

Efecto del anticuerpo contra el receptor TLR4 en la formación de trampas extracelulares de neutrófilos inducidas por el parásito *T. vaginalis*

Ashley Vera Huynh(1) y Eva Edilia Ávila Muro(2)

1 Estudiante de Biología, School of Biological Science, Washington State University | ashley.huynh@email.wsu.edu

2 Departamento de Biología Noria Alta, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus de Guanajuato, Universidad de Guanajuato | edilia@ugto.mx

Abstract

Neutrophils, the most abundant cells in the bloodstream, have a main function to eliminate the pathogenic microorganisms through phagocytosis, degranulation and neutrophil extracellular traps (NETs). NETs are DNA fibers enlaced with histones and antimicrobial peptides that trap and prevent the spread of pathogens. They are activated through biological factors such as fungus, bacteria, and parasites as well as through chemical factors such as IL8, LPS bacteria (*Lipopolysaccharide from Escherichia coil*) and LPG (*Lipopeptido-glicano*). Previous studies have shown that NETs are activated by *T. vaginalis* trophozoites and by LPG (*T. vaginalis*). The purpose of this investigation is to see if antibody PAb hTLR4 is able to neutralize TLR4 and as a result, block the formation of NETs. For this study, neutrophils from purified human blood were isolated and induced with LPG or *T. vaginalis* trophozoites as a positive control. As another test, different concentrations of antibody PAb hTLR4 were added prior to the activation of NETs for 2 hours. Observing through a confocal microscope it was noted that the higher concentrations of the anti-body inhibit the formation of NETs.

Resumen

Los neutrófilos son las células más abundantes del torrente sanguíneo, éstos tienen como función principal eliminar a los microorganismos patógenos mediante fagocitosis, degranulación y por trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). Las NETs son fibras de ADN asociadas a histonas y péptidos antimicrobianos, que atrapan a los patógenos evitando su propagación. Las trampas son activadas para su formación por factores biológicos como hongos, bacterias y parásitos, además de factores químicos como IL8, LPS bacteriano (Lipopolisacarido de *Escherichia coil*) y LPG de *T. vaginalis* (Lipopeptido-glicano). Estudios en laboratorio han demostrado que las NETs son activadas por trofozoítos de *T. vaginalis* y por LPG (de *T. vaginalis*), por ello se busca bloquear la formación de trampas mediante la neutralización de TLR4 con el anti-cuerpo PAb hTLR4. Para este estudio se aislaron los neutrófilos de sangre periférica humana e se indujeron con LPG o trofozoítos de *T. vaginalis* como control positivo. Para otro ensayo, se agregó el anti-cuerpo PAb hTLR4 a diferentes concentraciones previo a la activación de NETs durante dos horas. La observación por microscopia confocal arrojó que las mayores concentraciones de anti-cuerpo inhiben la formación de trampas.

Palabras Clave

NETs, *T. vaginalis*, PAb hTLR4

INTRODUCCIÓN

Los neutrófilos tienen como función principal eliminar a los microorganismos patógenos por NETosis. La NETosis es el proceso de matar patógenos extracelularmente por la emisión de histonas, cromatina descondensada / ADN que forman una estructura similar a una red de fibras. Aunque la formación de las NETs es una respuesta esencial del sistema inmune y atrapan a los patógenos evitando su propagación; sin embargo, el exceso de las trampas puede ser perjudicial. Las NETs expulsan altas concentraciones de factores tisulares que pueden resultar en la inducción de más neutrófilos, más trampas y eventualmente coagulación. Se han identificado que en circunstancias cuando hay muchos neutrófilos, se pegan al endotelio vascular y tienen un papel principal en la formación de trombos. Al sitio llegan las plaquetas activadas junto con los neutrófilos y se forman NETs. La formación de trombos causa el bloqueo de la micro vasculatura, impide la circulación de la sangre, induce isquemia, heridas, y de ese modo contribuyen al fallo de órganos y la muerte.

Por lo tanto, la prevención de la formación excesiva de las trampas y de los micro trombos puede preservar la función de los órganos. Un ejemplo de los efectos perjudiciales causada por la excesiva presencia de las trampas se puede ver en los pacientes con el Lupus Eritematoso Sistémico. La baja abundancia de los neutrófilos es una de las características principales en la enfermedad de Lupus y por eso razón es muy importante que se prevengan NETosis para evitar mayor reducción de los bajos números de neutrófilos que hay. Una hipótesis es que la presencia de un anti-cuerpo puede bloquear la inducción de las trampas o reducir su frecuencia. Ese es el objetivo del estudio: observar si el anti-cuerpo PAb hTLR4 bloquea la formación de trampas en presencia del inductor LPG o *T. vaginalis*. El primer paso es confirmar que LPG y *T. vaginalis* inducen las trampas y el segundo paso

es bloquear la formación de trampas por el anti-cuerpo PAb hTLR4 a diferentes concentraciones, en presencia de LPG o *T. vaginalis*.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Observar si el anti-cuerpo PAb hTLR4 bloquea la formación de trampas

Objetivo Especifico

- Observar si hay una relación entre la concentración del anti-cuerpo PAb hTLR4 y la formación de trampas con los inductores LPG o *T. vaginalis*

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo y cosecha de trofozoítos de *T. vaginalis*

Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) + 2% de seroalbúmina humana: Se disolvió con agitación suave un sobre de medio RPMI 1640 en polvo (Gibco; Cat. No. 31800-022) en agua desionizada recién extraída y esterilizada. Se agregaron 2 g de NaHCO₃ y 25 mM de HEPES (concentración final) y se ajustó el pH a 6.8, usando 1 N de NaOH o 1 N de HCl. Se agregó seroalbúmina humana al 2% (final) y agua hasta 1 litro. Se esterilizó por filtración en membrana de 0.45 µm (Millipore, HAWP02500).

Aislamiento de neutrófilos de sangre periférica

Se realiza mediante un gradiente de 2 fases colocando en un tubo cónico 3 ml de histopaque 1077 (Sigma-Aldrich cat. 11191) seguido de 3 ml de histopaque 1119 (Sigma-Aldrich cat. 10771). Sobre el gradiente se colocan 6 ml de sangre humana recién extraída con 10 U/ml de heparina y el tubo se centrifuga a 700 x g (2200rpm) durante 30 min. Se retira la fracción de granulocitos, se lavan las células con PBS estéril, se centrifugan durante 5 minutos a 200 x g (1500rpm), se desecha el sobrenadante y se resuspenden las

células (polimorfonucleares, PMN) en 1 ml de RPMI con 2% de albúmina sérica humana (HSA) para contar. Se centrifugan nuevamente y se resuspende el paquete a razón de 1 millón de células por ml en RPMI-HSA.

Inducción de NET con LPG o *T. vaginalis*

En una placa de 24 pozos se siembran 1×10^5 células/pozo (100ul) en medio RPMI 1640 con 2% de HSA. Se añaden 100 μ l de PMN a todos y 395 μ l de RPMI-HSA a los pozos con el inductor LPS y 350 μ l a los pozos con el inductor *T. vaginalis*. Se incuban 1 h en 5% de CO₂ a 37°C. Se agregan enseguida 5 μ l del inductor LPG a uno pozo, nada al otro para tener un control, y 50 μ l del inductor *T. vaginalis* pre-teñidos al otro y se incuban por 3 horas en 5% de CO₂ a 37°C. Se añadan el colorante azul Hoechst 53342 a una concentración final de 15 μ g/ml (30 μ l de un stock 500 μ g/ml) que es afín a DNA para observarlos en el microscopio confocal y se los incuban por 15 minutos a temperatura ambiente. Para visualizar a *T. vaginalis*, los trofozoítos se pre-tiñeron con el colorante rojo lipfílico PKH26 a 0.5 μ M.

Bloqueo de la inducción de NET con anti-cuerpo PAb hTLR4

En una placa de 24 pozos se siembra 1×10^5 células/pozo (100ul) en medio RPMI 1640 con 2% de HSA. Se añaden 100 μ l de PMN y el RPMI-HSA necesario para que el volumen final de cada pozo sea de 500 μ l. Se incuban 45min en 5% de CO₂ a 37°C. A los cuatro primeros pozos se agregan las siguientes concentraciones finales del anti-cuerpo hTLR4: 0 μ g/ml, 2.5 μ g/ml, 5 μ g/ml y 10 μ g/ml. A los mismos pozos se agregan 6 μ l del inductor LPG. A los cuatro siguientes, se agregan las siguientes concentraciones finales del anti-cuerpo PAb hTLR4: 0 μ g/ml, 2.5 μ g/ml, 5 μ g/ml y 10 μ g/ml. A los mismos pozos se agregan 50ul del inductor *T. vaginalis* pre-teñidos con PKH26. Al ultimo pozo, no se agrega ni anti-cuerpo ni un inductor como un control. Se incubaba la placa por 2 horas en 5% de CO₂ a 37°C. Se añadan el colorante Hoechst 53342 a una concentración final de 15 μ g/ml (30 μ l

de un stock 500 μ g/ml) y se los incuban por 15 minutos a temperatura ambiente.

Montaje de Cubreobjetos

Se coloca una gota (7 a 10 μ l) de ProLong Gold (Life Technologies. Cat. P36930) en un portaobjetos seco previamente tratado, se retira con extremo cuidado el cubreobjetos de la placa de 24 pozos, se escurre el exceso de medio y se colocan "boca abajo" sobre la gota del ProLong Gold. Se los cubren de la luz y permiten que se sequen 24 horas para la observación en el microscopio. Antes de la observación al microscopio, se limpian la superficie del portaobjetos y los cubre objetos con isopropanol para retirar el medio seco y cualquier suciedad.

Figura 1. Tabla de condiciones. Contiene las condiciones usadas en el experimento e incluye el aumento de cada inductor.

	Condiciones	
Controles	1°	Neutrófilos
	2°	LPS (10ng/ml)
	3°	LPG (10ng/ml)
	4°	Neutrófilos <i>T. vaginalis</i>
Tratamientos	5°	Neutrófilos <i>T. vaginalis</i> (2.5ug/ml)
	6°	Neutrófilos <i>T. vaginalis</i> (5ug/ml)
	7°	Neutrófilos <i>T. vaginalis</i> (10ug/ml)
	8°	Neutrófilos LPG (2.5ug/ml)
	9°	Neutrófilos LPG (5ug/ml)
	10°	Neutrófilos LPG (10ug/ml)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para observar la formación de trampas por los inductores LPG y *T. vaginalis* o el bloqueo de trampas por el anti-cuerpo PAb hTLR4, se utilizaron el colorante Hoechst 53342, este se adhiere a los núcleos de los neutrófilos, se muestra las fibras de ADN que han sido liberadas y se marca la forma de las trampas.

Como se muestra en la Figura 2, LPS y LPG inducen la formación de trampas. En la Figura 3, se observa que el anti-cuerpo PAb hTLR4 no bloquea la formación de trampas en presencia de *T. vaginalis*. Sin embargo, es importante tener en cuenta que a altas concentraciones (se muestran en serie C) hay menos trampas y son más pequeñas. En la Figura 4, se observa que el anti-cuerpo PAb hTLR4, a la concentración 10 μ g/ml, bloquea la formación de trampas en presencia del inductor LPG. A las concentraciones 2.5 μ g/ml y 5 μ g/ml del anti-cuerpo PAb hTLR4 hay trampas, pero de menor tamaño y poco frecuentes.

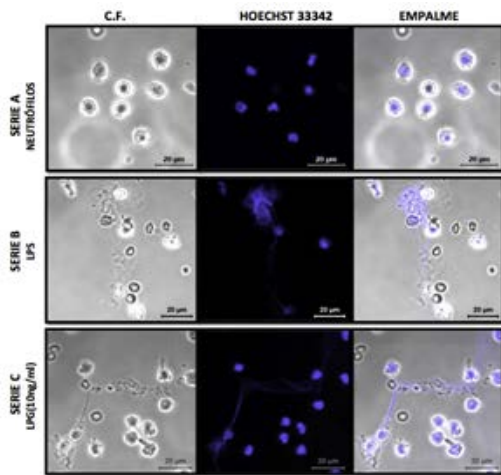


Figura 2. Inducción de trampas extracelulares de neutrófilos por LPS y LPG de *T. vaginalis*. A) Neutrófilos sin inductor, no hay formación de trampas. B) Neutrófilos con LPS y hay una gran frecuencia de trampas. C) Neutrófilos con LPG, hay un gran presencia de trampas.

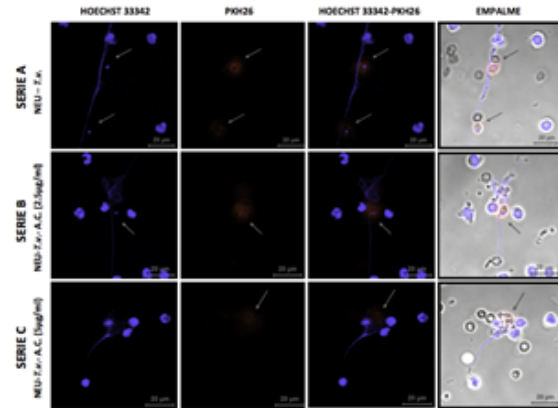


Figura 3. Bloqueo de NETs por el anti-cuerpo PAb hTLR4 a diferentes concentraciones, en presencia de *T. vaginalis*. A) Neutrófilos con *T. vaginalis* y sin el anti-cuerpo, hay una gran presencia de trampas. B) Neutrófilos con *T. vaginalis* y 2.5 μ g/ml del anti-cuerpo, hay una presencia de trampas. C) Neutrófilos con *T. vaginalis* y 5 μ g/ml del anti-cuerpo, hay menor presencia de trampas

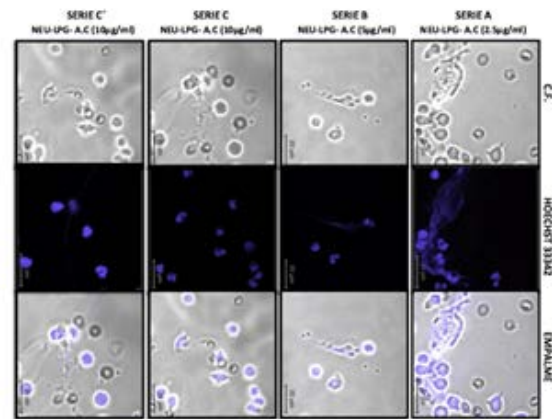


Figura 4. Bloqueo de NETs por el anti-cuerpo PAb hTLR4 a diferentes concentraciones, en presencia de LPG. A) Neutrófilos con LPG y 2.5 μ g/ml del anti-cuerpo, hay presencia de trampas. B) Neutrófilos con LPG y 5 μ g/ml del anti-cuerpo, hay presencia de trampas. C-C') Neutrófilos con LPG y 10 μ g/ml del anti-cuerpo, hay una disminución en la formación de trampas.

CONCLUSIONES

El anti-cuerpo PAb hTLR4 no bloquea completamente la formación de trampas.

Hay una relación entre la concentración del anti-cuerpo PAb hTLR4 y la formación de trampas en presencia de LPG y de *T. vaginalis*. A bajas concentraciones hay trampas, pero a altas concentraciones el anti-cuerpo hay de menor tamaño y poco frecuentes.

REFERENCIAS

ALMYROUDIS, N., GRIMM, M., DAVIDSON, B., RÖHM, M., URBAN, C., SEGAL, B. (2013). "NETosis and NADPH oxidase: at the intersection of host defense, inflammation, and injury" en *Frontiers in Immunology*. Consultada en [] (fecha de consulta 12-07-2015).

ARAZNA, M., PRUCHNIAK, M., DEMKOW, U. (2013). "Neutrophil extracellular traps in bacterial infections: Strategies for escaping from killing" en *Respiratory Physiology & Neurobiology*. Consultada en www.elsevier.com/locate/resphysiol (fecha de consulta 12-07-2015).

BRINKMANN, V., REICHARD, U., GOOSMANN, C., FAULER, B., UHLEMANN, Y., WEISS, D.S., WEINRAUCH, Y., ZYCHLINSKY, A. (2004). "Neutrophil Extracellular Traps kill Bacteria" en *Science*, Vol. 303, pp 1532-1535. Consultada en <http://www.sciencemag.org/content/303/5663/1532.full.html> (fecha de consulta 26-06-2014).

GOLDMANN, O., MEDINA, E. (2013). "The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more" en *Frontiers of Immunology*. Consultada en [] (fecha de consulta 12-07-2015).

IBA, T., HASHIGUCHI, N., NAGAOKA, I., TABE, Y., MURAI, M. (2013) "Neutrophil cell death in response to infection and its relation to coagulation" en *Journal of Intensive Care*, Vol. 1, [] 13. Consultada en [] (fecha de consulta 09-07-2015).

PRUCHNIAK, M., ARAZNA, M., DEMKOW, U. (2013). "Life of neutrophil: From stem cell to neutrophil extracellular trap" en *Respiratory Physiology & Neurobiology*. Consultada en www.elsevier.com/locate/resphysiol (fecha de consulta 12-07-2015).