

Estandarización de cultivo de células HL-60 como herramienta en el estudio de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) en el contexto de vasculitis asociada a anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA).

PROYECTO GENÉRICO CORRESPONDIENTE: Evaluación de productos relacionados con la salud

Etapa: Desarrollo de métodos y técnicas analíticas para el control físico, químico, biológico y o microbiológico de productos relacionados con la salud

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Alumno: Fernando Aldair Morales Hurtado

Matricula: 2142030306

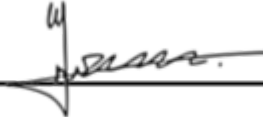
Asesores:

Vo. Bo.



Dr. Alberto Ortega Vázquez.
No. Económico: 35583
Asesor interno.

Vo. Bo.



Dr. Miguel Angel Negreros Almaya.
Cédula: 12359587
Asesor externo

14 de Septiembre del 202

Resumen.

Las trampas extracelulares de neutrófilos (NET) son estructuras en forma de red compuestas por ADN y se ha identificado que desempeñan un papel importante en la patogenia de la vasculitis asociada a ANCA (AAV). Ya que los neutrófilos tienen una vida útil corta que limita su uso, se han generado alternativas, como el uso de células HL-60 diferenciadas a tipo neutrófilo (dHL-60) para estudiar los mecanismos de formación de NET,. En el presente estudio se determinaron las condiciones óptimas de cultivo celular y se utilizó un marcador de superficie celular (CD11b) para determinar la diferenciación de HL-60 a dHL-60. En el cultivo de las células se probaron distintas condiciones: medios con suero fetal bovino (SFB) o Insulina Transferrina Selenio (ITS) como reemplazo del SFB. Para la diferenciación se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) y posteriormente, para la liberación de NET fueron estimuladas con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). La diferenciación se analizó mediante citometría de flujo y las NET fueron visualizadas por microscopía de fluorescencia. Se determinó que la opción más eficiente de cultivo de HL-60 era con ITS así como también la óptima para la liberación de NET. Dicho lo anterior, podemos decir que se estableció con éxito el cultivo de la línea celular HL-60 en el Laboratorio de la clínica de vasculitis del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Lista de abreviaturas

ANCA.	<i>Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies.</i>
AVV.	<i>ANCA-associated vasculitides.</i>
ATCC.	<i>American Type Culture Collection.</i>
ATRA.	<i>all-trans retinoic acid.</i>
CHCC.	Conferencia Internacional de Consenso de Chapel Hill.
dHL-60.	HL-60 diferenciada a tipos neutrófilo.
DMF.	Dimetilformamida.
DMSO.	dimetilsulfóxido.
IMDM.	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium.</i>
ITS.	Insulina-Transferrina-Selenio.
MPO.	Mieloperoxidasa.
NET.	<i>Neutrophil extracellular traps.</i>
PMA.	Forbol 12-miristato 13-acetato.
PR3.	Proteinasa 3.
ROS.	Especies reactivas de oxígeno.
RPMI.	<i>Roswell Park Memorial Institute medium.</i>

ÍNDICE

1. Introducción	4
2. Marco teórico	5
2.1 Vasculitis	5
2.2 Neutrófilos.....	6
2.3 NET.....	7
2.4 Línea celular HL-60.....	7
3. Justificación	8
4. Objetivos	9
4.1 Objetivo general.....	9
4.2 Objetivos específicos.....	9
5. Metodología	9
5.1 Cultivo celular HL-60.....	9
5.2 Conteo celular HL-60.....	10
5.3 Diferenciación HL-60 a HL-60 tipo neutrófilo.	10
5.4 Aislamiento de neutrófilos de sangre periférica.....	11
5.5 Optimización de anticuerpos para la evaluación del estado de diferenciación de HL-60.....	11
5.6 Evaluación del estado de diferenciación de HL-60	11
5.7 Visualización de NET por microscopía de fluorescencia... ..	12
5.6 Análisis estadístico.....	12
6. Discusión de resultados	12
6.1 Expansión línea celular HL-60.....	12
6.2 Optimización de anticuerpos para la evaluación del estado de diferenciación de HL-60	13
6.3 Evaluación del estado de diferenciación de HL-60	15
6.4 Visualización de NET por microscopía de fluorescencia.....	16
7. Conclusiones	17
8. Referencias	18

1. INTRODUCCIÓN

Las vasculitis asociadas a anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (*Antineutrophil Cytoplasm Autoantibodies*. ANCA) (*ANCA-associated vasculitides*. AAV) son un grupo de enfermedades raras que comprenden: granulomatosis con poliangitis (*Granulomatosis With Polyangiitis*. GPA); poliangitis microscópica (*microscopic polyangiitis* MPA) y granulomatosis eosinofílica con poliangitis (*eosinophilic granulomatosis with polyangiitis*. EGPA) (Jennette et al. 2013). Se desconoce el mecanismo preciso que juegan los ANCA en AAV pero hay evidencia de que en la patogenia de esta enfermedad se involucra la activación excesiva de neutrófilos mediada por ANCA que posteriormente liberan citocinas inflamatorias, especies reactivas de oxígeno y enzimas líticas. Además, esta activación excesiva de los neutrófilos por parte de los ANCA induce la formación de las trampas extracelulares de neutrófilos (*Neutrophil extracellular traps*. NET). Aunque las NET son elementos esenciales en la inmunidad innata, la formación excesiva de NET es perjudicial para los vasos pequeños. Además, los NET están involucrados no solo en la lesión vascular mediada por ANCA, sino también en la producción de los propios ANCA. (Nakazawa et al; 2019), por lo tanto, se considera un ciclo que se retroalimenta, la formación de NET y producción de ANCA. Aunque las NET se han caracterizado principalmente en neutrófilos aislados de sangre periférica, la labilidad intrínseca de este tipo celular ha dificultado su estudio.

Las células HL-60 pueden diferenciarse en células similares a neutrófilos (dHL-60) utilizando ácido trans retinoico (*all-trans retinoic acid*. ATRA) o dimetilsulfóxido (DMSO). Distintos autores han estudiado este modelo con el fin de reducir la variabilidad intrínseca asociada a las diferentes condiciones y entornos de los ensayos. (Manda-Handzlik et al. 2018; Manda-Handzlik et al. 2020; Obama et al. 2019). Recientemente Guo et al 2021 publicaron una metodología usando como modelo experimental las células HL-60 este modelo permite la formación de NET *in vitro* de una manera más eficiente evitando el uso de suero fetal bovino y maximizando la formación de NET sin afectar la viabilidad celular. Estos resultados se contraponen con los expuestos por Manda-Handzlik et al 2018 donde exponen que se obtiene un mejor rendimiento en la formación de NET en dHL-60 usando SFB y dimetilformamida (DMF). Esto evidencia la controversia que existe respecto a la estandarización de un proceso para la estimulación y formación de NET en las HL-60. Recientemente d'Alessandro et al. 2022 publicaron una revisión donde proponen que los futuros tratamientos en el contexto de AAV estén dirigidos a la inhibición farmacológica de las NET ya que demostraron que estas últimas están implicadas en la patogénesis de la enfermedad.

Consideramos que este modelo (HL-60) puede brindar datos importantes para una mejor comprensión de las NET en el contexto de la AAV. Por ello es de nuestro interés establecer el cultivo de la línea celular HL-60, para conocer la mejores condiciones para su expansión, preservación y diferenciación, lo cual permitirá

generar un modelo útil para los objetivos de estudio del Laboratorio de la clínica de vasculitis sistémicas primarias.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Vasculitis

Como se establece en la Nomenclatura de Vasculitis de la Conferencia Internacional de Consenso de Chapel Hill (CHCC) revisada en el año 2012, las vasculitis se caracterizan por un proceso destructivo inflamatorio sistémico de los vasos sanguíneos, que resulta en alteraciones isquémicas o hemorrágicas. Las vasculitis pueden ser primarias (Trastorno idiopático) o secundarias en las que la inflamación está relacionada con la presencia de una causa subyacente bien definida (infecciones, enfermedades del tejido conectivo, hipersensibilidad o trastornos autoinmunes). Las vasculitis primarias se pueden clasificar en 3 grandes grupos dependiendo del tipo de vaso involucrado y son: vasculitis de vaso grande, vasculitis de vaso mediano y vasculitis de vaso pequeño. (Jennette et al. 2013)

Dentro de la vasculitis de vaso pequeño existen las vasculitis asociada a auto-anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (AAV). En las AAV se incluye a un grupo que comprenden la Poliangeítis microscópica MPA; la Granulomatosis con poliangeítis GPA, y la Granulomatosis eosinofílica con poliangeítis EGPA; enfermedades autoinmunes sistémicas poco comunes pero potencialmente mortales por su capacidad de necrosar el tejido (Lamprecht et al. 2018)(Jennette et al. 2013). La GPA está altamente asociado con los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) específicos de proteinasa 3 (PR3), mientras que la MPA y, con menos frecuencia, la EGPA están asociados con los ANCA específicos de mieloperoxidasa (MPO). La mayoría de los pacientes con AAV presentan manifestaciones que amenazan distintos órganos de forma simultánea cómo los riñones o pulmones, es decir, enfermedad generalizada (Lamprecht et al. 2018)

Los ANCA dirigidos contra la PR3 y la MPO expresada por las células inmunitarias innatas son características diagnósticas y patogénicas destacadas de la AVV. Cabe mencionar que esta última está estrechamente relacionada con la presencia y activación de un tipo celular en particular: los neutrófilos, ya que se ha visto que puede conducir a lesiones vasculares, generación de NET, apoptosis y necrosis (Jennette & Falk 2014). Los ANCA participan en la migración y activación de los neutrófilos provocando la liberación de ROS y proteasas a través de la degranulación celular (Lamprecht et al. 2018).

2.2 Neutrófilos

Los neutrófilos son células leucocitarias de la línea mieloide que pertenecen al sistema inmunitario innato. Se encuentran en la circulación sistémica lo que les permite ser los primeros en interactuar con organismos patógenos durante el proceso infeccioso y participar de manera importante en el proceso de inflamación aguda (Liew & Kubes. 2019).

El neutrófilo inicia como célula mieloide en la médula ósea y tiene que madurar antes de pasar a circulación sistémica. El camino de la célula mieloide predeterminada a neutrófilos maduros es la siguiente: mieloblasto → promielocitos → mielocitos → metamielocito → neutrófilos en cayados → neutrófilo (figura 1)(Borregaard. 2010). Los neutrófilos diferenciados terminalmente pierden su capacidad de proliferación y, por lo tanto, no pueden expandirse en cultivo (Blanter et al 2021).

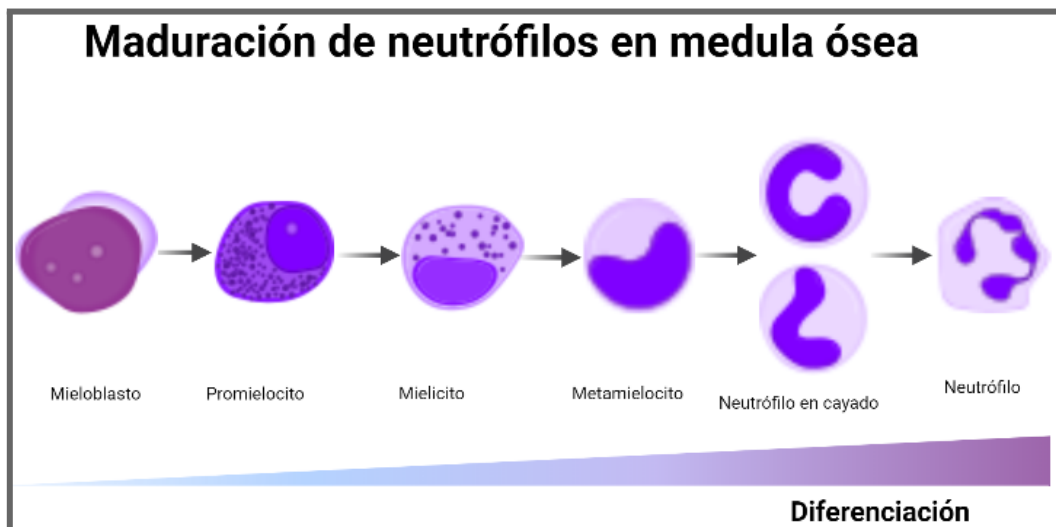


Figura 1. Maduración de los neutrófilos en médula ósea (Elaborada por los autores de este trabajo).

Mientras están en circulación, los neutrófilos maduros tienen un núcleo segmentado y miden entre 7 y 10 μm de diámetro y un citoplasma enriquecido con gránulos y vesículas secretoras. Los gránulos del citoplasma de los neutrófilos juegan un papel importante en la eliminación de patógenos. Los gránulos de los neutrófilos se clasifican en al menos cuatro tipos: Gránulos primarios o azurófilos, consisten en MPO y proteasas neutras catépsina G, elastasa y PR3 así como defensinas. Estos son responsables de la liberación de proteínas y péptidos que están dirigidos a la eliminación y digestión de patógenos y son los primeros que se producen durante el desarrollo de los neutrófilos; Los gránulos secundarios o específicos contienen lactoferrina que secuestra hierro y cobre y otras proteínas como el citocromo b 558; Los gránulos terciarios o de gelatinasa contienen proteínas de gelatinasa como la

matriz metaloproteinasa-9, que es importante para degradar la matriz extracelular y activar la IL-1 β , entre otras funciones. Los gránulos secretores contienen albúmina sérica y citocinas preformadas (Borregaard. 2010). La acción de los gránulos está respaldada por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que también pueden dañar a los patógenos tanto intracelular como extracelularmente.

2.3 NET

Otra forma en la que los neutrófilos reaccionan contra los patógenos es a través de la liberación de NET que son estructuras fibrosas de ADN que liberan los neutrófilos, una vez liberado el DNA se le agregan distintas proteínas como elastasa de neutrófilos e histonas. Atrapar y eliminar patógenos es la función principal de los NET (Liew & Kubes. 2019). De manera regular, se ha observado la presencia de NET como defensa antimicrobiana, en condiciones fisiológicas, sin embargo también se ha observado este tipo de respuesta en cultivos *in vitro* con el uso de estímulos estériles como el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), el urato monosódico y los cristales deshidratados de pirofosfato de calcio (Masuda et al. 2017). No solo se ha estudiado la capacidad de liberar NET por parte de los neutrófilos también se ha estudiado su capacidad antimicrobiana, así lo hicieron Yaseen et al. 2017 y determinaron que la actividad antimicrobiana se veía disminuida en las NET liberadas por dHL-60 frente a las liberadas por neutrófilos humanos. En 2021 Gou et al determinaron que es mayor la capacidad de liberar NET por parte de dHL-60 en medios de cultivo que estaban libres de SFB.

2.4 Línea celular HL-60

Las células HL60 son un tipo de células leucémicas mieloides aisladas por primera vez a partir de una paciente femenina de 36 años diagnosticada con leucemia mieloide aguda (LMA) o la fase blástica de la leucemia mieloide crónica (LMC) y tratada en el Hospital M.D. Anderson de Texas. (Collins et al. 1977 y Gallagher et al. 1979) Las HL-60 son promielocitos (figura 2), los promielocitos tienen núcleos ligeramente ovalados y citoplasma de color rosa pálido que contiene gránulos rosa-rojizos pequeños, mal definidos y claros.

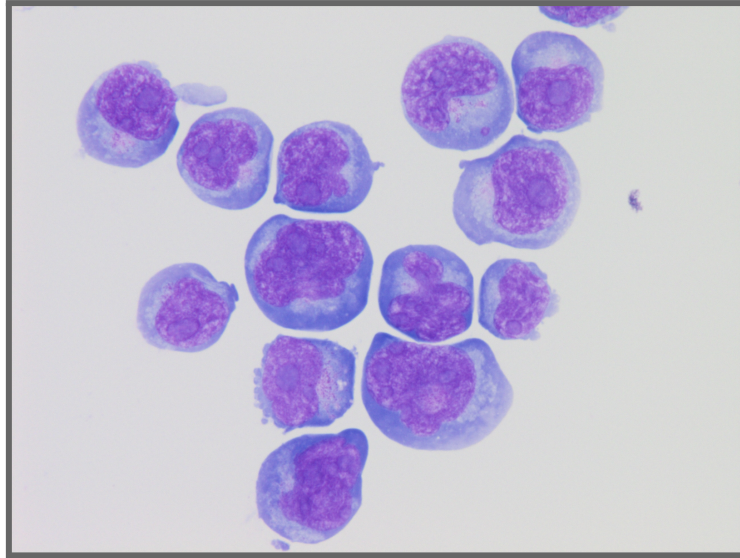


Figura 2. Células HL-60 en tinción de Wright vistas en microscopio (*Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH*)

Es una línea celular en suspensión se pueden diferenciar en células similares a los neutrófilos al tratarlas con ácido retinoico todo-trans (ATRA), compuestos planos polares (DMSO y dimetilformamida [DMF]), actinomicina D o dibutiril AMP cíclico (dbcAMP). Otros compuestos (vitamina D) pueden conducir a la diferenciación hacia un fenotipo más monocítico (Blanter et al 2021). Una vez diferenciadas se ha reportado que expresan los marcadores de superficie celular CD11b, CD16 y CD66b (Guo et al 2021)

3. JUSTIFICACIÓN

Distintos autores han sugerido que la comprensión de los mecanismos usados por los neutrófilos en el uso de las NETs puede conducir a nuevos tratamientos y facilitar el diagnóstico de AAV (Ge et al. 2022; Nakazawa et al; 2019, Negreros & Flores; 2018 y Lee et al; 2017), sin embargo los neutrófilos humanos son células terminales de vida corta que no se dividen y mueren rápidamente por apoptosis. De hecho, una vez aislados de la sangre periférica, los neutrófilos deben utilizarse inmediatamente para todo tipo de ensayos, ya que experimentan una rápida apoptosis (Ge et al. 2022), dificultando el uso de estas células *in vitro*. Sin embargo, existen procedimientos experimentales que hacen posible el uso de modelos para el estudio de los neutrófilos y este es el caso de la línea celular HL-60 (Blanter et al 2021).

La línea celular HL-60 ha demostrado ser una herramienta invaluable en diferentes áreas de la biología de los neutrófilos y se ha utilizado para múltiples propósitos como lo son proporcionar información sobre los mecanismos reguladores de la diferenciación normal de los neutrófilos y realizar procedimientos de marcado prolongados para el análisis de procesos metabólicos o de biosíntesis de macromoléculas que son difíciles de llevar a cabo en granulocitos maduros (Mollinedo et al, 1998). Aunque esta herramienta se conoce desde hace varias décadas, las nuevas investigaciones han demostrado el papel central que juegan las NET en la patogenia de AAV (Guo et al 2021). Consideramos que este modelo (HL-60) puede brindar datos importantes para una mejor comprensión de las NET en el contexto de la AAV. Por ello es de nuestro interés establecer este cultivo celular en el contexto de las necesidades de este laboratorio.

4. OBJETIVOS

4.1 General:

Establecer el cultivo de HL-60 en el Laboratorio de la Clínica de Vasculitis Sistémicas Primarias.

4.2 Específicos:

1. Determinar las condiciones idóneas para descongelar, cultivar y expandir la línea celular HL-60.
2. Optimizar las técnicas para evaluar la expresión de marcadores específicos de neutrófilos.
3. Evaluar la diferenciación y viabilidad del cultivo celular post tratamiento de diferenciación.
4. Analizar la capacidad de liberación de NETs en presencia de inductores.

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.

5.1 Cultivo celular HL-60.

La línea celular se obtuvo de la *American Type Culture Collection* (ATCC) No. Cat. CCL-240. Las células se descongelaron y cultivaron de acuerdo a las recomendaciones del proveedor (ATCC). Se usó *Iscove's Modified Dulbecco's*

Medium (IMDM Gibco. No. cat. 12440-053) como medio de cultivo, enriquecido con SFB al 20% (Sciencell No. Cat. 0500) descomplementado, L-glutamina (Glutamax 100x Gibco. No. Cat. 35050-061) y antibiótico (1X Pen- Strep No Cat. 15140122) y fueron sembradas en cajas de cultivo celular T25 (Corning cat. 430168), en una atmósfera humidificada con una concentración de CO₂ al 5% a un temperatura de 37°C, ésta condición se usó también para descongelar las células, al primer pasaje se disminuyó la concentración de SFB a 10% y se continuó expandiendo hasta alcanzar una confluencia de 4x10⁵ células/mL. Se probaron 3 condiciones más de cultivo: RPMI SFB 10%; IMDM SFB 10% ITS 1X e IMDM ITS 1%,

- RPMI SFB 10%. Se usó el medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI) 1640 (BioWhittaker cat. 12-167F), enriquecido con SFB al 10% descomplementado, L-glutamina y antibiótico.
- IMDM ITS 1X. Se usó IMDM como medio de cultivo, enriquecido con Insulina Transferrina Selenio (ITS. Gibco Cat. No. 41400-045), L-glutamina 1X y antibiótico 1X.
- IMDM SFB 10% ITS 1X. Se usó IMDM como medio de cultivo, enriquecido SFB al 10% descomplementado, L-glutamina 1X, antibiótico 1X e ITS 1X

5.2 Conteo celular HL-60

Para contar las células HL-60 se tomó una muestra homogénea del cultivo y fueron teñidas con azul tripano en una proporción 1:1. Se añadieron 10 µL de muestra y 10 µL de azul tripano en un tubo cónico de 0.6 mL, se homogeneizó y fue llevado a la cámara de Neubauer, las células que presentaban coloración azul se contaron como células muertas. Se tomaron en cuenta 4 regiones de la cámara de Neubauer para tener un conteo representativo como se muestra en la figura 2.

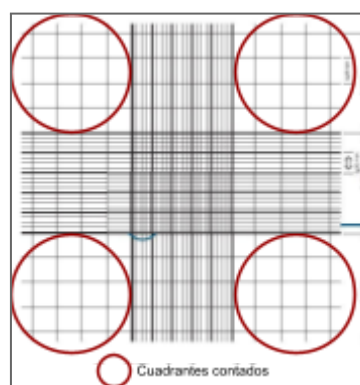


Figura 2. Retícula de cámara de Neubauer y cuadrantes seleccionados para conteo. (Elaborada por los autores de este trabajo)

5.3 Diferenciación HL-60 a HL-60 tipo neutrófilo.

Para inducir la diferenciación de las células HL-60 a dHL-60 se usó DMSO al 1.5% (Sigma- Aldrich Cat. No. D2650-5X5ML), fueron sometidas al estímulo por 5 días, el medio de cultivo fue renovado a los 3 días.

5.4 Aislamiento de neutrófilos de sangre periférica.

Se obtuvieron 20 mL de sangre por venopunción directa en tubos con EDTA de donador sano, las muestras fueron procesadas inmediatamente. Los $\Delta\Delta$ polimorfonucleares se aislaron por medio del reactivo polymorphprepTM Se utilizaron en una proporción 1:1 y fueron centrifugados a 500 g por 35 minutos. Se removió la capa granulocítica cuidando de no mezclar las distintas fases y se suspendió en RPMI (Gibco Cat. No. 11835-030). Las células fueron lavadas para eliminar los remanentes eritrocitarios con medio amortiguador hipotónico de lisis y luego fueron centrifugadas a 150g por 3 minutos. Se evaluó la viabilidad por medio de tinción con azul tripano y conteo en cámara de Neubauer.

5.5 Optimización de anticuerpos para la evaluación del estado de diferenciación de HL-60.

Para evaluar el estado de diferenciación se utilizó un anticuerpo anti-CD11b acoplado a PE (PE anti-mouse/human CD11b Antibody. Biolegend. Cat. No. 101207) para optimizar este proceso se realizó una titulación del anticuerpo en neutrófilos. Se usó una muestra de sangre periférica extraída de donador sano, se usó buffer de lisis para eritrocitos para descartar este tipo de células y luego fueron teñidas a 3 concentraciones con: 25 ng/uL, 50 ng/uL, 100 ng/uL Y 200 ng/uL con anti-CD11b acoplado a PE. Se usó un citómetro de flujo BD FACSCanto II (BD Biosciences) y los datos fueron analizados en el programa FlowJo (Software FlowJo LLC, Ashland, Oregón EE.UU).

5.6 Evaluación del estado de diferenciación de HL-60

Para evaluar el estado de diferenciación de las células HL-60 a dHL-60 tipo neutrófilo se detectó la expresión de los receptores de membrana CD11b mediante la tinción con anticuerpo anti-CD11b acoplado a PE, la concentración óptima se determinó mediante titulación descrita previamente y se utilizó un citómetro de flujo BD FACSCanto II (BD Biosciences). Los datos fueron analizados en el programa fast flow.

5.7 Visualización de NET por microscopía de fluorescencia.

Para la visualización de NET se sembraron 2×10^4 dHL-60 y HL-60 en 300 μ L de RPMI-1640 sin rojo fenol (Gibco No. Cat. 11564456) en placas de 24 pozos. Se incubaron durante 30 min a 37 °C, 5 % CO₂ para promover la adherencia.

Posteriormente se estimularon con PMA (20 nM, concentración final) durante 4 horas, como control negativo se utilizó solo medio RPMI-1640. Finalmente se agregó 30 μ L de SYTOX™ Green Ready Flow™ (No. Cat. R37168) y se visualizaron inmediatamente en el microscopio de fluorescencia (excitación: 485 nm, emisión: 535 nm).

5.8 Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico del conteo celular se realizó una curva de crecimiento de las 4 condiciones sembradas durante 3 días contando las células cada 24 horas, el registro de las curvas de crecimiento se realizó en hojas de cálculo de google (online) y se realizó una prueba ANOVA utilizando la versión GraphPad Prism 8 (Software GraphPad, San Diego, California, EE.UU).

Para determinar el estado de diferenciación de HL-60 a dHL-60 los experimentos fueron realizados por triplicado y se les aplicó una prueba t de student con una significancia estadística de con un valor de $p < 0.05$.

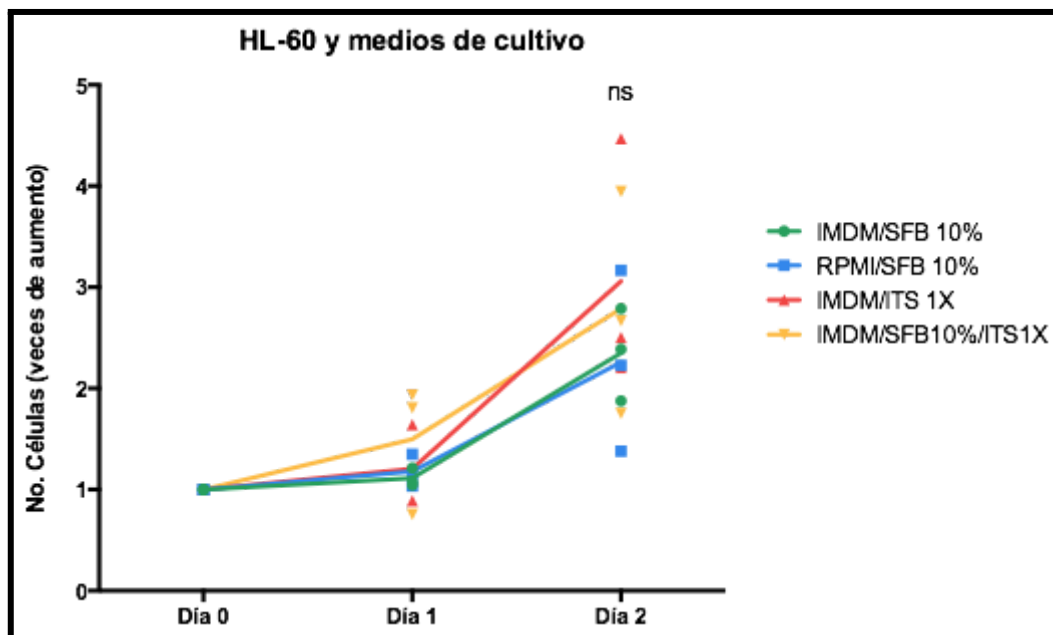
6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

6.1 Expansion línea celular HL-60.

Es la primera vez que se trabaja con la línea celular HL-60 en este Laboratorio y para determinar las condiciones óptimas de cultivo se probaron 4 condiciones. Se ha reportado que la expresión de los receptores de insulina y transferrina son importantes en la proliferación de las HL-60 (Mollinedo et al. 1980) por lo tanto se usó el ITS como la opción sin suero. Distintos autores han publicado los resultados obtenidos al cultivar HL-60 con RPMI 1640 y resultan idóneos para la expansión de las células (Guo et al 2021; Manda-Handzlik et al. 2018; Manda-Handzlik et al. 2020; Obama et al. 2019). Sin embargo el proveedor de la línea celular recomienda el uso de IMDM para su cultivo.

En la gráfica 1 se muestran las curvas de crecimiento resultado de tres experimentos independientes, en verde se muestra la curva correspondiente a IMDM/SFB/10%, en azul RPMI/SFB 10%, en rojo IMDM/ITS y en amarillo

IMDM/SFB10%/ITS. Y aunque pareciera que las células en IMDM/ITS y en IMDM/SFB10%/ITS (líneas roja y amarilla, respectivamente) crecen más que las otras dos, esto resulta no significativo ($p=0.96$). A pesar de este resultado, hemos decidido quedarnos con el medio IMDM con ITS (línea roja) de acuerdo a dos criterios. El primero es que de acuerdo a lo reportado por Guo y colaboradores en 2021, donde encontraron que la liberación de NET en células dHL-60 es mucho mayor en medios libres de suero. El segundo, es la composición del suero, la cual resulta en un factor que genera confusión, ya que los elementos que su composición es compleja y puede afectar el resultado de los experimentos. Y el tercero, es un motivo económico, ya que el SFB es un complemento de costo significativo.



Gráfica 1. Comparación del crecimiento de las células HL-60 en distintos medios de cultivo.

6.2 Optimización de anticuerpos para la evaluación del estado de diferenciación de HL-60

Para determinar la concentración más eficiente de anticuerpo anti-CD11b-PE se tituló a 4 concentraciones en neutrófilos de sangre periférica de donador sano.

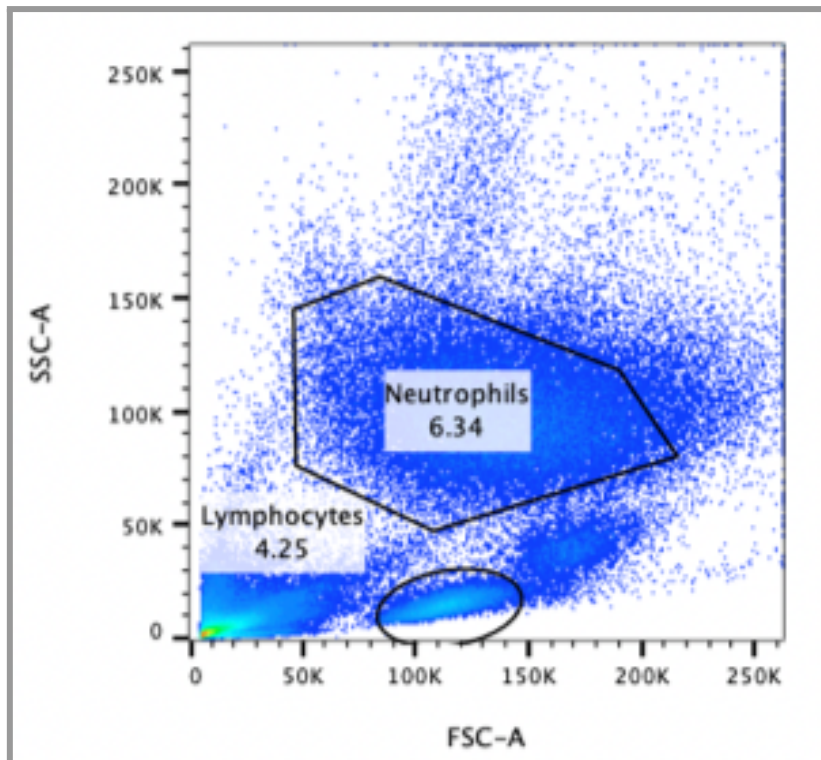


Figura 3. Diagrama de dispersión SSC vs FSC de muestra de sangre periférica

La estrategia de análisis realizada de acuerdo a lo descrito por Rico et al. 2021 nos permitió seleccionar la población de neutrófilos (figura 3) para posteriormente analizar el marcaje con anti-CD11b-PE.

Las 4 concentraciones seriadas muestran un comportamiento similar en sus respectivos histogramas. Por una parte, se observa que los neutrófilos se tiñen positivamente con el anticuerpo anti-CD11b mientras que la población de linfocitos (que se usó como un control negativo) no muestra señal detectable de PE en ambos casos, tanto como para la concentración más baja (25 ng/μL) como la más alta (200 ng/μL). Por lo anterior podemos determinar que nuestro marcaje fue efectivo y en lo subsecuente se procede a utilizar la concentración menor.

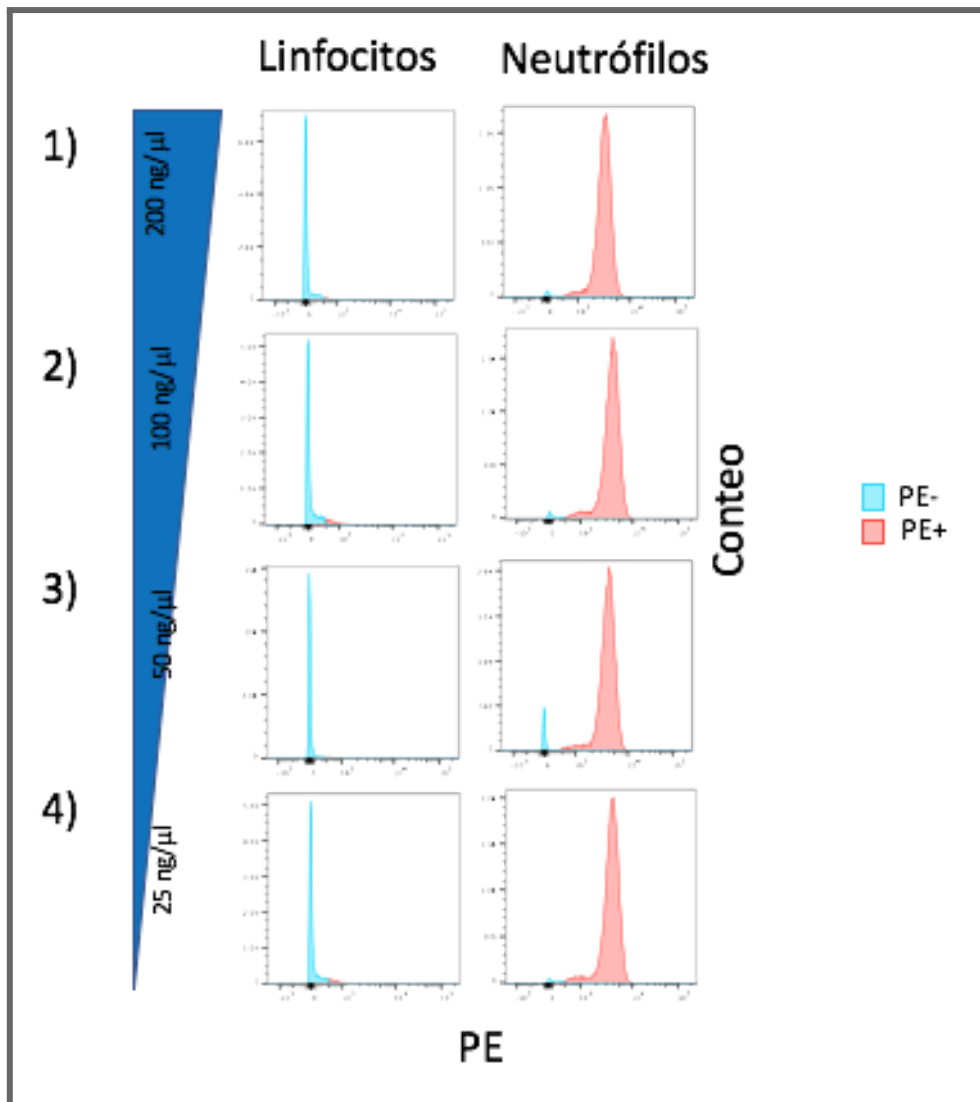


Figura 4. Histogramas resultado de la citometría de flujo del marcador CD11b-PE en distintas concentraciones en linfocitos y neutrófilos de sangre periférica.

6.3 Evaluación del estado de diferenciación de HL-60

Por citometría de Flujo encontramos que el marcador CD11b, característico de células diferenciadas, está aumentado significativamente en células tratadas con DMSO por 5 días en comparación con el control. Cabe mencionar que este lapso de tiempo se definió con base en reportes previos de Guo et al. 2021, ya que ahí se encontraba el máximo número de diferenciación celular con el menor número de muerte celular.

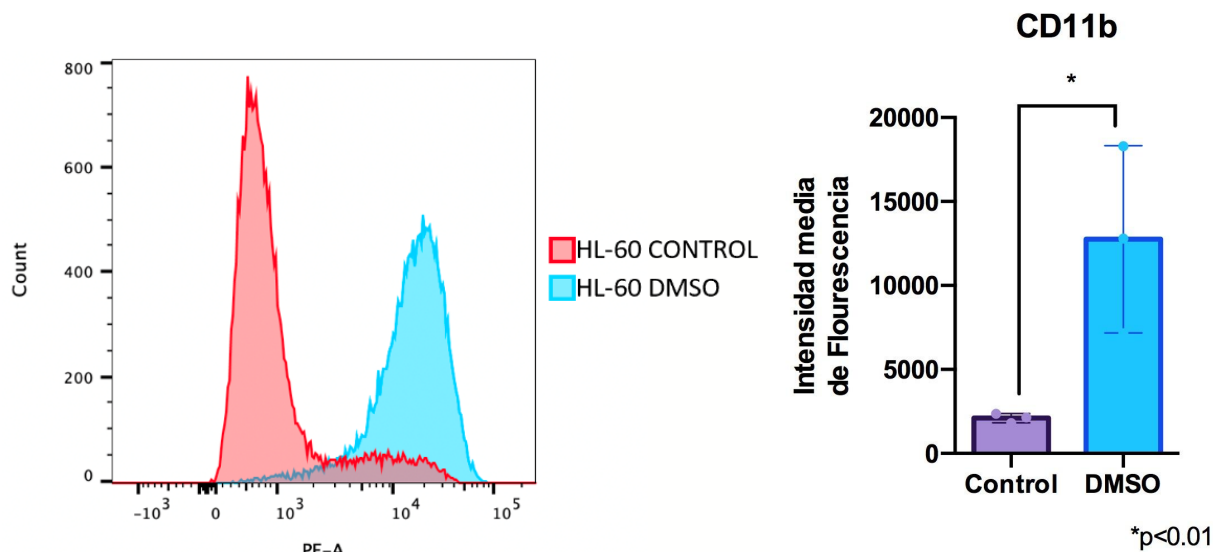


Figura 5. Análisis de expresión de CD11b en HL-60. A la izquierda se muestran los histogramas representativos de las HL-60 tratadas con DMSO 1.5% (azul) y control (rojo). A la derecha, la gráfica de barras de tres experimentos independientes de la intensidad media de fluorescencia de las células tratadas con DMSO 1.5% (azul) y control (morado).

6.4 Visualización de NET por microscopía de fluorescencia.

Se utilizó el reactivo SYTOX™ *Green Ready Flow™*, el cual es un intercalante que al unirse al DNA puede ser identificado en el microscopio de fluorescencia. Además cuenta con la característica de no ser permeable a la membrana celular, por lo cual puede distinguir el DNA que se encuentra dentro del núcleo del que está de forma extracelular, este último característico de las NET. Lo que encontramos es que en las células diferenciadas con DMSO (dHL60) y estimuladas con PMA (fig. 6 panel a) se muestra una mayor cantidad de fluorescencia en comparación con su control directo, las células diferenciadas con DMSO pero sin PMA (panel b) y a los controles de diferenciación (sin DMSO) con y sin PMA (paneles c y d, respectivamente). Esto obedece a que el PMA es un inductor de la liberación de NET, pero solo sucede en las células que poseen la capacidad de hacerlo, es decir las células diferenciadas.

La señal verde encontrada en las células diferenciadas y tratadas con PMA sugiere la presencia de NET ya que las formas que adquiere el DNA son de fibras alargadas y corresponde a lo visto por distintos autores (de Buhr & Köckritz-Blickwede 2016; McIlroy et al. 2014; Ma et al. 2017). En los controles, las células HL-60 no diferenciadas con DMSO (Figura 6 c,d) se observa poca señal, y que por lo observado en las imágenes de campo claro, parece ser intracelular, por lo que podría ser atribuible a la permeabilidad de la membrana adquirida en procesos de muerte celular de acuerdo a lo descrito por McIlroy et al. 2014. A simple vista no hay diferencias entre las estimuladas con PMA de las que no lo fueron (figura 6 c y d).

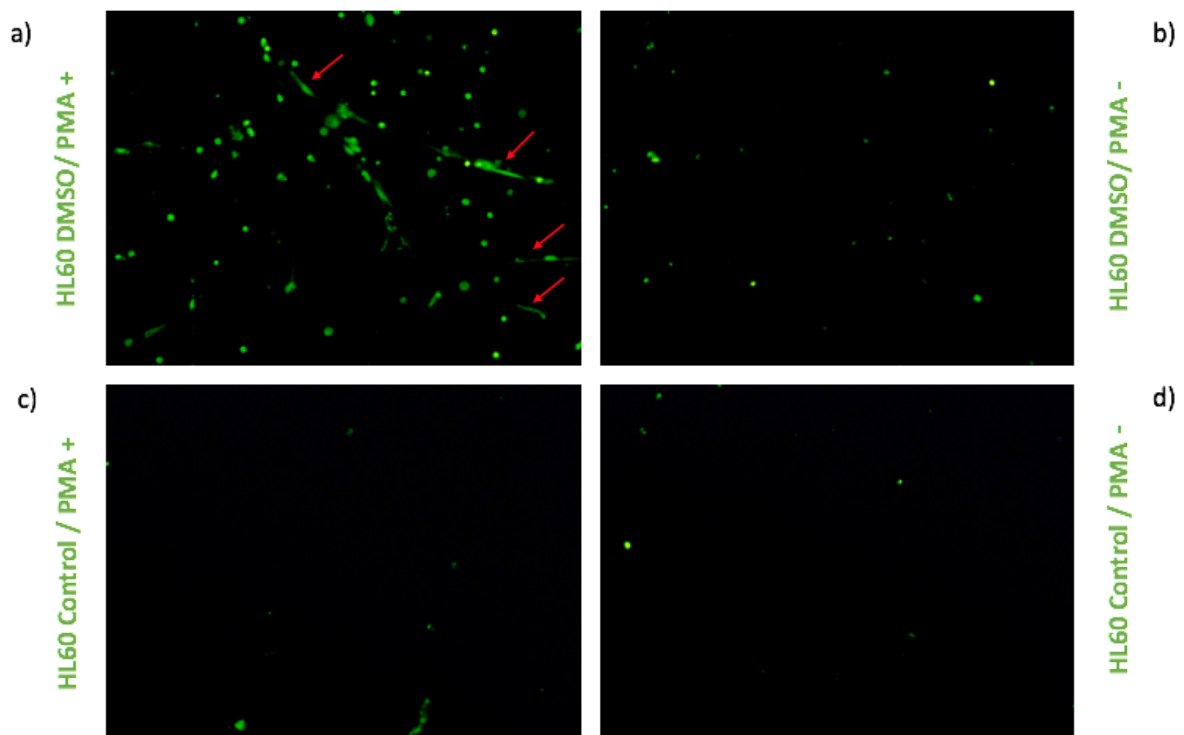


Figura 6. Análisis de microscopía de inmunofluorescencia de NET liberados por células HL-60.

7. CONCLUSIONES

Las 4 condiciones de cultivo son idóneas para descongelar, cultivar y expandir las células sin embargo se eligió IMDM/ITS porque en el contexto del estudio de las NET y la relación con AAV el uso de medio sin suero aumenta la capacidad de liberación de NET por parte de las dHL-60.

A pesar de que se logró una titulación adecuada del anticuerpo anti-CD11b la cual nos permitió separar de manera óptima poblaciones positivas de las negativas, se necesita continuar trabajando en este protocolo. Lo anterior es debido a que CD11b no es por sí mismo un marcador de neutrófilos, aunque en la literatura se utilice de esta manera. En el futuro se deberá utilizar otros marcadores como CD16 y CD66b, que hagan mucho más robusta la identificación de la población que buscamos y que permitan discriminar otras poblaciones leucocitarias. Aun así creemos que las células están en un proceso de diferenciación al menos parcial, ya que son capaces de liberar NET, como se detectó con el microscopio de fluorescencia.

Ha sido un reto el descongelar, cultivar y congelar la línea celular HL-60, ya que continúa siendo controversial la estandarización del cultivo de estas células sin

embargo se logró estandarizar el cultivo de HL-60 en el Laboratorio de la clínica de vasculitis del INER, lo cual servirá como punto de partida de nuevas investigaciones en el contexto de AAV ya que se establece un modelo que facilita el estudio de las NET.

REFERENCIAS

1. Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33(5), 657–670. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011>
2. Blanter, M., Gouwy, M., & Struyf, S. (2021). Studying Neutrophil Function in vitro: Cell Models and Environmental Factors. *Journal of inflammation research*, 14, 141–162. <https://doi.org/10.2147/JIR.S284941>
3. Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E., & Gallo, R. C. (1978). Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(5), 2458–2462. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.5.2458>
4. d'Alessandro, M., Conticini, E., Bergantini, L., Cameli, P., Cantarini, L., Frediani, B., & Bargagli, E. (2022). Neutrophil Extracellular Traps in ANCA-Associated Vasculitis and Interstitial Lung Disease: A Scoping Review. *Life (Basel, Switzerland)*, 12(2), 317. <https://doi.org/10.3390/life12020317>
5. de Buhr, N., & von Köckritz-Blickwede, M. (2016). How Neutrophil Extracellular Traps Become Visible. *Journal of immunology research*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4604713>
6. Eash, K. J., Greenbaum, A. M., Gopalan, P. K., & Link, D. C. (2010). CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *The Journal of clinical investigation*, 120(7), 2423–2431. <https://doi.org/10.1172/JCI41649>
7. Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., & Gallo, R. (1979). Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 54(3), 713–733.
8. Ge, S., Zhu, X., Xu, Q., Wang, J., An, C., Hu, Y., Yang, F., Wang, X., Yang, Y., Chen, S., Jin, R., Li, H., Peng, X., Liu, Y., Xu, J., Zhu, M., & Shuai, Z. (2022). Neutrophils in ANCA-associated vasculitis: Mechanisms and implications for management. *Frontiers in pharmacology*, 13, 3957. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.957660>
9. Guo, Y., Gao, F., Wang, Q., Wang, K., Pan, S., Pan, Z., Xu, S., Li, L., & Zhao, D. (2021). Differentiation of HL-60 cells in serum-free hematopoietic cell media enhances the production of neutrophil extracellular traps. *Experimental and therapeutic medicine*, 21(4), 353. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.9784>

10. Jennette, J. C., & Falk, R. J. (2014). Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-mediated disease. *Nature reviews. Rheumatology*, 10(8), 463–473. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.103>
11. Jennette, J. C., Falk, R. J., Bacon, P. A., Basu, N., Cid, M. C., Ferrario, F., Flores-Suarez, L. F., Gross, W. L., Guillevin, L., Hagen, E. C., Hoffman, G. S., Jayne, D. R., Kallenberg, C. G., Lamprecht, P., Langford, C. A., Luqmani, R. A., Mahr, A. D., Matteson, E. L., Merkel, P. A., Ozen, S., ... Watts, R. A. (2013). 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis and rheumatism*, 65(1), 1–11. <https://doi.org/10.1002/art.37715>
12. Lamprecht, P., Kerstein, A., Klapa, S., Schinke, S., Karsten, C. M., Yu, X., Ehlers, M., Epplen, J. T., Holl-Ulrich, K., Wiech, T., Kalies, K., Lange, T., Laudien, M., Laskay, T., Gemoll, T., Schumacher, U., Ullrich, S., Busch, H., Ibrahim, S., Fischer, N., ... Müller, A. (2018). Pathogenetic and Clinical Aspects of Anti-Neutrophil Cytoplasmic Autoantibody-Associated Vasculitides. *Frontiers in immunology*, 9, 680. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00680>
13. Lanotte, M., Martin-Thouvenin, V., Najman, S., Balerini, P., Valensi, F., & Berger, R. (1991). NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood*, 77(5), 1080–1086.
14. Liew, P. X., & Kubes, P. (2019). The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiological reviews*, 99(2), 1223–1248. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2018>
15. Nakazawa, D., Masuda, S., Tomaru, U., & Ishizu, A. (2019). Pathogenesis and therapeutic interventions for ANCA-associated vasculitis. *Nature reviews. Rheumatology*, 15(2), 91–101. <https://doi.org/10.1038/s41584-018-0145-y>
16. Negreros, M., & Flores-Suárez, L. F. (2021). A proposed role of neutrophil extracellular traps and their interplay with fibroblasts in ANCA-associated vasculitis lung fibrosis. *Autoimmunity reviews*, 20(4), 102781. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2021.102781>
17. Ma, F., Yi, L., Yu, N., Wang, G., Ma, Z., Lin, H., & Fan, H. (2017). Streptococcus suis Serotype 2 Biofilms Inhibit the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 86. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00086>
18. Manda-Handzlik, A., Bystrzycka, W., Wachowska, M., Sieczkowska, S., Stelmaszczyk-Emmel, A., Demkow, U., & Ciepiela, O. (2018). The influence of agents differentiating HL-60 cells toward granulocyte-like cells on their ability to release neutrophil extracellular traps. *Immunology and cell biology*, 96(4), 413–425. <https://doi.org/10.1111/imcb.12015>
19. Manda-Handzlik, A., Bystrzycka, W., Cieloch, A., Glodkowska-Mrowka, E., Jankowska-Steifer, E., Heropolitanska-Pliszka, E., Skrobot, A., Muchowicz, A.,

- Ciepiela, O., Wachowska, M., & Demkow, U. (2020). Nitric oxide and peroxynitrite trigger and enhance release of neutrophil extracellular traps. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 77(15), 3059–3075. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03331-x>
20. Masuda, S., Shimizu, S., Matsuo, J., Nishibata, Y., Kusunoki, Y., Hattanda, F., Shida, H., Nakazawa, D., Tomaru, U., Atsumi, T., & Ishizu, A. (2017). Measurement of NET formation in vitro and in vivo by flow cytometry. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 91(8), 822–829. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23169>
 21. McIlroy, D. J., Jarnicki, A. G., Au, G. G., Lott, N., Smith, D. W., Hansbro, P. M., & Balogh, Z. J. (2014). Mitochondrial DNA neutrophil extracellular traps are formed after trauma and subsequent surgery. *Journal of critical care*, 29(6), 1133–1335. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2014.07.013>
 22. Mollinedo, F., Santos-Beneit, A. M., & Gajate, C. (1998). The human leukemia cell line HL-60 as a cell culture model to study neutrophil functions and inflammatory cell responses. In *Animal cell culture techniques* 264-297. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-80412-0_16
 23. Obama, T., Ohinata, H., Takaki, T., Iwamoto, S., Sawada, N., Aiuchi, T., Kato, R., & Itabe, H. (2019). Cooperative Action of Oxidized Low-Density Lipoproteins and Neutrophils on Endothelial Inflammatory Responses Through Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Frontiers in immunology*, 10, 1899. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01899>
 24. Rico, L. G., Salvia, R., Ward, M. D., Bradford, J. A., & Petriz, J. (2021). Flow-cytometry-based protocols for human blood/marrow immunophenotyping with minimal sample perturbation. *STAR protocols*, 2(4), 100883. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100883>.
 25. Yaseen, R., Blodkamp, S., Lühje, P., Reuner, F., Völlger, L., Naim, H. Y., & von Köckritz-Blickwede, M. (2017). Antimicrobial activity of HL-60 cells compared to primary blood-derived neutrophils against *Staphylococcus aureus*. *Journal of negative results in biomedicine*, 16(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12952-017-0067-2>.