido de gran ayuda para el análisis de biomoléculas y su papel en la fisiología celular, una de estas técnicas es el WB, una técnica analítica muy específica, sensible y semicuantitativa que permite detectar proteínas específicas presentes en células o tejidos mediante el uso de anticuerpos específicos que reconocen y se unen al epítipo de la proteína de interés (Mahmood y Yang, 2012). Es por ello por lo que en la presente investigación se estandarizó y evaluó la técnica del WB para el análisis de algunas de las proteínas que componen a las NET a partir de leucocitos PMN de donadores sanos estimulados con PMA en intervalos de 0.5, 1, 2, 3 y 4 horas, dichas proteínas fueron Histona H3, citH3, PAD4, LL-37 y β -actina, también se utilizaron como controles de carga a la enzima GAPDH y β -actina para realizar el análisis de densitometría óptica y estadístico.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Neutrófilos

Los neutrófilos son los leucocitos PMN y fagocíticos más abundantes en los seres humanos y son células clave en la inmunidad innata, puesto a que forman parte de la primera línea de defensa contra agentes patógenos como bacterias, hongos y virus. Además, participan en procesos homeostáticos como la vasodilatación, resolución de la respuesta inflamatoria, remodelación tisular y regulación de proteasas (Rungelrath, Kobayashi & DeLeo, 2019; Owen *et al.*, 2014).

Después de su diferenciación a neutrófilos en la médula ósea, migran hacia la sangre periférica, en donde su tiempo de residencia es de aproximadamente de 7 a 10 horas, para finalmente dirigirse hacia los diversos tejidos, últimos sitios en los que residen solamente unos días antes de morir (Owen *et al.*, 2014).

Anteriormente, se sabía que los neutrófilos sólo tenían dos mecanismos para la eliminación de microorganismos infecciosos, los cuales son la desgranulación y la fagocitosis. En el primer proceso, mediante exocitosis, liberan sustancias microbicidas contenidas en sus gránulos contra los microorganismos (Nathan, 2006). En el segundo caso, por endocitosis, captan a los patógenos y los encapsulan hasta su interior celular en un orgánulo llamado fagolisosoma para degradarlos mediante la acción de moléculas citotóxicas y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Kennedy & DeLeo, 2008).

De acuerdo con los dos mecanismos relatados con anterioridad, en 2004, Brinkmann, *et al.*, descubrieron un tercer mecanismo en estas células para eliminar microorganismos de manera extracelular, denominado *Neutrophil Extracellular Traps*, un complejo de mallas conformadas por componentes nucleares y proteínas antimicrobianas presentes en los gránulos azurófilos y específicos. Para este proceso, el núcleo celular pierde su forma lobulada, la cromatina interfásica (heterocromatina y eucromatina) se combinan, hay lisis de la membrana nuclear y los gránulos, lo que permite que tanto elementos nucleares como granulares se combinen y puedan lisar la membrana celular para salir al ambiente extracelular, atrapando y destruyendo a los agentes patógenos. Finalmente, se cree que este mecanismo termina con la muerte del neutrófilo, fase denominada como NETosis (Brinkmann *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2007; Yam *et al.*, 2012).

3.2 Composición de las NET

La conformación de las NET es muy variada, ya que las biomoléculas que las conforman dependen del estímulo al que el neutrófilo fue sometido. Se han investigado y evidenciado diversos ensayos en los que se menciona que su composición principal es de 2 clases de macromoléculas: proteínas y ácidos nucleicos, específicamente DNA de doble cadena, en donde las proteínas se encuentran unidas mediante diversas interacciones químicas al DNA. Las proteínas pueden ser de origen granular, nuclear y/o citoplasmático y el DNA de origen nuclear o mitocondrial (Brinkmann *et al.*, 2004; Yousefi *et al.*, 2009).

De acuerdo con Brinkmann, *et al.*, las NET están compuestas principalmente por DNA y proteínas de los gránulos primarios, secundarios y terciarios de los neutrófilos, en donde destacan la presencia de sustancias proteolíticas como catepsina G, elastasa de neutrófilo, mieloperoxidasa, gelatinasa y lactoferrina, además de histonas como la Histona H1, H2A, H2B, H3 y H4 (Brinkmann *et al.*, 2004). Cinco años después, Urban, *et al.*, demostró mediante microscopía electrónica que las NET, además de estar conformadas por DNA, histonas modificadas y las proteínas mencionadas anteriormente por Brinkmann, *et al.*, contenían proteínas de peroxisomas como la catalasa, de citoesqueleto a la miosina-9 y actina, de citoplasma a la calprotectina y granulares como la lisozima C y azurocidina (Urban *et al.*, 2009).

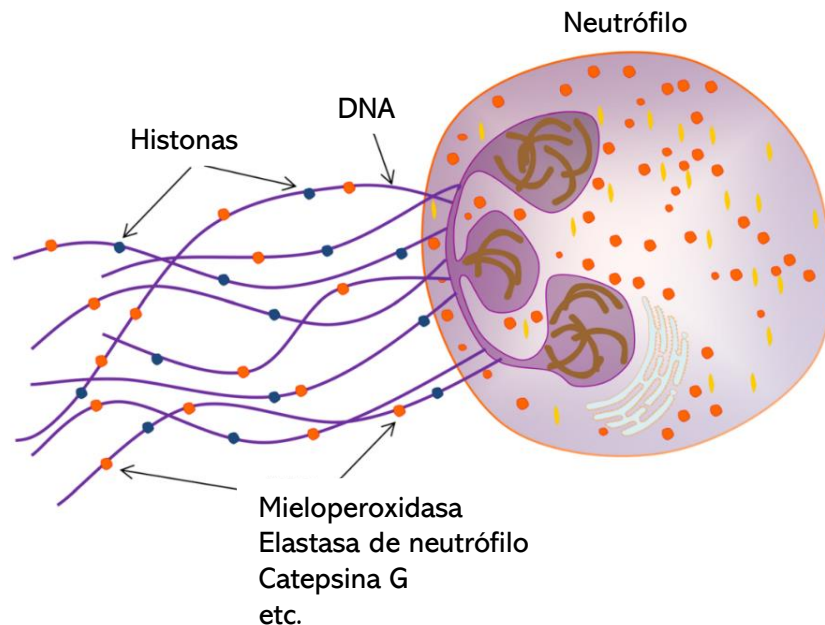


Figura 1. Representación de la liberación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NET)

Modificado de *Neutrophil-Induced Liver Injury and Interactions Between Neutrophils and Liver Sinusoidal Endothelial Cells.* (p. 1252), por Wang, Y. y Liu, Y, 2021, *Inflammation.*

Adicionalmente, se ha detectado que las histonas H2A, H2B, H3 y H4 son las proteínas que constituyen mayoritariamente a las NET, conformando aproximadamente el 70% de estas redes y son la Histona H2A e Histona H2B aquellas que se encuentran en mayor proporción (Urban *et al.*, 2009; Yam *et al.*, 2012). Además, las histonas que conforman a las NET sufren modificaciones postraduccionales en los residuos de arginina, convirtiéndose en residuos de citrulina, cambio que promueve la descondensación de la cromatina que empaqueta al DNA nuclear, este cambio es promovido por la acción de la enzima PAD4 (Wang *et al.*, 2009).

3.3. Rol de las NET en la fisiología y patología

La liberación de NET es uno de los mecanismos de defensa de los neutrófilos para atrapar y erradicar agentes extraños. Fisiológicamente, estas células son activados ante la presencia de algún agente patógeno, lo que puede iniciar la cascada de señalización celular para la liberación de estas redes con proteínas citotóxicas y antimicrobianas hacia el microorganismo para destruirlo y evitar su diseminación sistémica (Brinkmann *et al.*, 2004).

Patológicamente, diversos estudios han descrito que la liberación de NET está involucrada en procesos no infecciosos. Durante la liberación de NET, las proteínas intracelulares de los neutrófilos pueden quedar a la deriva en el espacio extracelular si estas no son eliminadas, lo que posiblemente genera la presentación de autoantígenos al sistema inmune del huésped y la liberación de patrones moleculares asociados al daño (DAMP), pudiendo inducir deterioro en el huésped y la generación de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, vasculitis y lupus sistémico eritematoso. Además, se ha observado que las NET posiblemente tienen un papel en enfermedades no autoinmunes como la aterosclerosis, diabetes mellitus tipo 2, trastornos de coagulación, cáncer, entre otras (Jorch y Kubes, 2017).

3.4. Inducción de las NET

De acuerdo con diversos autores, se ha demostrado que la inducción *in vitro* de NET puede ser iniciada mediante agentes químicos y biológicos. Entre los agentes químicos se encuentra el PMA; siendo este el inductor de NET por excelencia, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), interleucina 8 (IL-8), óxido nítrico (NO), factor activador de plaquetas, interferón alfa/gamma (IFN- α/γ) y el factor estimulante de granulocitos-macrófagos. Para el caso de los agentes biológicos se describen algunos lipopolisacáridos (LPS) bacterianos, diversas bacterias y plaquetas activadas. El agente inductor por utilizar dependerá del objetivo estudio que se

desea realizar (Brinkmann *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2007; Martinelli *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2010; Yam *et al.*, 2012; Yost *et al.*, 2009).

3.5 Técnicas para la caracterización de los componentes de las NET

A raíz del descubrimiento de las NET y su implicación en diferentes patologías, se han propuesto diferentes herramientas para la identificación de las proteínas que las conforman.

Actualmente, diversos investigadores utilizan diferentes tipos de técnicas para la evaluación y análisis de las NET, Stoimenou., *et al.*, 2022 destacan las siguientes:

- Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA): Es una herramienta que permite detectar y cuantificar antígenos circulantes en suero sanguíneo mediante anticuerpos ligados a enzimas, en el caso de las NET, asocia los marcadores específicos de las NET con diversos trastornos humanos.
- Microscopía de inmunofluorescencia: Esta metodología de inmunotinción permite la visualización de la estructura celular y componentes de las NET mediante el uso de anticuerpos ligados a fluoróforos y agentes intercalantes de DNA.
- Microscopía electrónica: Permite visualizar la liberación de NET *in vivo*, gracias al reflejo o traspaso de un haz de electrones sobre la superficie de la muestra.
- Microscopía intravital: Permite la visualización de NET *in vivo* por medio de la tinción de los componentes que indican su liberación. Solo puede ser realizada en modelos animales vivos.
- Citometría de flujo: Caracteriza la morfología, tamaño y granularidad del neutrófilo mediante la dispersión de luz y emisión de fluorescencia de colorantes o anticuerpos conjugados específicos para marcadores de superficie celular o marcadores intracelulares de NET.
- Citometría de flujo de imagen multiespectral (MIFC): Cuantifica semiautomáticamente la formación de NET en múltiples muestras, así como la formación de vesículas y cambios nucleares en los neutrófilos (Carmona-Rivera y Kaplan, 2016; Zhao, Fogg y Kaplan, 2015).

3.6 Western Blot

Como se mencionó anteriormente, existen diversas técnicas para la evaluación de las NET y cada una tiene sus ventajas y desventajas, solo por mencionar dos de las más importantes; la técnica de ELISA que es de las más utilizadas es simple, específica y de bajo costo, sin embargo, tiene dificultades en los procesos de estandarización y diferencias en cuanto a las comparaciones de los resultados de las NET *in vivo* e *in vitro*. Otra de las técnicas ampliamente utilizadas es la de inmunofluorescencia, que se destaca por una cuantificación objetiva de las NET y usa métodos basados en software para analizarlas, a pesar de esto tiene poca reproducibilidad y requiere de personal capacitado para la preparación de las muestras. Debido a esto, una técnica que resultaría de gran valor para la detección de los componentes de las NET es el Western Blot.

El Western Blot o inmunoblot es una técnica utilizada en biología celular y molecular para la identificación de proteínas específicas a partir de una mezcla compleja de proteínas provenientes de contenido celular. Además, esta técnica proporciona resultados semicuantitativos del grado de expresión de las proteínas de interés, así como sus modificaciones postraduccionales (Mahmood y Yang, 2012). La metodología consiste en la extracción y cuantificación de proteínas, la resolución de la muestra de proteínas en SDS-PAGE, transferencia de los polipéptidos separados a un soporte de membrana, bloqueo de los sitios de unión no específicos de la membrana, incubación con anticuerpos y detección de señal (Blancher y Jones, 2001).

El WB resulta ser altamente benéfico, ya que es sensible y específico, pero requiere de previa estandarización de la concentración de anticuerpos primarios y/o secundarios a utilizar (Ghosh, Gilda y Gomes, 2014; Stoimenou *et al.*, 2022).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Estandarizar el método de Western Blot para la detección de NET en el laboratorio de la Clínica de Vasculitis Sistémicas Primarias.

4.2 Objetivos específicos

- Comparar las distintas aproximaciones de obtención de muestra al momento de evaluar las NET.
- Estandarizar las condiciones técnicas óptimas del WB para cada una de las proteínas a estudiar (porcentaje de acrilamida del gel, tiempo de transferencia a la membrana y concentraciones de anticuerpos).
- Evaluar distintas proteínas reportadas como componentes de NET.
- Estudiar la presencia de distintas proteínas como controles de carga para NET.

5. METODOLOGÍA

El presente trabajo es un estudio observacional aprobado por el Protocolo de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias con número B22-18.

Se analizaron las condiciones de WB para evaluar las proteínas que conforman a las NET, para ello, se aislaron PMN de sangre periférica de individuos sanos, seguido a esto, se adicionaron estímulos con PMA para la inducción de NET (desde 0 h hasta 4 h) para finalmente recuperar las proteínas y valorarlas mediante WB. A continuación, se describe la metodología empleada.

5.1 Obtención y aislamiento de PMN

Para el aislamiento de PMNs se utilizaron 21 mL de sangre periférica de individuo sano por medio de sistema de vacío en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Los PMN fueron aislados mediante el reactivo Polymorphprep™ siguiendo las instrucciones del fabricante. Se procedió a evaluar la viabilidad de las células mediante conteo en cámara de Neubauer con tinción de azul tripano.

Los PMN fueron sembrados en placas (T_{0h} , $T_{0.5h}$, T_{1h} , T_{2h} , T_{3h} y T_{4h}) de 10 cm a una confluencia de 7.5×10^6 células por placa y se dejaron adherir durante 30 min.

5.2 Inducción de NET

Para la inducción de NET los neutrófilos fueron estimulados con PMA 20 nM (T_{0h} sólo se añadió medio RPMI) y se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ durante 30 min, 1 h, 2 h, 3 h y 4 h.

5.3 Lisado celular

Para los lisados celulares de proteínas se utilizó el buffer *radioimmunoprecipitation assay* (RIPA) adicionado con inhibidores de proteasas 1X (Calbiochem®, No. Cat. 539137-10VL). Posteriormente, se añadió la preparación a las placas, se raspó y homogenizó el contenido.

5.4 Cuantificación de proteínas

Para conocer la concentración de proteínas presentes en las muestras, se realizó una curva de calibración a partir de una solución patrón de 2.0 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA) (Thermo Scientific). Se tomaron 1.25, 2.5, 5, 7.5, 10 y 12.5 μ L de BSA y se aforaron hasta 50 μ L, obteniendo soluciones de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/mL respectivamente. Se diluyeron las muestras tomando 1 μ L de cada muestra y añadiendo 29 μ L de agua destilada (F.D. = 30). Se utilizó una solución 50:1 del reactivo AB Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) para generar el viraje.

En una microplaca de fondo plano se añadió por duplicado agua destilada (blanco), los stocks de la curva de calibración y las muestras diluidas, así como la solución AB. La microplaca se incubó a 37 °C durante 30 minutos y se determinaron las absorbancias mediante lector de placas ELISA (BioTek). Finalmente, se realizaron los cálculos necesarios para determinar la curva de calibración y la cuantificación de proteína mediante el programa Microsoft Excel.

5.5 Western Blot

Partiendo de los lisados celulares se procedió a realizar los Western Blots correspondientes en condiciones desnaturalizantes, se utilizó una concentración de 30 μ g de cada uno de los extractos.

Como primer paso a las muestras se les adicionó buffer de carga 5X (Thermo Scientific Cat #39000) y se hirvieron en baño maría para completar la desnaturalización. Se realizó electroforesis en geles de gradiente de poliacrilamida (4% - 15%) a 100 V hasta completar la separación de las proteínas, para después realizar la transferencia en membranas de Immun-Blot® PVDF (Bio-Rad) a 100 V durante 1 h. Una vez transferidas las proteínas a las membranas se colocaron en leche libre de grasa al 5% en TRIS-buffered saline with Tween 20 (TBS-T) y se bloquearon durante 1 h, después se agregaron los anticuerpos primarios correspondientes: Histona H3 1:5000 (GeneTex Cat #122148), citH3 1:1000 (Cayman Chemical Company Cat #17939), PAD4 1:5000 (GeneTex Cat #113946), LL-37 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology Cat #SC166770), β -actina 1:5000 (GeneTex Cat #109639) y GAPDH 1:10,000 (GeneTex Cat #28245), los anticuerpos se diluyeron en solución diluyente de anticuerpos (Thermo Scientific Cat #003218) y se incubaron a 4 °C durante toda la noche. Posterior a las incubaciones, las membranas se lavaron 3 veces en TBS-T durante 10 min, después de los lavados se adicionaron los anticuerpos secundarios correspondientes; Goat anti-Mouse IgG 1:15,000 (H + L) (Invitrogen Cat# 62-6520) y Goat anti-Rabbit IgG 1:15,000 (H+L) (Invitrogen Cat# 65-6120) durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las

membranas se lavaron con TBS-T y se procedió a la detección de las bandas por quimioluminiscencia mediante el sistema de fotodocumentación ChemiDoc XRS (Bio-Rad).

Todos los WB fueron realizados por triplicado. Las señales obtenidas por quimioluminiscencia se cuantificaron con el programa Fiji y se analizaron por medio de pruebas estadísticas de ANOVA con ajuste de Dunnet para comparaciones múltiples (triplicado). Se consideró como cambio significativo un valor de $p < 0.05$. Los datos fueron capturados y analizados por medio del programa Graph Pad Prism Versión 8.1.0 (221).

6. RESULTADOS

6.1 Estandarización de la técnica de WB para la detección de Histona H3

Para evaluar si era posible visualizar el nivel de expresión de la proteína Histona H3 se realizó WB siguiendo las condiciones descritas. Encontramos un aumento en la expresión de H3 posterior al tiempo 0 en ambos casos, cabe mencionar que en el primer caso se usó GAPDH (2A) y en el segundo β -actina (2B) como control de carga. En el análisis densitométrico de tres experimentos distintos se logra ver la tendencia en el aumento al T₁ y T₂ sin llegar a ser significativo (2C).

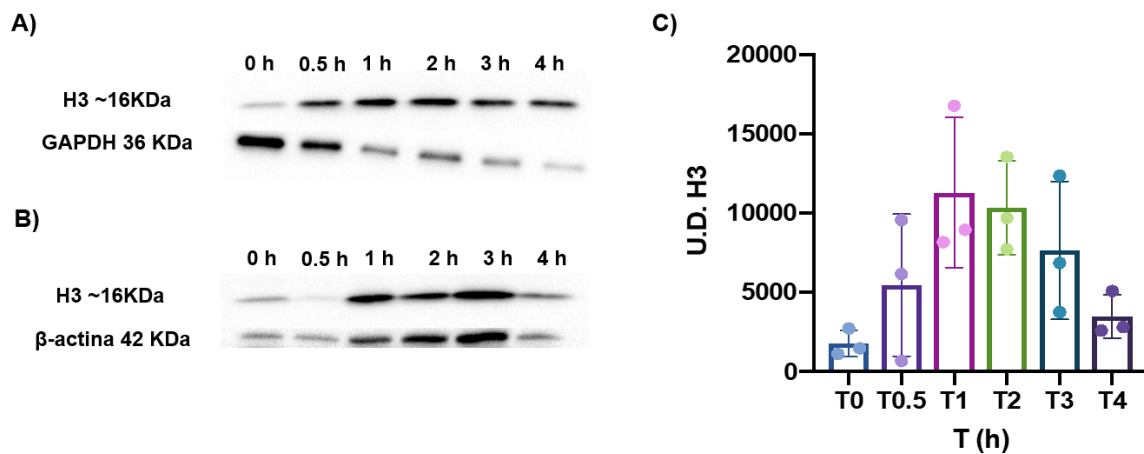


Figura 2. Inmunodetección de Histona H3 y su densitometría óptica. A y B. WB para Histona H3. C. Gráfica de D.O. (no es estadísticamente significativo).

6.2 Estandarización de la técnica de WB para la detección de citH3

Para el caso de citH3 ocurren 2 comportamientos muy distintos, en el primero el nivel de expresión incrementa a las 4 h (3A), mientras que en el segundo ocurre lo contrario, ya que el nivel de expresión de la proteína va en descenso desde tiempo 0 h hasta las 4 horas (3B). Cabe mencionar que se utilizaron endógenos distintos para cada uno de los experimentos GAPDH y β -actina, respectivamente.

En la figura 3C se puede observar la gráfica correspondiente al análisis densitométrico de las 3 repeticiones del WB para citH3, en la cual se puede apreciar que no hay diferencia en la expresión de citH3 en los 6 tiempos.

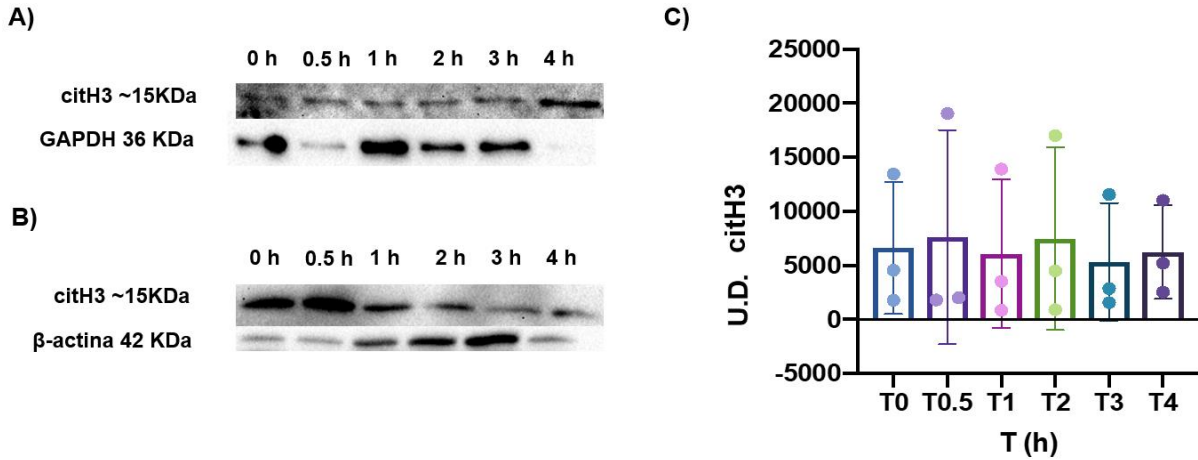


Figura 3. Inmunodetección de citH3 y su densitometría óptica. A y B. WB para citH3. C. Gráfica de D.O. (no es estadísticamente significativo).

6.3 Estandarización de la técnica de WB para la detección de PAD4

En el caso de PAD4 se observó un descenso en la expresión a las 4 horas en comparación al tiempo inicial (4A). Este cambio resultó no estadísticamente significativo al comparar las densitometrias resultado de tres experimentos independientes ajustados con GAPDH como su control de carga (4B). Sin embargo, podemos observar una tendencia a la disminución de PAD4 en función de los tiempos de estímulo.

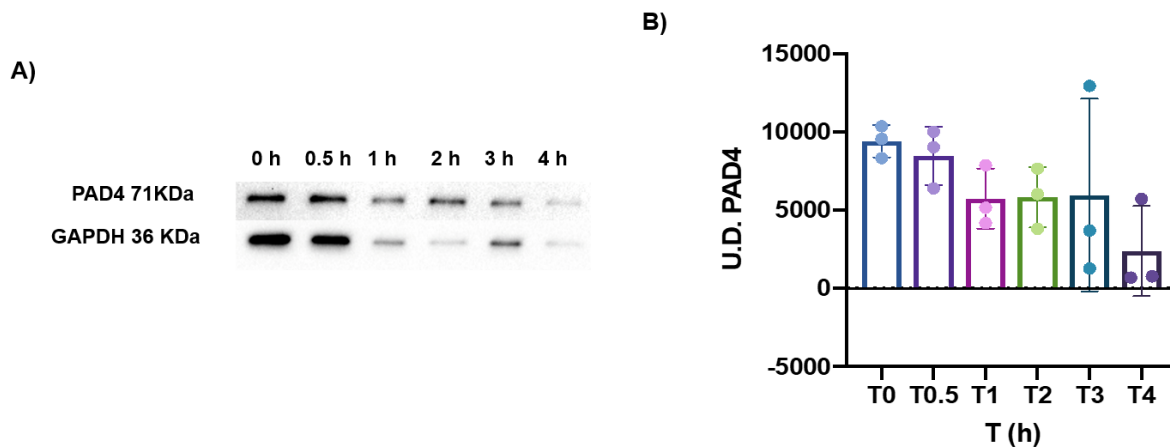


Figura 4. Inmunodetección de PAD4 y su densitometría óptica. A. WB para PAD4. B. Gráfica de D.O. (no es estadísticamente significativo).

6.4 Estandarización de la técnica de WB para la detección de LL-37

Para el péptido antimicrobiano LL-37, pudimos apreciar las bandas correspondientes al péptido completo (18 KDa) y las bandas del péptido intermedio (14 KDa). Además, es posible ver que la expresión de LL-37 decrece en función del transcurso del tiempo en que se le añadió el estímulo de PMA, el control de carga utilizado para este WB fue la GAPDH (5A). En el resultado del análisis densitométrico de los tres experimentos independientes se puede observar que estos cambios son significativos (5B). Los resultados de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey demostraron que T_0 vs $T_{0.5}$, T_1 , T_2 , T_3 y T_4 son estadísticamente significativos.

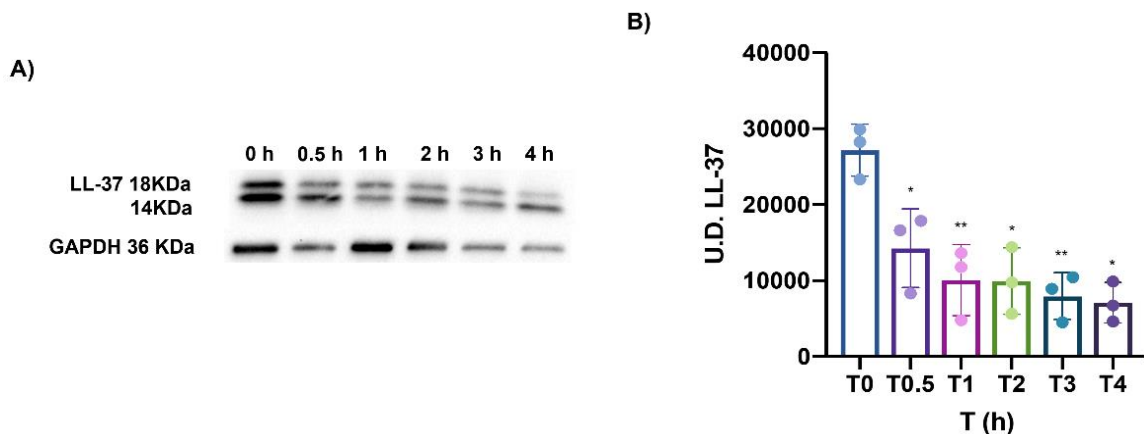


Figura 5. Inmunodetección de LL-37 y su densitometría óptica. A. WB para LL-37. B. Gráfica de D.O. ($p = 0.002$, si es estadísticamente significativo).

6.5 Estandarización de la técnica de WB para la detección de β -actina

Finalmente, para β -actina es posible apreciar la presencia de más bandas por debajo de la banda esperada para esta proteína (aproximadamente 42 KDa), dichas bandas parecen ir en aumento conforme incrementa el tiempo del estímulo (6A). El ajuste densitométrico se realizó con GAPDH como control de carga (6B).

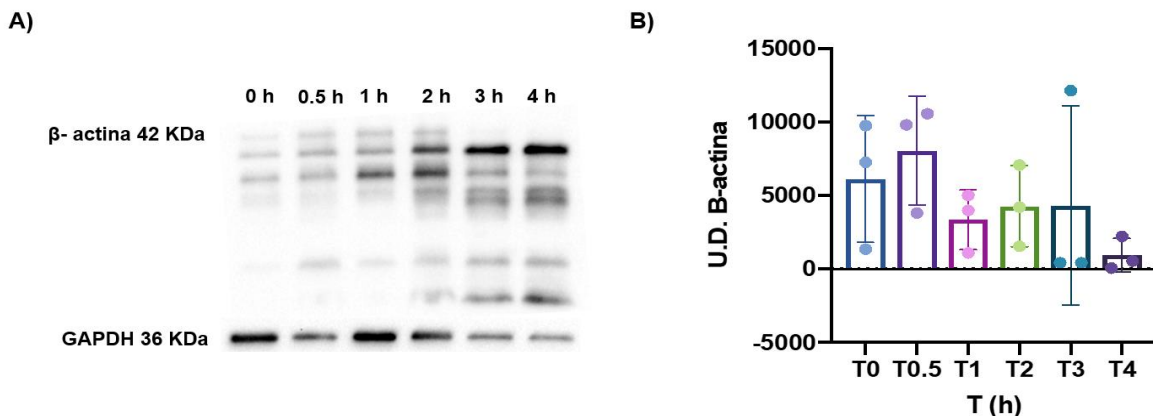


Figura 6. Inmunodetección de β -actina y su densitometría óptica. A. WB para β -actina. B. Gráfica de D.O. (no es estadísticamente significativo).

7. DISCUSIÓN

La liberación de NET es un mecanismo de defensa innato que los neutrófilos utilizan para controlar infecciones microbianas, aunque su presencia en los diferentes tejidos puede llevar a la generación de enfermedades autoinmunes y no autoinmunes, es por eso por lo que el análisis del rol y la detección de los polipéptidos que componen a las NET mediante técnicas de la biología molecular como es el Western Blot nos permiten hallar estas proteínas de manera más específica, sensible y cuantitativa. Previo al desarrollo de la técnica del WB se requiere de una estandarización y evaluación del funcionamiento de esta (Jorch y Kubes, 2017; Stoimenou *et al.*, 2022).

Con base a los resultados obtenidos, se observó que las condiciones utilizadas en la metodología del WB para la identificación de las proteínas que componen a las NET (preparación de los extractos proteicos, concentración de poliacrilamida de los geles, electrotransferencia, bloqueo y concentración de los anticuerpos primarios y secundarios) fueron las adecuadas para poder visualizar las bandas de los polipéptidos de interés.

A pesar de que existieron algunos inconvenientes, como la presencia de ruido en los WB de citH3 y cosas que mejorar dentro de la parte técnica, se pudieron apreciar las señales correspondientes a Histona H3, citH3, PAD4, LL-37 y β -actina. Ghosh, Gilda y Gomes (2014), argumentan que la presencia de ruido en los WB es consecuencia de uno o múltiples factores de la técnica empleada, por lo que la presencia de este en las imágenes pudo ser debida al tipo de membrana usada, alta concentración del anticuerpo primario y/o secundario utilizado y el tiempo junto con las veces de lavado que se le aplicaron a la membrana. Se deberán realizar más WB exclusivos para citH3 con el fin de determinar cuál de estos factores pudo ser el responsable de la aparición de fondo, para así modificarlo hasta la obtención de señales claras.

Por otra parte, en los WB de LL-37 obtenidos se observan 2 bandas por carril características de LL-37 casi traslapadas, las primeras corresponden a las bandas con péptido señal o completo (18 KDa) y las segundas a las bandas sin péptido señal o péptido intermedio (14 KDa); se hubiese esperado otra banda en el peso de 5 KDa, la cual correspondería al péptido antimicrobiano maduro (Murakami *et al.*, 2002). Referente al traslape de las 2 bandas, Rath, Cunningham y Deber (2013) señalan que para obtener señales claras de proteínas que pesen casi lo mismo, es necesario ajustar el porcentaje de acrilamida del gel a utilizar; en este caso, la concentración de acrilamida debió ser mayor, ya que el peso de LL-37 es relativamente bajo.

Puesto a que la liberación de NET es un mecanismo inmune de reciente descubrimiento y a la vez complicado de estudiar debido a que aún no existe una metodología muy clara para el estudio de las biomoléculas que la componen, se

utilizaron como opciones a la GAPDH y β -actina como controles de carga, porque son de los endógenos más utilizados para la mayoría de los estudios en los que se realizan WB por ser altamente conservados, tener un alto nivel de expresión y mostrar estabilidad en las condiciones en las que se somete el experimento, aunque algunos autores difieren en la autenticidad de estos (Chandra *et al.*, 2023; Dittmer y Dittmer, 2006; Eaton *et al.*, 2013). De acuerdo con las señales observadas de estos controles, se notaron grandes diferencias en los niveles de expresión de todos los WB, muy probablemente esa sea la razón por la cual los resultados de los análisis de densitometría óptica no fueron estadísticamente significativos, ya que los niveles de expresión de los endógenos eran distintos a los diferentes tiempos de estímulo con PMA. Para estos casos, se debieron haber probado endógenos que tuvieran alto nivel de expresión y que se encuentren en cantidad similar en todos los carriles empleados, independientemente del tipo de tratamiento que se les haya dado a las células (Butler *et al.*, 2019). Sin embargo, en estos experimentos también incluimos a la β -tubulina como endógeno y de acuerdo con los resultados obtenidos se determinó que la GAPDH y β -actina fueron mejores endógenos, obteniendo mejores resultados con estos.

Adicionalmente, se ha reportado que la inducción *in vitro* de las NET requiere del reordenamiento del citoesqueleto de actina, en donde se evidenció que agentes como el PMA interpelan la reestructuración del citoesqueleto de actina para la formación de NET. Además, se observó que con este mismo agente inductor los neutrófilos presentaban una aparente contracción celular y redondeo, las cuales son características de las primeras fases de la apoptosis (Coleman y Olson, 2002; Sprenkeler *et al.*, 2022). Esto lleva a pensar que quizá las múltiples bandas de los WB de β -actina se traten de fragmentos de actina no polimerizados.

8. CONCLUSIONES

Aunque fue complicado estandarizar la técnica de WB para detectar a las proteínas que componen a las NET, se logró cumplir con la principal finalidad de esta serie de procedimientos, la cual fue observar las señales de los polipéptidos de interés a diferentes tiempos de estímulos con PMA. Otros pasos importantes de la metodología como la titulación de los anticuerpos primarios y secundarios, tiempo de transferencia de las proteínas del gel a la membrana y porcentajes de poliacrilamida de los geles concentradores y separadores que se utilizaron fueron los adecuados, puesto a que no se presentó ningún tipo de inconveniente al desarrollar la metodología, aunque para el caso de los WB de LL-37, si se deseara observar la banda correspondiente al péptido antimicrobiano maduro (5 KDa), la concentración de poliacrilamida de los geles utilizados debería ser mayor, de lo contrario, si sólo se espera estudiar la presencia de bandas de LL-37 sin darle importancia a los demás péptidos, las concentraciones de los geles empleadas en la metodología son las adecuadas.

Finalmente, es muy importante destacar que la GAPDH y β -actina no fueron los controles de carga más adecuados para comparar la expresión de las proteínas que constituyen a las NET. Los resultados de los análisis densitométricos de las proteínas analizadas nos convocan a buscar y probar otros controles endógenos que no estén comprometidos con la formación y liberación de NET.

9. BIBLIOGRAFÍA

Butler, T., *et al.* (2019). Misleading Westerns: Common Quantification Mistakes in Western Blot Densitometry and Proposed Corrective Measures. *BioMed Research International*, 2019, pp. 1 – 15. [doi: 10.1155/2019/5214821](https://doi.org/10.1155/2019/5214821)

Blancher, C. y Jones, A. (2001). SDS -PAGE and Western Blotting Techniques. In: Brooks, S.A., Schumacher, U. (eds) *Metastasis Research Protocols. Methods in Molecular Medicine*, vol 57. Humana Press.

Brinkmann, V., *et al.* (2004). Neutrophil Extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), pp. 1532 – 1535. [doi: 10.1126/science.1092385](https://doi.org/10.1126/science.1092385)

Carmona-Rivera, C. y Kaplan, M.J. (2016). Induction and Quantification of NETosis. *Current Protocols in Immunology*, pp. 14.41.1 – 14.41.14. [doi: 10.1002/cpim.16](https://doi.org/10.1002/cpim.16)

Chandra Mohan, Wayne Speckmann, Robin Clark. (2023). *Loading Controls for Western Blotting*. Sigma-Aldrich. Recuperado el 02 de Julio del 2023 de <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/technical-article/protein-biology/western-blotting/loading-controls-western-blotting>

Coleman, M.L., y Olson, M.F. (2002). Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 9(5), pp. 493 – 504. [doi: 10.1038/sj.cdd.4400987](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400987)

Dittmer, A. y Dittmer, J. (2006). β -Actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. *Electrophoresis*, 27(14), pp. 2844-2845. [doi: 10.1002/elps.200500785](https://doi.org/10.1002/elps.200500785)

Eaton, S., *et al.* (2013). Total Protein Analysis as a Reliable Loading Control for Quantitative Fluorescent Western Blotting. *PLOS ONE*, 8(8), e72457. [doi: 10.1371/journal.pone.0072457](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072457)

Fuchs, T., *et al.* (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*, 176(2), pp. 231-241. [doi: 10.1083/jcb.200606027](https://doi.org/10.1083/jcb.200606027)

Ghosh, R., Gilda, J. E. y Gomes, A. V. (2014). The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Reviews of Proteomics*, 11(5), pp. 549 – 560. [doi: 10.1586/14789450.2014.939635](https://doi.org/10.1586/14789450.2014.939635)

Jorch, S. y Kubes, P. (2017). An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nature medicine*, 23(3), pp. 279 – 287. [doi: 10.1038/nm.4294](https://doi.org/10.1038/nm.4294)

Kennedy, A. y DeLeo, F. (2008). Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunologic Research*, 43(1-3), pp. 25-61. [doi: 10.1007/s12026-008-8049-6](https://doi.org/10.1007/s12026-008-8049-6)

Mahmood, T. y Yang, P.-C. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), pp. 429 – 434. [doi: 10.4103/1947-2714.100998](https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998)

Martinelli, S., et al. (2004). Induction of Genes Mediating Interferon-dependent Extracellular Trap Formation during Neutrophil Differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(42), pp. 44123 – 44132. [doi: 10.1074/jbc.M405883200](https://doi.org/10.1074/jbc.M405883200)

Medina, E. (2009). Neutrophil Extracellular Traps: A Strategic Tactic To Defeat Pathogens With Potential Consequences For The Host. *Journal of Innate Immunity*, 1(3), pp. 176–180. [doi: 10.1159/000203699](https://doi.org/10.1159/000203699)

Murakami, M., et al. (2002). Cathelicidin Antimicrobial Peptides are Expressed in Salivary Glands and Saliva. *Journal of Dental Research*, 81(12), pp. 845 – 890. [doi: 10.1177/1544405910208101210](https://doi.org/10.1177/1544405910208101210)

Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities, *Nature reviews Immunology*, 6(3), pp.173-182. [doi: 10.1038/nri1785](https://doi.org/10.1038/nri1785)

Nauseef, W.M. (2007). How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated review. *Immunological Reviews*, 219(1), pp. 88 – 102. [doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00550.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00550.x)

Owen, J., et al. (2014). *Kuby Inmunología*. McGraw Hill Education, pp. 33 – 35.

Patel, S., et al. (2010). Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation. *Nitric Oxide*, 22(3), pp. 226 – 234. [doi: 10.1016/j.niox.2010.01.001](https://doi.org/10.1016/j.niox.2010.01.001)

Rath, A., Cunningham, F. & Deber, C. (2013). Acrylamide concentration determines the direction and magnitude of helical membrane protein gel shifts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(39), pp. 15668 – 15673. [doi: 10.1073/pnas.1311305110](https://doi.org/10.1073/pnas.1311305110)

Rungelrath, V., Kobayashi, S. & DeLeo, F. (2019). Neutrophils in innate immunity and systems biology-level approaches. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, pp.1-30. [doi: 10.1002/wsbm.1458](https://doi.org/10.1002/wsbm.1458)

Sprekeler, E., et al. (2022). Formation of neutrophil extracellular traps requires actin cytoskeleton rearrangements. *Blood*, 139(21), pp. 3166 – 3180. Recuperado el 12 de Junio del 2023 de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497122000799>

Stoimenou, M., et al. (2022). Methods for the Assessment of NET Formation: From Neutrophil Biology to Translational Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15823), pp. 1 – 16. Recuperado de: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/24/15823>

Urban, C., *et al.* (2009). Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*, 5(10), e1000639. [doi: 10.1371/journal.ppat.1000639](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000639)

Wang, Y., *et al.* (2009). Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *The Journal of Cell Biology*, 184(2), pp. 205 - 213. [doi: 10.1083/jcb.200806072](https://doi.org/10.1083/jcb.200806072)

Wang, Y. y Liu, Y. (2021). Neutrophil-Induced Liver Injury and Interactions Between Neutrophils and Liver Sinusoidal Endothelial Cells. *Inflammation*, 44(4), pp. 1246 – 1262. [doi: 10.1007/s10753-021-01442-x](https://doi.org/10.1007/s10753-021-01442-x)

Yam, J., *et al.* (2012). Trampas extracelulares de neutrófilos (NET), consecuencia de un suicidio celular. *Gaceta Médica de México*, pp. 68 – 75. Recuperado de: https://www.anmm.org.mx/GMM/2012/n1/GMM_148_2012_1_068-075.pdf

Yost, C., *et al.* (2009). Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood*, 113(25), pp. 6419 – 6427. [doi: 10.1182/blood-2008-07-171629](https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-171629)

Yousefi, S., *et al.* (2009). Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death & Differentiation*, 16(11), pp. 1438 – 1444. [doi: 10.1038/cdd.2009.96](https://doi.org/10.1038/cdd.2009.96)

Zhao, W., Fogg, D. y Kaplan, M. (2015). A novel image-based quantitative method for the characterization of NETosis. *Journal of Immunological Methods*, 423, pp. 104 - 110. [doi: 10.1016/j.jim.2015.04.027](https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.04.027)

Zhao, W., *et al.*, A novel image-based quantitative method for the characterization of NETosis, *J. Immunol. Methods* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2015.04.027>