

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida con orientación
en Biomedicina y Bionanotecnología**

**Caracterización fenotípica y funcional de leucocitos del tiburón
*Heterodontus francisci***

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Daniel Fernández Nolasco

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por
Daniel Fernández Nolasco

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Marco Antonio De León Nava
Co-Director de tesis

Dr. Luis Donis Maturano
Co-Director de tesis

Miembros del comité

Dra. Carolina Álvarez Delgado

Dr. Ricardo Alberto González Sánchez

Dr. Oscar Sosa Nishizaki



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Daniel Fernández Nolasco © 2018

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Daniel Fernández Nolasco** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

Caracterización fenotípica y funcional de leucocitos del tiburón *Heterodontus francisci*

Resumen aprobado por:

Dr. Marco Antonio De León Nava
CoDirector de Tesis

Dr. Luis Donis Maturano
CoDirector de Tesis

El estudio comparativo del sistema inmunológico en especies distintas al *Homo sapiens* nos ha permitido descubrir nuevos mecanismos de la inmunidad y comprender los ya existentes, con la finalidad de generar conocimientos nuevos que, entre otras ventajas, podrían derivar en estrategias terapéuticas útiles en el área biomédica. Una de las formas de vida ancestrales para estudiar el sistema inmunológico es el tiburón, un organismo en el que se han identificado moléculas del sistema inmune adaptativo como el receptor de células B (BCR) y células T (TCR), el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y el sistema activador de la recombinación (RAG), además de poseer un tipo de inmunoglobulinas (IgNAR) con propiedades únicas como alta solubilidad y estabilidad biofísica. Con la finalidad de entender mejor la inmunología de este organismo, el presente trabajo aborda aspectos del fenotipo y función en células del sistema inmune innato del tiburón *Heterodontus francisci*, una especie con un origen evolutivo de aproximadamente 250 millones de años. Después de la extracción de sangre y el aislamiento de leucocitos, se determinó mediante citometría de flujo que existen anticuerpos monoclonales para proteínas de mamífero que generan una reacción cruzada contra antígenos de tiburón, observando una relación estímulo-fenotipo dada por un aumento en la detección de proteínas asociadas con linfocitos B (CD19), fagocitos especializados (CD206) y una proteína asociada con linfocitos T (CD5) posterior a la exposición con tres especies de bacterias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio harveyi*). Respecto a los ensayos de la capacidad de engullimiento de leucocitos de tiburón evaluados nuevamente por citometría de flujo, se evidenciaron diferencias en relación con el tamaño y granularidad de las regiones leucocitarias y el estímulo adicionado, observamos que *E. coli* es un fuerte inductor de los procesos de internalización. Finalmente, utilizando microscopía de epifluorescencia, se observó en los leucocitos la inducción de estructuras semejantes a trampas extracelulares dependientes del estímulo con *S. aureus*; hipotetizamos que este efecto está mediado, como en los mamíferos, por algún tipo de TLR, fenómeno que sugiere que puede ser un mecanismo de defensa sumamente antiguo y conservado. La respuesta celular en leucocitos de *H. francisci* incluye la expresión de proteínas de membrana que brindan identidad a los leucocitos y la activación de funciones innatas particulares; esta respuesta es dependiente y varía con respecto al estímulo bacteriano al que se enfrenten las células.

Palabras clave: : Inmunidad innata, trampas extracelulares, fagocitosis, evolución.

Abstract of the thesis presented by **Daniel Fernandez Nolasco** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology.

Phenotypic and functional characterization of shark leukocytes *Heterodontus francisci*

Abstract approved by:

Dr. Marco Antonio De León Nava
Thesis Co-Director

Dr. Luis Donis Maturano
Thesis Co-Director

Comparative studies between humans (*Homo sapiens*) and other species have led to the discovery and understanding of new and existing mechanisms of the immune system. These discoveries help unveil and solve current issues, and allow the generation of knowledge that could lead to new therapeutic strategies in the biomedical field. Sharks are one of the most ancient vertebrate subclasses in which to study the immune system, an organism with adaptive immune system molecules like B (BCR) and T (TCR) cells receptor, major histocompatibility complex (MHC) and the recombination-activating gene (RAG), also they have a special type of immunoglobulins (IgNAR) with unique properties including high solubility and biophysical stability. In order to have a better understanding of shark immunology, this work aims to study the functional and phenotypic aspects of innate immune system cells of the *Heterodontus francisci* shark, a species with approximately 250 million years of evolutionary divergence. In the present study, we detected a possible cross reactivity between monoclonal antibodies against mammal proteins and shark antigens using flow cytometry. We observed a phenotype-stimuli relationship characterized by an increase of proteins associated to B lymphocyte (CD19), professional phagocyte (CD206) and T-B lymphocyte (CD5) populations after bacterial stimulation (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio harveyi*). Regarding leukocyte engulfment capacity assessed by flow cytometry, it was shown that there are many differences between size and granularity between leukocyte regions and the added stimuli; it was observed that *E. coli* is a strong inductor of internalization processes. Finally, we observed Extracellular Trap-like (ETs) structures in shark leukocytes by epifluorescence microscopy. These ETs were dependent on *S. aureus* stimuli, and we infer that this mechanism is mediated by some type of TLR, similar to mammals. This suggests that ETs may be a very ancient and conserved mechanism. The cellular response in *H. francisci* leukocytes includes membrane protein expression that provides identity to leukocytes and specific innate function activation; this response is dependent and varies according to the bacterial stimuli to which cells are exposed. In many cases, the immune response keeps similarities with stimulus-response processes observed in mammals, suggesting that there are evolutionarily conserved immune elements and mechanisms between two very distant species

Keywords : Innate immunity, extracellular traps, phagocytosis, evolution.

Dedicatoria

*“Nothing in biology makes sense
except in the light of evolution”.*

Theodosius Dobzhansky

Agradecimientos

Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada** (CICESE) por darme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría en el Posgrado de Ciencias de la Vida.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT), por el apoyo económico brindado durante el posgrado, con número de registro 615423.

A mi Co-Director de tesis y más grande maestro en esta travesía, **Dr. Luis Donis Maturano** que tuvo confianza en mí, que invirtió su tiempo y esfuerzo para que pudiera escribir este trabajo y que me brindó todo el apoyo y los conocimientos para sacar adelante este proyecto.

Al **Dr. Marco A. De León**, Co-Director de tesis que contribuyó en la edición, revisión y crítica de este trabajo.

A los miembros de mi comité de tesis: **Dra. Carolina Álvarez, Dr. Ricardo González y Dr. Oscar Sosa** por su tiempo, disposición y acertadas críticas y comentarios que enriquecieron de forma notable mi trabajo.

Al **Dr. Marcial Leonardo Lizarraga Partida** por su aportación en este trabajo, facilitándonos la cepa de *Vibrio harveyi* CICESE 597 colección DN-01.

A la **Dra. Johanna Bernaldez** por facilitarnos las cepas de bacterias *E. coli* y *S. aureus* para la realización de mis experimentos.

A la **Dra. Carmen Paniagua Chávez** por permitirnos hacer uso de las instalaciones del Departamento de Acuicultura y a **M. C. Constanza del Mar Ochoa Saloma** por su disposición, ayuda y buen humor durante mis visitas al microscopio.

Al **Dr. Leopoldo Flores Romo** por contribuir de forma vital en nuestro proyecto proporcionando material y reactivos, así como a todos los miembros del **Laboratorio 15 de Biología Celular del CINVESTAV**, especialmente a **M.C. Juana Calderón** por hacer un esfuerzo sobrehumano por que aprendiera Inmunohistoquímica, a **Raúl, Mariana, Eli y Felipe** por su amistad, los consejos y las risas.

Al **Dr. Pavel Espino y Dr. Gerard Zurawski** por su colaboración y apoyo brindado durante la elaboración de este proyecto.

A todos mis compañeros que hicieron estos dos años más alegres y divertidos, amigos con los que la ciencia me permitió coincidir: **Enrique, Arturo, Teresa, Mitzu, Brenda, Daniel, Julián, Carolina, Danna, Kee, Salvador, Daniela, Itzae, Pablo, Cristina, Ivan, Manuel, Samantha y Vanessa.**

A mi compañera y recién titulada **Ing. Mayra A. Sánchez Martínez** por contribuir al proyecto tiburón con dedicación y alegría.

A **Naara y Sarah**, que vivieron conmigo esta etapa, por su amistad, aprecio y apoyo.

A mis padres, **Alfonso y María Dolores**, a mis hermanos, **Diego y Diana**, que sin comprender lo que hacía nunca dudaron que podría, gracias por su apoyo, consideración y cariño.

A **Dalia**, por llenarme de planes el futuro.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	viii
Lista de acrónimos.....	x
1. Introducción	1
2. Antecedentes.....	2
2.1 Aspectos generales del tiburón <i>Heterodontus francisci</i>	4
2.2 Estudios inmunológicos realizados en el tiburón <i>Heterodontus francisci</i>	5
3. Justificación	6
4. Hipótesis.....	6
5. Objetivos	6
5.1 Objetivo General	6
5.2 Objetivos Específicos	6
Capítulo 1. Detección de proteínas de la membrana celular y capacidad de engullimiento.....	7
1.1 Metodología	7
1.1.1 Organismo de estudio	7
1.1.2 Extracción de sangre periférica.....	7
1.1.3 Obtención de leucocitos de tiburón.....	7
1.1.4 Determinación de poblaciones celulares por citometría de flujo.....	8
1.1.5 Tinción de bacterias para ensayos de fagocitosis	8
1.1.6 Conteo de bacterias por citometría de flujo.....	8
1.1.7 Ensayo de fagocitosis.....	9
1.1.8 Detección de proteínas de membrana de leucocitos de tiburón.....	10
1.1.9 Análisis multiparamétrico para la evaluación de proteínas membranales ante un estímulo antigénico	11
1.1.10 Análisis multiparamétrico para la evaluación de la capacidad de engullimiento por citometría de flujo	11
1.2 Resultados	12
1.2.1 Detección de proteínas de membrana celular en leucocitos de tiburón en respuesta a un reto antigénico.....	12
1.2.2 Capacidad de engullimiento (fagocitosis).....	16

1.3 Discusión.....	19
Capítulo 2. Trampas Extracelulares (ETs).....	24
2.1 Metodología	24
2.1.1 Tinción de bacterias para ensayos de inducción de Trampas Extracelulares (ETs).....	24
2.1.2 Inducción de Trampas Extracelulares (ETs)	24
2.2 Resultados	26
2.3 Discusión.....	32
6. Conclusiones.....	35
Literatura citada	36
Anexos.....	39
1. Lista de reactivos.....	39
2. Preparación de soluciones.....	41
3. Lista de anticuerpos	42

Lista de figuras

Figura		Página
1	Diseño del ensayo de fagocitosis.....	9
2	Ensayo de detección de proteínas de membrana en respuesta a diferentes estímulos.....	10
3	Distribución del contenido de los tubos primarios para detección de proteínas de membrana celular.....	10
4	Diagrama de puntos del análisis multiparamétrico en proteínas de membrana de leucocitos de tiburón.....	11
5	Diagrama de puntos del análisis multiparamétrico para la capacidad de engullimiento de leucocitos totales en tiburón.....	12
6	Gráficas de máximos y mínimos correspondientes a proteínas de población (linfocitos T y B).....	13
7	Gráficas de máximos y mínimos correspondientes a proteínas de activación.....	14
8	Gráfica de máximos y mínimos correspondientes a proteínas mediadoras de la interacción celular (integrinas).....	15
9	Imagen representativa de un diagrama de puntos donde se muestran las regiones leucocitarias para el análisis de capacidad de engullimiento.....	16
10	Porcentaje de engullimiento de cada región de leucocitos (n=3) incubados con o sin bacterias (E. coli, S. aureus y V. harveyi).....	18
11	Diagrama experimental para ensayo de inducción de trampas extracelulares.....	24
12	Imágenes de fluorescencia correspondientes al control sin estímulo (A, B) y al estímulo con PMA (C, D).....	26
13	Imágenes de fluorescencia correspondientes a leucocitos de tiburón incubados con tres estímulos bacterianos.....	27
14	Imágenes de fluorescencia correspondientes al control sin estímulo (A, B) y al estímulo con PMA (C, D).....	28
15	Imágenes de fluorescencia correspondientes a leucocitos de tiburón incubados con tres estímulos bacterianos.....	29
16	Imágenes de fluorescencia correspondientes al control sin estímulo (A, B) y al estímulo con PMA (C, D).....	30
17	Imágenes de fluorescencia correspondientes a leucocitos de tiburón incubados con tres estímulos bacterianos.....	31

Lista de tablas

Tabla	Página
1 Repertorio de anticuerpos contra proteínas humanas y murinas utilizados en ensayos de detección de proteínas de membrana en leucocitos sanguíneos de tiburón.....	42

Lista de acrónimos

CD	Cúmulo de diferenciación
BCR	Receptor de células B
TCR	Receptor de células T
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
RAG	Gen activador de la recombinación
ETs	Trampas extracelulares
TLR	Receptor tipo Toll
PRRs	Receptor de reconocimiento de patrones
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
VLRs	Receptor variable de linfocitos
CDR	Región determinante de complementariedad
NETs	Trampas extracelulares de neutrófilos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PBS	Solución salina de fosfatos
PMA	Miristato acetato de forbol
PFA	Paraformaldehído
DAPI	4', 6-diamino-2-fenilindol
IP	Yoduro de propidio
7AAD	7-aminoactinomicina
PKC	Proteína cinasa C
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
LPS	Lipopolisacárido

1. Introducción

La complejidad de los sistemas y mecanismos que componen a los seres vivos es resultado de los procesos evolutivos que ha experimentado la vida desde sus orígenes. El sistema inmunológico no es una excepción; este comprende una red integrada de moléculas, células y órganos, en la cual cada componente se basa en funciones particulares (fagocitosis, desgranulación, secreción de citocinas, producción de anticuerpos), tratando de proteger a los organismos multicelulares contra agentes patógenos y amenazas del medio (Owen *et al.*, 2013).

Para su mejor comprensión, el sistema inmune se ha dividido en dos grandes ramas: la inmunidad innata y la adaptativa. La primera está presente en todas las plantas y metazoos, y su sello distintivo incluye la presencia de receptores codificados en la línea germinal de reconocimiento de microorganismos, mejor conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (*PRRs*). Los *PRRs* presentan una especificidad por elementos conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (*PAMPs*). Además, cuentan con mecanismos efectores de respuesta rápida como la fagocitosis, activación de cascadas proteolíticas (complemento), síntesis de moléculas antimicrobianas (Parra, Takizawa, y Sunyer, 2013), desgranulación e inducción de trampas extracelulares.

La inmunidad adaptativa, en cambio, se basa en receptores de antígeno generados a partir de recombinación somática de genes de la línea germinal, presentes únicamente en vertebrados. Se han identificado dos clases de receptores: el sistema basado en receptores variables de linfocitos (*VLRs*), que en organismos no mandibulados es expresado por células linfocíticas *VLR-A* y *VLR-B* y el sistema basado en receptores de células B (*BCR*) y células T (*TCR*), propio de organismos mandibulados (Parra *et al.*, 2013).

El ser humano posee un sistema inmune innato y adaptativo con una gran variedad de elementos conservados que comparte con formas de vida ancestrales, tales como los peces cartilagosos. Los peces cartilagosos son los primeros vertebrados mandibulados que presentan moléculas propias del sistema inmune adaptativo como MHC, BCR, TCR, inmunoglobulinas y sistema RAG (Scapigliati, 2013). Estos organismos divergieron de su ancestro común con los vertebrados hace aproximadamente 450 millones de años (Pettinello y Dooley, 2014). Debido a la relación que guardan los elementos de nuestro sistema con los de otras especies, ha sido posible dilucidar procesos, funciones y alteraciones de mecanismos humanos a partir del estudio comparativo con otras formas de vida.

El presente trabajo de investigación pretende sumar a las aportaciones relacionadas al estudio de la inmunobiología de los tiburones, explorando los aspectos fenotípicos de las células del sistema inmunológico que residen en la sangre periférica del tiburón *Heterodontus francisci*, además de estudiar algunas de las funciones relacionadas con la respuesta inmune innata que presentan dichas células al enfrentarse a un reto antigénico de tipo bacteriano.

2. Antecedentes

El estudio de los peces cartilaginosos en el ámbito inmunológico, en particular de los tiburones, ha cobrado importancia desde el descubrimiento de las inmunoglobulinas denominadas IgNAR que poseen propiedades únicas (Greenberg *et al.*, 1995). Las IgNAR tienen alta estabilidad biofísica, alta solubilidad y la capacidad de reconocimiento de epítomos que resultan inaccesibles para las inmunoglobulinas de mamíferos debido a que presentan una mayor extensión en la región determinante de la complementariedad 3 (*CDR3*). La región *CDR3* se encuentra en un dominio único de tamaño pequeño (14 kDa) que contiene el sitio de completo para la unión con el antígeno conocido como VNAR, la unidad de reconocimiento de antígeno más pequeña de la cual se tiene reporte (Häsler *et al.*, 2016; Mashoof y Criscitiello, 2016). Estas características hacen de las IgNAR fuertes candidatas para aplicaciones terapéuticas (Mashoof y Criscitiello, 2016) y a su vez, a los tiburones un objeto de estudio de gran relevancia.

A pesar de que actualmente existe una basta cantidad de trabajos enfocados al entendimiento de los procesos de recombinación y los genes asociados a la generación de inmunoglobulinas *in vitro* de tipo IgNAR en los peces cartilaginosos, falta información en torno al repertorio celular del sistema inmune; los datos asociados a receptores, y estudios de funcionalidad *in vivo* e *in vitro* de las respuestas celulares, particularmente linfocitarias (Scapigliati, 2013).

En la década de los 1980 fue publicado uno de los primeros trabajos donde describían la estructura y caracterización de la función de los tipos celulares en la sangre periférica del tiburón nodriza, utilizando técnicas de microscopía electrónica y ensayos de fagocitosis *in vitro* (Hyder *et al.* 1983). Estos autores determinaron que algunas células de la sangre de este tiburón comparten rasgos morfológicos con las células blancas de los mamíferos, pero no necesariamente conforman un grupo funcional común entre estas dos especies. Además, sugieren una posible relación célula-precursor entre los neutrófilos de

mamíferos y las células tipo granulocitos encontradas en el tiburón nodriza, basados en la capacidad fagocítica de estas últimas (Hyder *et al.* 1983).

Precisamente, uno de los mecanismos evolutivamente conservados en las células del sistema inmune es la fagocitosis, definida como la ingesta de partículas a través de una envoltura formada por una sección de la membrana plasmática (Gordon, 2016), que es considerada un evento directamente relacionado con la nutrición y la defensa. Debido a la aparición de los metazoos, surgieron células dedicadas al reconocimiento y la eliminación de elementos no propios denominadas fagocitos, los cuales se agrupan en granulocitos y fagocitos mononucleares (McArthur y Fletcher, 1985), protagonistas de la inmunidad innata. En el sentido inmunológico, la fagocitosis inicia con el reconocimiento mediante receptores específicos de microorganismos que serán internalizados en los fagosomas, los cuales al fusionarse con los lisosomas propician la destrucción de los microorganismos por la acción de especies reactivas de oxígeno y enzimas proteolíticas. Este proceso se utiliza también para la eliminación de células apoptóticas propias (Abbas *et al.*, 2011).

Otro de los eventos característicos en ciertas poblaciones leucocitarias como los neutrófilos y los linfocitos CD8⁺, NK y $\gamma\delta$ es la desgranulación. Proceso en el cual se liberan gránulos citotóxicos transportados por vesículas al medio extracelular. Estos gránulos contienen enzimas proteolíticas y especies reactivas de oxígeno que degradan las envolturas celulares de bacterias y otras células (Betts y Koup, 2004).

Al igual que la fagocitosis y la desgranulación, existe un mecanismo de control de diseminación de patógenos propio del sistema inmune innato conocido como trampas extracelulares (*ETs*). Este proceso fue inicialmente descrito en neutrófilos humanos (*NETs*) por el grupo de investigación de Zychlinsky y colaboradores, y comprende la condensación del material genético y elementos asociados al núcleo celular para su expulsión al medio extracelular con la finalidad de inmovilizar a los patógenos y promover su eliminación, este mecanismo resulta en la muerte celular en un proceso conocido como *netosis*. Las trampas extracelulares poseen elementos específicos que las caracterizan: el ADN es el componente estructural principal, se encuentran además proteínas asociadas al núcleo como elastasas, histonas, y en el caso específico de neutrófilos, proteínas de los gránulos primarios (catepsina G y mieloperoxidasa), secundarios (lactoferrina) y terciarios (gelatinasa) (Brinkmann *et al.*, 2004). A partir del descubrimiento de esta nueva estrategia inmunológica en neutrófilos, se han realizado diversos estudios para describir la presencia de trampas extracelulares en células de otros organismos, como resultado, éstas se han encontrado en leucocitos de peces (Palić *et al.*, 2007), aves (Chuammitri *et al.*, 2009) y crustáceos (Ng *et*

al., 2013). Las tres estrategias mencionadas anteriormente forman parte del repertorio de defensa que poseen las diferentes células del sistema inmune innato en distintos organismos, y que se esperan encontrar en los leucocitos de tiburón como parte de los objetivos de este trabajo.

Los organismos acuáticos están adaptados a una gran variedad de ambientes, desde las aguas oceánicas profundas hasta las costas y ríos, esta variedad de hábitats poseen alrededor de 1×10^{29} células procariotas (Whitman *et al.*, 1998) y 1×10^{10} virus por litro (Wilhelm y Suttle, 1999). La exposición constante a diversos microorganismos potencialmente patógenos obliga a los peces cartilaginosos a contar con elementos de reconocimiento eficaces para desencadenar respuestas efectoras que los protejan. En los elasmobranquios se han demostrado varios mecanismos de inmunidad innata que incluyen fagocitosis (Hyder *et al.*, 1983), citotoxicidad no específica, activación del complemento y quimiotaxis (Anandhakumar *et al.*, 2012). Se sabe que los responsables de desencadenar estas acciones en mamíferos son los receptores tipo *Toll* (TLRs), moléculas capaces de reconocer patrones específicos de los microorganismos, sin embargo, la cantidad, función y especificidad por el ligando de los TLRs en tiburones no está descrita. Uno de los pocos trabajos realizados, utilizando al tiburón elefante (*Callorhynchus milii*), generó predicciones *in silico*, simulaciones computacionales, de la posible presencia de regiones génicas que pueden codificar algunos TLRs (Venkatesh *et al.*, 2014). Dilucidar aspectos genotípicos y funcionales de los TLRs representa una ventaja importante en el estudio de las rutas de señalización de la inmunidad innata del tiburón (Anandhakumar *et al.*, 2012).

Gran parte de los estudios descriptivos del sistema inmune y, de las poblaciones leucocitarias de elasmobranquios como tal, se han realizado en el tiburón nodriza (*Ginglymostoma cirratum*), que ha sido propuesto como un organismo modelo en los campos de la biomedicina y la genómica debido a la extensión relativamente corta de su genoma que se compone de 4×10^9 pares de bases (Luo *et al.*, 2006). En esta investigación se utilizará como modelo de estudio al tiburón *Heterodontus francisci*, conocido coloquialmente como tiburón cornudo, una especie que habita en la zona costera de la península de Baja California, no posee gran tamaño y mantiene un comportamiento sedentario. Este elasmobranquio ha sido utilizado como organismo modelo en estudios referidos a la producción de anticuerpos IgNAR (Camacho-Villegas *et al.*, 2013).

2.1 Aspectos generales del tiburón *Heterodontus francisci*

El género *Heterodontus* agrupa nueve especies. *H. francisci* debe su nombre a la diferencia morfológica entre los dientes delanteros y traseros, además, posee una espina que sobresale previo a cada una de las

aletas dorsales. Este tiburón presenta una distribución en aguas cálido-templadas de la región subtropical del Pacífico Oriental desde las costas de California en E.U. hasta Sinaloa, incluyendo el Golfo de California y se le puede encontrar en profundidades de hasta 150 metros en fondos rocosos, arrecifes, lechos de algas y bancos de arena (Castellanos- Vidal, 2017).

Todos los integrantes del género *Heterodontus* son ovíparos. Al nacer, este elasmobranquio mide entre 15-16 cm, tamaño que corresponde al espacio que provee la cápsula del huevo. Los machos alcanzan longitudes máximas de 83 cm, mientras que las hembras pueden llegar a medir hasta 122 cm. Su dieta consiste en invertebrados bentónicos como cangrejos, calamares, pulpos e incluso peces pequeños (Sylvia L. Smith, Robert B. Sim, 2014).

2.2 Estudios inmunológicos realizados en el tiburón *Heterodontus francisci*

Diversas especies de tiburones han sido objeto de investigación con la finalidad de entender el sistema inmune de los elasmobranquios, la información que se tiene sobre *H. francisci* se centra principalmente en el estudio de la estructura y generación de inmunoglobulinas del tipo IgNAR (Dooley y Flajnik, 2005; Feige *et al*, 2014). Al margen de las investigaciones sobre anticuerpos se han realizado comparaciones en relación con elementos evolutivamente conservados que los mamíferos comparten con este tiburón, señalando que en el timo, los genes del receptor de células T (α , β y δ) están presentes y se expresan en conjunto con los genes implicados en la reorganización y diversidad del TCR (RAG1 y TdT). Por otro lado, se sostiene que la organización estructural del bazo de *H. francisci* guarda similitudes con vertebrados evolutivamente más recientes, el cual está compuesto por regiones fácilmente reconocibles como la pulpa roja (red densa de senos venosos) y la pulpa blanca (tejido linfático compuesto principalmente por acumulación de linfocitos). La presencia de eritrocitos, linfocitos maduros, inmaduros y en constante división, señalan que el bazo del tiburón es un sitio primario de linfopoyesis y eritropoyesis. Existen además, estudios realizados por microscopía sobre poblaciones leucocitarias en la sangre de *H. francisci* que reportan la presencia de monocitos, linfocitos, neutrófilos, heterófilos, eosinófilos y trombocitos granulados, basados en similitudes morfológicas con poblaciones de mamíferos. Respecto a dichas células, se han realizado pruebas sobre la capacidad fagocítica en un miembro del mismo género conocido como *Heterodontus portusjacksoni*, en el que mediante microscopía se comprobó su capacidad para internalizar levaduras y perlas poliméricas (Sylvia L. Smith, Robert B. Sim, 2014).

3. Justificación

La importancia de caracterizar a los leucocitos presentes en la sangre periférica del tiburón *Heterodontus francisci*, reside en comprender la función que tienen estas células en los mecanismos del sistema inmune innato y adaptativo. Los estudios fenotípicos y funcionales realizados en leucocitos de dicho tiburón ante la presencia de un estímulo microbiano nos permitirán vislumbrar el papel que desempeñan estas células dentro de la inmunidad, y la posibilidad de aplicar este conocimiento a la generación de elementos útiles en el área biomédica, como el desarrollo de cultivos celulares dedicados a la expresión de anticuerpos monoclonales de tipo IgNAR.

4. Hipótesis

Los leucocitos presentes en sangre periférica del tiburón *Heterodontus francisci* poseen proteínas membranales y funciones específicas compartidas con las de subpoblaciones leucocitarias de mamíferos (humanos y murinos) y pueden modular su aparición como respuesta a un estímulo antigénico.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Caracterizar fenotípica y funcionalmente los leucocitos de sangre periférica del tiburón *Heterodontus francisci*.

5.2 Objetivos Específicos

Utilizando como reto antigénico a las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio harveyi*, evaluar en leucocitos de tiburón la:

- ◆ Presencia de proteínas de la membrana celular relacionadas a población, activación e integrinas.
- ◆ Capacidad de engullimiento de las distintas regiones leucocitarias.
- ◆ Capacidad de inducir Trampas Extracelulares (ETs).

Capítulo 1. Detección de proteínas de la membrana celular y capacidad de engullimiento

1.1 Metodología

1.1.1 Organismo de estudio

Individuos macho y hembra de tiburón *Heterodontus francisci*, fueron extraídos de la región costera del municipio de Guerrero Negro en la Laguna Ojo de Liebre, playa La Concha, B.C.S., México. Para obtener los ejemplares, se utilizó una red agallera de pesca con 6 pulgadas de luz de malla. Posterior a su captura, los tiburones fueron transportados en un contenedor con capacidad de 1 m³ de agua de mar y aireación constante a las instalaciones de la División de Biología Experimental y Aplicada del CICESE. En estas instalaciones se mantuvieron en estanques de 5 m³ de capacidad con agua oceánica. Durante los experimentos fueron alimentados dos veces por semana con pulpa de calamar. La extracción de los ejemplares se realizó bajo el Permiso de Pesca de Fomento No. PPF/DGOPA-009/17.

1.1.2 Extracción de sangre periférica

Para la obtención de sangre periférica se retiró al tiburón del estanque, se colocó de forma lateral en una mesa y se insertó la jeringa cuidadosamente en la región anterior de la zona media de la aleta caudal. Se extrajo un volumen aproximado de 5 ml provenientes de la vena caudal y se recolectó en tubos con heparina de litio para su posterior análisis.

1.1.3 Obtención de leucocitos de tiburón

Para el aislamiento de leucocitos de tiburón se utilizó un gradiente de Percoll con 5 fases (25, 30, 35, 40 y 50%). Partiendo de una solución de Percoll al 100% en PBS 1X se realizaron el resto de las fases diluyendo el Percoll con el volumen correspondiente de solución salina de Hanks 1X para obtener las concentraciones necesarias. En un tubo de 15 ml se añadieron de 1 a 2 ml aproximadamente de cada dilución de Percoll colocadas de mayor a menor concentración y finalmente en la parte superior del gradiente se agregó cuidadosamente la sangre obtenida evitando romper el gradiente. Posteriormente se centrifugó la muestra a 2500 g durante 20 minutos obteniendo distintas fases de leucocitos con base en su densidad.

1.1.4 Determinación de poblaciones celulares por citometría de flujo

Una vez que se colectaron los leucocitos totales, se realizó un lavado con solución de Hanks 1X y se centrifugó a 300 g durante 5 min a 4º C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió en solución de Hanks para realizar un conteo celular en cámara de Neubauer por exclusión con azul de tripán. Para identificar las proteínas de interés se usaron anticuerpos específicos, los cuales, para fines de este proyecto son anticuerpos utilizados para reconocer proteínas de humano y ratón (Anexo 3). Una vez añadidos los anticuerpos se incubaron en oscuridad por 20 minutos a 4º C; pasado este tiempo se lavaron con solución de Hanks. Finalmente se leyeron 50,000 eventos a una velocidad de 500-1000 eventos/seg de cada muestra en el citómetro de flujo Attune (*Applied Biosystems*).

1.1.5 Tinción de bacterias para ensayos de fagocitosis

Se utilizaron las bacterias *E. coli* y *S. aureus* y *V. harveyi*. Dichas bacterias fueron suspendidas de forma independiente en un tubo Eppendorf de 1 ml con 500 µl de PFA 8% y 500 µl de PBS 1X, el cual se centrifugó a 4000 g durante 5 minutos a 4º C seguida de una fijación con Paraformaldehído 4% durante 24 horas a 4º C. Transcurrida la fijación se centrifugó a 4000 g por 5 minutos a 4º C y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las bacterias en 500 µl de solución salina y se añadió el colorante TOPRO-3. Posteriormente se incubaron a 37º por 60 minutos en agitación y oscuridad. Se lavaron las células tres veces con solución PBS 1X, centrifugando a 4000 g por 5 min a 4º C y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en PBS 1X y se realizó un conteo celular mediante citometría con ayuda de perlas de conteo para establecer la cantidad de bacterias teñidas por microlitro.

1.1.6 Conteo de bacterias por citometría de flujo

En un tubo se colocaron 390 µl de solución salina, 10 µl de la suspensión de bacterias teñidas y 10µl de perlas de conteo *CountBright™* (0.54 x 10⁵ perlas / 50 µl). Se adquirieron 500,000 eventos y se realizó el cálculo de la cantidad de bacterias teñidas mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{A}{B} \times \frac{C}{D} = \text{células}/\mu\text{l}$$

Donde:

A: Cantidad de eventos

B: Cantidad de perlas

C: Cantidad de perlas por lote

D: Volumen de la muestra

1.1.7 Ensayo de fagocitosis

Las pruebas de fagocitosis se realizaron para el total de los leucocitos obtenidos. Se recuperaron estos leucocitos y se utilizaron dos proporciones de células:bacterias teñidas (TOPRO-3) de: 1:10 (50,000 células y 450,000 bacterias) y 1:1 (500,000 células y 500,000 bacterias) en 500 μ l de medio de cultivo. Bajo el siguiente esquema:

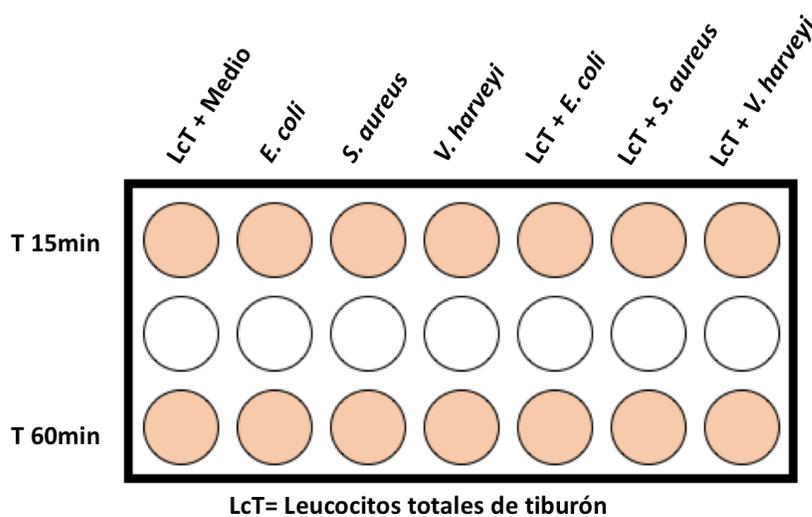


Figura 1. Diseño del ensayo de fagocitosis. Leucocitos de tiburón se incubaron a 27° C en una atmósfera con 5% de CO₂ con o sin microorganismos teñidos (*E. coli*, *S. aureus* y *V. harveyi*) en dos proporciones distintas, de células:bacterias (1:10 y 1:1) durante 15 y 60 minutos.

Los controles consistieron en medio de cultivo con leucocitos totales y medio con cada uno de los microorganismos utilizados. Una vez que se agregaron las células teñidas se colocaron los tubos en incubación a 27° C con 5% de CO₂ durante 15 y 60 minutos. Pasado el tiempo de incubación se realizaron tres lavados con solución PBS 1X y se procedió con el análisis citométrico, en el cual se adquirieron 200,000 eventos.

1.1.8 Detección de proteínas de membrana de leucocitos de tiburón

Del total de leucocitos provenientes de sangre periférica fueron distribuidos 500,000 leucocitos para cada tubo en medio RPMI. A cada uno de los tubos se les agregó un estímulo distinto (50 μ l PMA [100nm] o 500,000 células de *E. coli*, *S. aureus* y *V. Harveyi*) durante tres tiempos distintos (15, 60 y 120 min) además del tiempo cero como se muestra en el siguiente esquema:

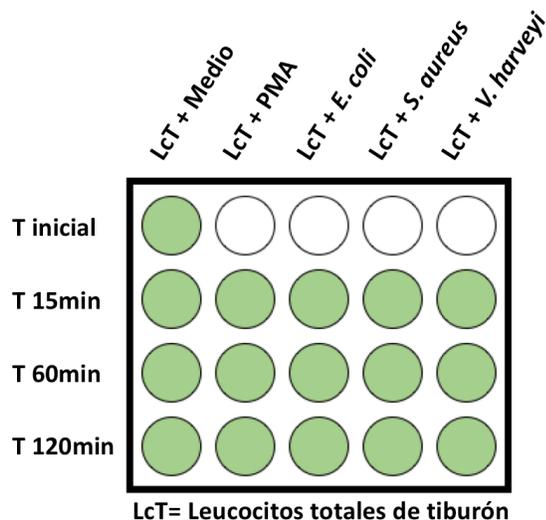


Figura 2. Ensayo de detección de proteínas de membrana en respuesta a diferentes estímulos. Leucocitos de tiburón se incubaron a 27° C en una atmósfera con 5% de CO₂ con o sin estímulo (PMA, *E. coli*, *S. aureus* y *V. harveyi*) durante 15, 60 y 120 min.

Concluido el tiempo de incubación se dividieron las células en 5 nuevos tubos que contenían una mezcla de anticuerpos (M1, 2, 3, 4, 5) de acuerdo al siguiente esquema:

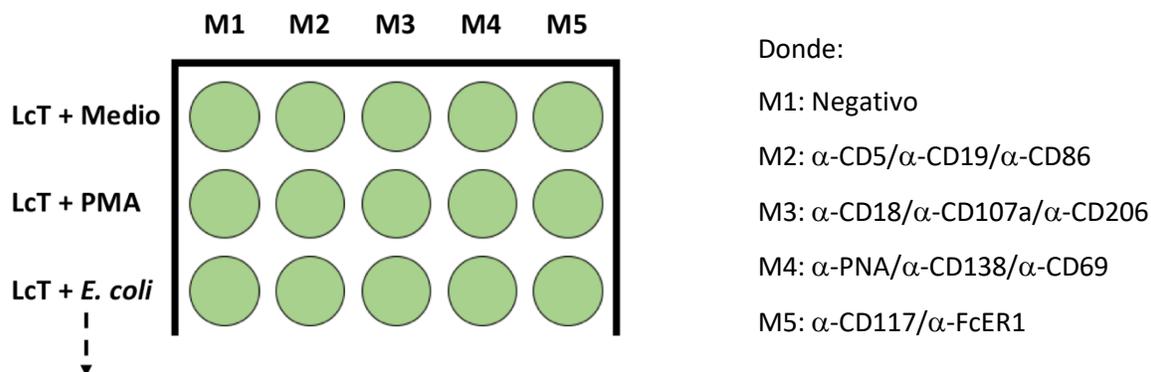


Figura 3. Distribución del contenido de los tubos primarios para detección de proteínas de membrana celular. Se distribuyeron los 500 μ l de contenido del tubo primario en 5 nuevos tubos, a los cuales se les adicionan 25 μ l de cada mezcla de anticuerpos. Se incubaron en oscuridad durante 15 min y posteriormente se realizaron tres lavados con solución de Hanks 1X.

Los nuevos tubos con las mezclas de anticuerpos fueron incubados en oscuridad durante 20 min y posteriormente se les realizaron dos lavados con solución de Hanks 1X a 300 g por 5 min. Para el análisis citométrico se adquirieron 30 mil eventos.

1.1.9 Análisis multiparamétrico para la evaluación de proteínas membranales ante un estímulo antigénico

El análisis de resultados se llevó a cabo utilizando el software FlowJo versión 10, en el cual se realizó la limpieza de la muestra eliminando eventos múltiples con respecto a dos propiedades como granularidad y tamaño. En el caso de los resultados de detección de proteínas de membrana se utilizó la característica de granularidad de la muestra para ser comparada con la señal positiva del fluorocromo utilizado, teniendo como referencia el control sin anticuerpo.

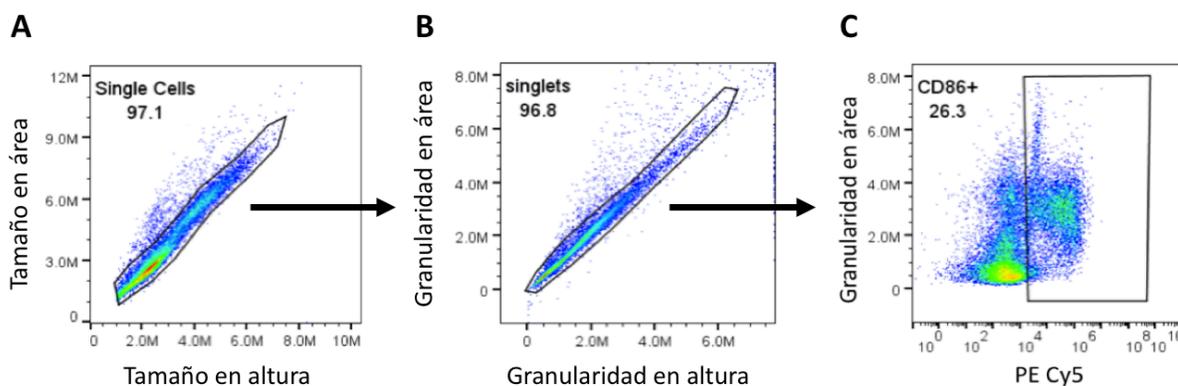


Figura 4. Diagrama de puntos del análisis multiparamétrico en proteínas de membrana de leucocitos de tiburón. Selección de eventos únicos en relación con la propiedad de granularidad (A) y la dispersión frontal (B). Selección de la región positiva para la señal del fluorocromo (C).

1.1.10 Análisis multiparamétrico para la evaluación de la capacidad de engullimiento por citometría de flujo

Para el análisis de resultados correspondiente a la capacidad de engullimiento se seleccionaron nuevamente los eventos simples y se analizó en relación al tamaño y granularidad, posteriormente se seleccionó la zona positiva para el fluorocromo teniendo como referencia la muestra sin bacterias teñidas, a partir de las regiones (R1, R2 y R3) realizadas en el diagrama C.

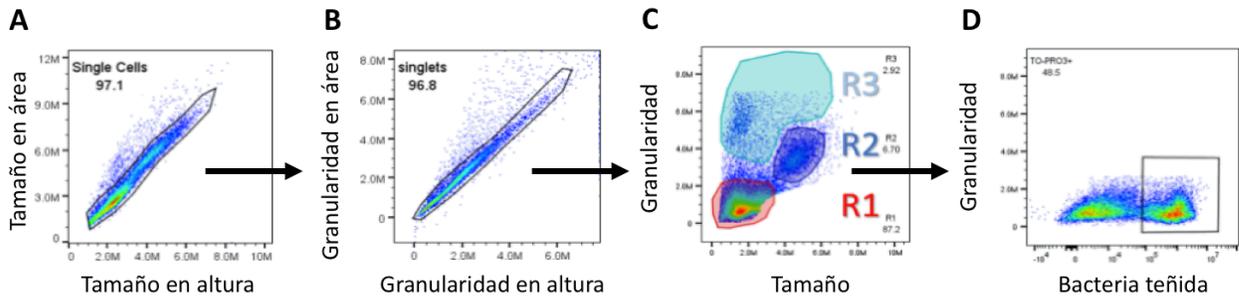
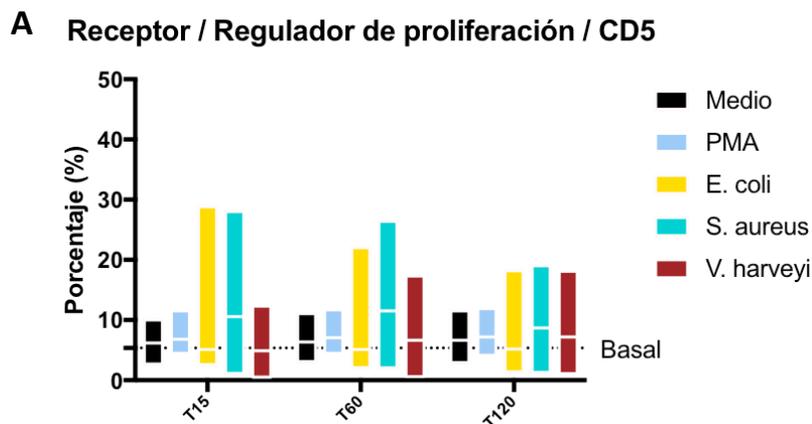


Figura 5. Diagrama de punto del análisis multiparamétrico para la capacidad de engullimiento de leucocitos totales en tiburón. Selección de eventos únicos con relación a la granularidad (A) y a la dispersión en área (B). Separación de la muestra por regiones en relación al tamaño y la granularidad (C). Selección de la señal positiva del fluorocromo (D).

1.2 Resultados

1.2.1 Detección de proteínas de membrana celular en leucocitos de tiburón en respuesta a un reto antigénico

En el grupo de trabajo del Dr. Donis se tiene como antecedente que hay anticuerpos específicos para reconocer proteínas humanas y murinas, que también detectan epítomos en los leucocitos presentes en sangre periférica del tiburón *Heterodontus francisci*. Con base en los porcentajes de detección obtenidos por Sánchez-Martínez (2018), se seleccionaron una serie de anticuerpos que fueron organizados en tres categorías: proteínas de población, de activación e integrinas. Las siguientes gráficas muestran los porcentajes de detección para cada proteína correspondientes a las tres categorías en relación al estímulo aplicado.



B Complemento de receptor de antígeno / Estimulante / CD19

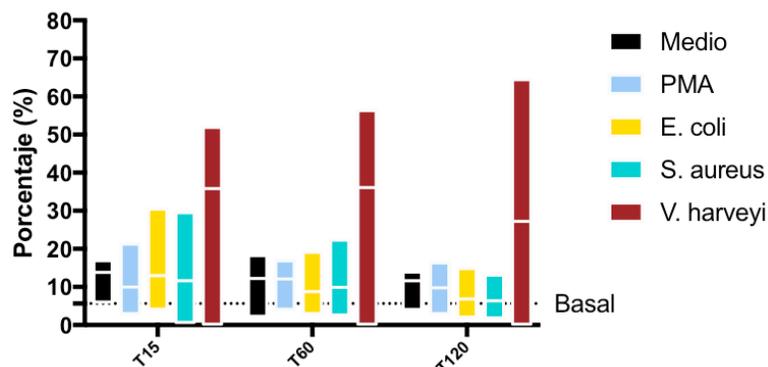
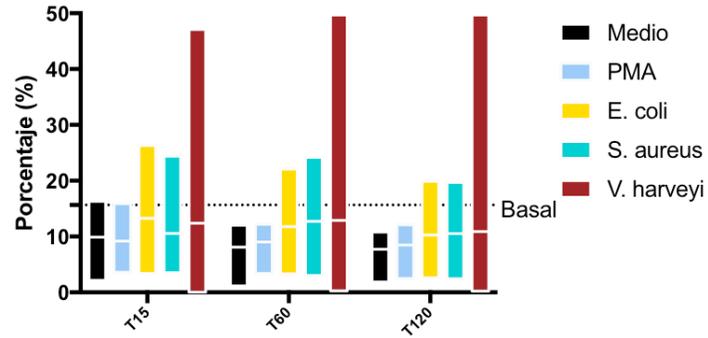


Figura 6. Gráficas de máximos y mínimos correspondientes a las proteínas de población de linfocitos T-B (A) y linfocitos B (B), la línea punteada indica el porcentaje de detección basal de la proteína (n=3), la línea blanca muestra la ubicación de la mediana.

En la Figura 6 se muestran los porcentajes de detección en leucocitos de tiburón para la proteína de población CD5 (A), proteína característica de una subpoblación de linfocitos T-B en mamíferos. En dicha gráfica se puede observar que los leucocitos de tiburón incubados con PMA e incluso aquellos sin estímulo presentaron una tendencia de medianas por arriba del límite basal de detección, sin embargo, las células con el estímulo de *S. aureus* presentaron los valores de medianas más altos, cercanos al 10%. Los leucocitos adicionados con *E. coli* presentaron una tendencia de medianas que no superó el límite basal, mientras que las células incubadas con *V. harveyi* presentaron valores de medianas que superaron el límite basal en los tiempos de 60 y 120 minutos. Los porcentajes de detección en leucocitos de tiburón para la proteína de población CD19 (B) propia de linfocitos B en mamíferos, mostraron valores de medianas entre el 30 y 40% en leucocitos incubados con *V. harveyi*, el resto de los estímulos adicionados incluido el grupo control presentaron valores de medianas por arriba del límite basal pero no superaron el 15% de detección.

A Superfamilia de inmunoglobulinas / Coestimulador / CD86



B Proteína dependiente de Ca⁺ / Activación / CD69

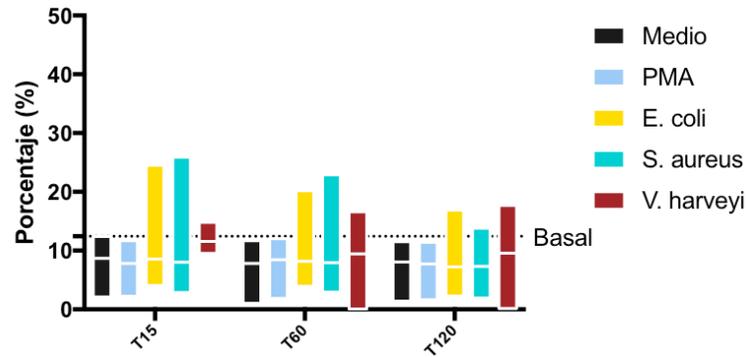
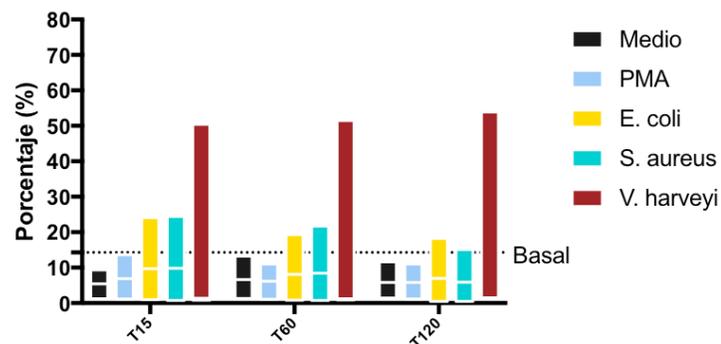


Figura 7. Gráficas de máximos y mínimos correspondientes a proteínas de activación. La línea punteada indica el porcentaje de detección basal de la proteína (n=3), la línea blanca muestra la ubicación de la mediana.

En la Figura 7 se pueden observar los porcentajes de detección en leucocitos de tiburón correspondientes a las proteínas de activación en mamíferos CD86 (A) y CD69 (B). En ambas gráficas se aprecia que ninguno de los estímulos presentó un valor de medianas por arriba del límite basal. Sin embargo, en este caso, el límite de detección basal para ambas proteínas supera el 10%.

A Glicoproteína / Desgranulación / CD107a



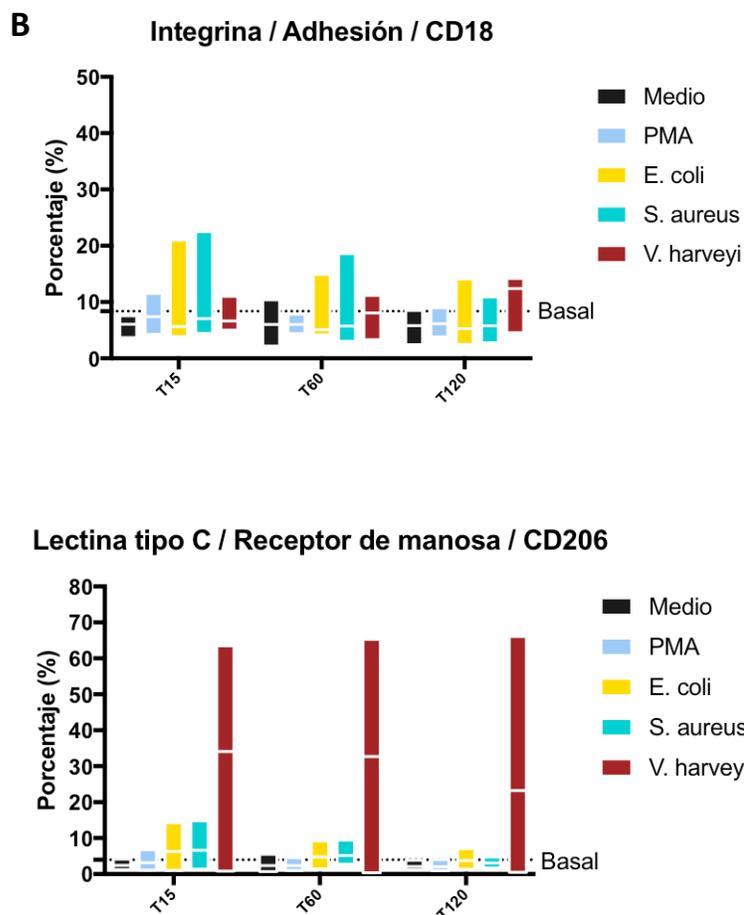


Figura 8. Gráfica de máximos y mínimos correspondientes a proteínas mediadoras de la interacción celular (integrinas). La línea punteada indica el porcentaje de detección basal de la proteína (n=3), la línea blanca muestra la ubicación de la mediana.

En la Figura 8 se agrupan las gráficas correspondientes a la detección en leucocitos sanguíneos de tiburón de proteínas relacionadas con la interacción celular (integrinas). Los resultados de la proteína CD107a (A) implicada en procesos de desgranulación en células de mamífero muestran valores de medianas por debajo del límite de detección para todos los estímulos aplicados. El mismo fenómeno se observa en la gráfica que corresponde a la proteína CD18 (B), relacionada con procesos de adhesión y migración en leucocitos de mamíferos; con excepción del estímulo de *V. harveyi*, el cual presentó un valor de medianas semejante al límite basal en el tiempo de 60 minutos y superior en los 120 minutos, mostrando un aumento en la detección de CD18 con respecto al tiempo. Por otro lado, los valores de medianas en leucocitos de tiburón para la proteína CD206 (C) que en mamíferos corresponde a un receptor de manosa, se encontraron entre el 30 y 40% en tiempos de 15 y 60 minutos y entre el 20 y 30% a los 120 minutos con el estímulo de *V. harveyi*. En el caso de *E. coli* y *S. aureus*, los valores de medianas presentaron un decremento con respecto al tiempo permaneciendo por debajo del límite basal a los 120 min.

1.2.2 Capacidad de engullimiento (fagocitosis)

El análisis de la capacidad de engullimiento de leucocitos de tiburón se realizó para cuatro grupos de datos (Figura 9): el total de los leucocitos (RT), la región 1 (células pequeñas y poco granulares), la región 2 (células grandes y medianamente granulares) y la región 3 (células muy granulares).

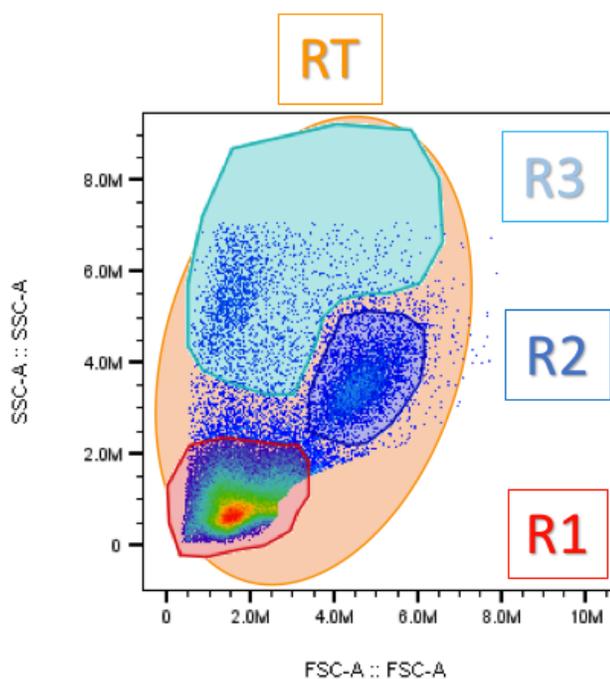
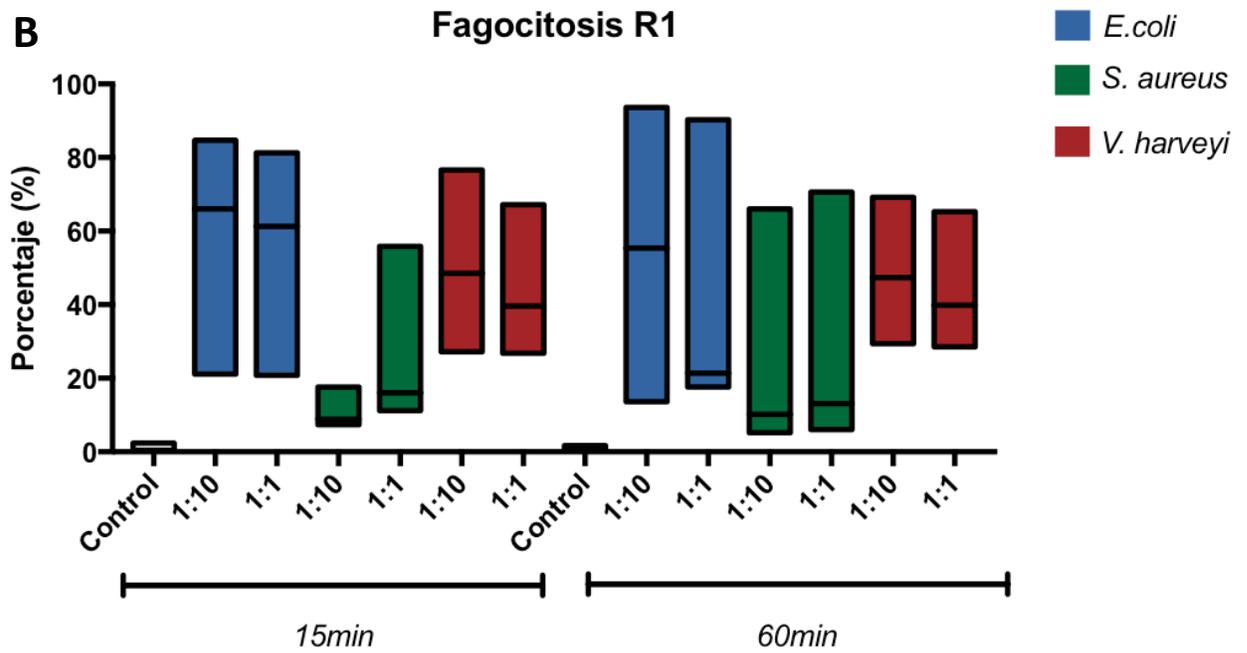
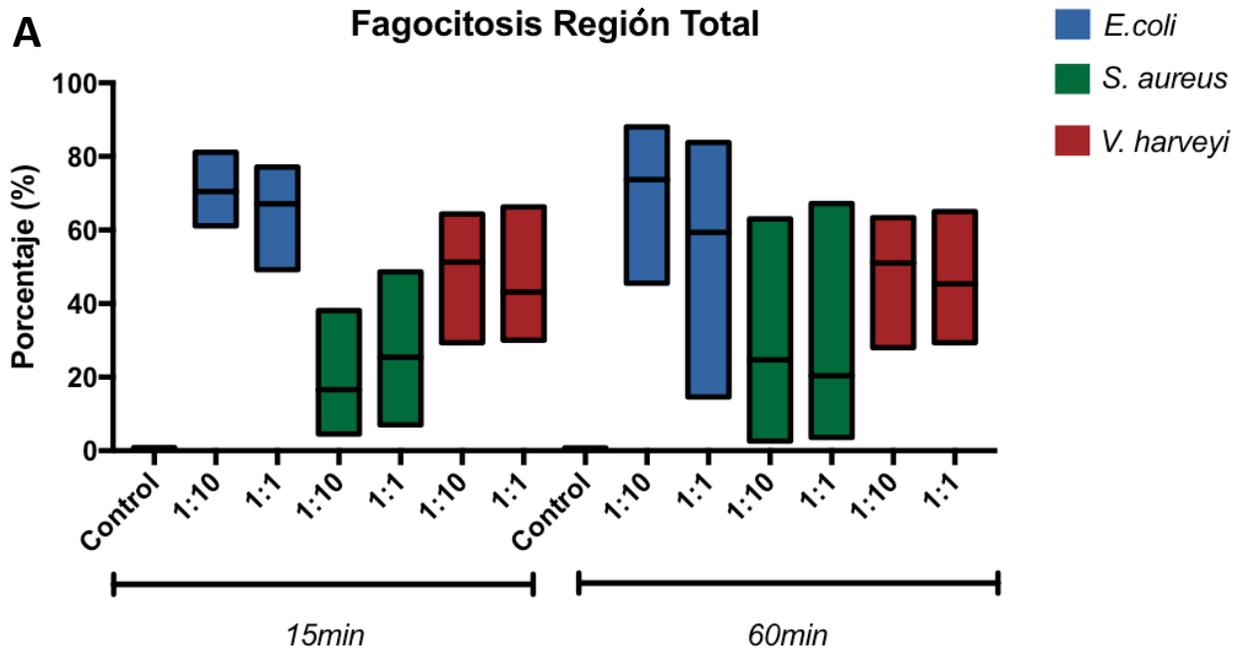


Figura 9. Imagen representativa de un diagrama de puntos donde se muestran las regiones leucocitarias para el análisis de capacidad de engullimiento. Leucocitos totales (RT), leucocitos pequeños y poco granulares (R1), leucocitos grandes y medianamente granulares (R2) y leucocitos muy granulares (R3).

Los siguientes resultados (Figura 10) muestran los valores máximos y mínimos del porcentaje de engullimiento de cada una de las regiones con respecto al estímulo bacteriano utilizado en dos proporciones distintas para tiempos de 15 y 60 minutos.



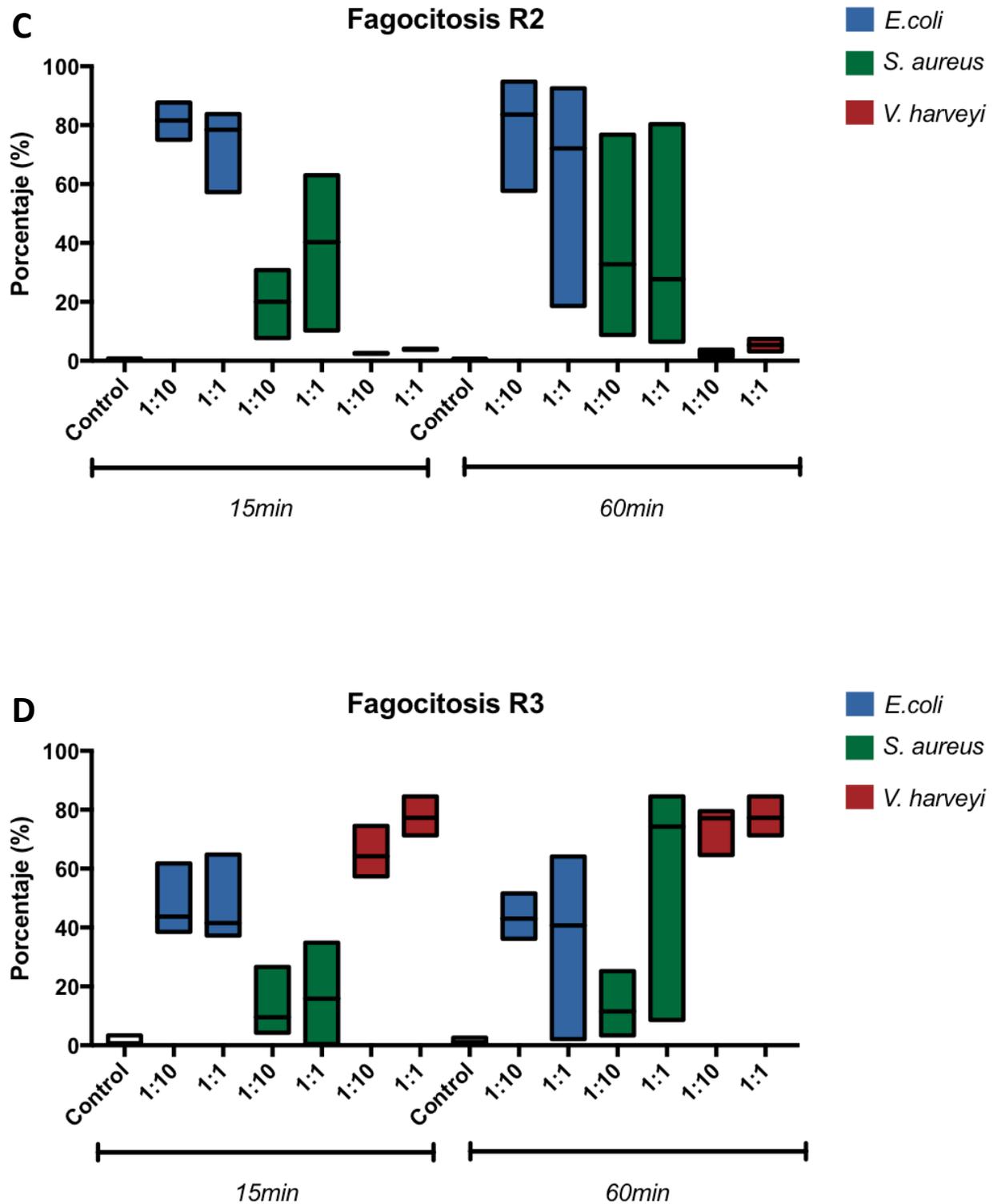


Figura 10. Porcentaje de engullimiento de cada región de leucocitos (n=3) incubados con o sin bacterias (*E. coli*, *S. aureus* y *V. harveyi*). La línea negra muestra la ubicación de la mediana. Se utilizaron dos proporciones 1:1 y 1:10 de células:bacterias para tiempos de 15 y 60 min. Los controles consisten en leucocitos incubados en medio sin bacterias.

En la Figura 10, la gráfica correspondiente a la fagocitosis de la Región Total (A) de los leucocitos sanguíneos de tiburón, muestra que *E. coli* resultó ser un fuerte inductor de los procesos de internalización alcanzando valores de medianas entre 60 y 80% para las dos proporciones de células:bacterias (1:10 y 1:1) en los dos tiempos de incubación (15 y 60 min). Los leucocitos incubados con *V. harveyi* alcanzaron valores de medianas entre el 40 y 60% en las dos proporciones para ambos tiempos; finalmente, el estímulo con *S. aureus* provocó eventos de internalización con valores de medianas abajo del 40% en la Región Total de leucocitos de tiburón.

Los valores de medianas en los leucocitos de la Región 1 (B) se mantuvieron similares a lo observado en la Región Total (A), siendo *E. coli* el estímulo con valores más altos de internalización, entre 60 y 70%, a excepción de la proporción 1:1 a los 60 minutos que disminuyó hasta el 20%. El estímulo de *V. harveyi* presentó valores de medianas cercanos al 50% en las dos proporciones y ambos tiempos. Finalmente, *S. aureus* mantuvo porcentajes de internalización bajos (menores a 20%) dados por los valores de medianas de los leucocitos incubados con esta bacteria en las dos proporciones y ambos tiempos.

Los leucocitos de la Región 2 (C) presentaron un fenómeno particular al obtener valores de internalización cercanos al 0% en las dos proporciones y ambos tiempos para el estímulo con *V. harveyi*. En el caso de *E. coli* se mantuvieron valores de medianas cercanos al 80% y con *S. aureus* valores de medianas entre 20 y 40% para las dos proporciones y ambos tiempos.

Los valores de medianas para el porcentaje de internalización en leucocitos de la Región 3 (D) en el tiempo de 15 minutos para las dos proporciones, muestra que las células internalizaron en mayor medida el estímulo de *V. harveyi* (entre 60 y 80%), seguido por *E. coli* (aproximadamente 40%) y finalmente *S. aureus* (menores a 20%). En el tiempo de 60 minutos los leucocitos incubados con *S. aureus* en la proporción 1:1 alcanzaron un valor de mediana cercano al 80%, evento similar a lo ocurrido con las células incubadas con *V. harveyi* en las dos proporciones. Por último, el estímulo de *E. coli* mantuvo valores de internalización cercanos al 40% en ambas proporciones, similar a lo ocurrido en el tiempo de 15 minutos.

1.3 Discusión

El sistema inmune está integrado por un gran número de células que a lo largo de los años se han clasificado en relación con las características morfológicas, genéticas o funcionales que presentan. Uno de los parámetros más aceptados para realizar estas distinciones es la presencia de proteínas de membrana que se expresan en los diferentes tipos celulares. En la inmunidad adaptativa por ejemplo, los linfocitos T y linfocitos B son fundamentales, los primeros se caracterizan por poseer una proteína co-receptora de TCR denominada CD4, a su vez, los linfocitos B exhiben en su membrana la glicoproteína de BCR llamada CD19. En muchas especies, este sistema de etiquetas ha funcionado para identificar a las poblaciones

celulares del sistema inmune mediante el uso de anticuerpos que son específicos para cada proteína, permitiendo clasificarlas, identificarlas en distintos tejidos, contabilizarlas e incluso separarlas.

Uno de los objetivos de nuestro trabajo fue realizar una caracterización del fenotipo leucocitario presente en la sangre periférica de tiburón, un organismo para el cual no se cuenta con herramientas específicas para su estudio, tales como, anticuerpos que detecten epítomos celulares. Resultados previos de nuestro grupo de trabajo demostraron que los anticuerpos monoclonales diseñados para reconocer proteínas de mamífero se unen a antígenos del tiburón probablemente por un mecanismo que se conoce como reactividad cruzada (Sánchez-Martínez, 2018).

La citometría de flujo es una técnica que nos permite identificar células dentro de una muestra con características definidas de tamaño, granularidad, presencia de proteínas e incluso contenido de ADN aprovechando las propiedades físicas de la luz. Para detectar los elementos distintivos entre las células, usualmente se utilizan anticuerpos con fluorocromos acoplados, cuando estos anticuerpos se unen a su antígeno, las moléculas fluorescentes que poseen emiten una señal que puede ser detectada y cuantificada, en nuestro caso, esta señal se tomó como porcentaje de células positivas. Con base en los resultados previamente obtenidos por el grupo de trabajo del Dr. Donis, se puede sustentar la hipótesis del presente estudio donde se dice que: hay epítomos conservados en las proteínas de membrana celular entre tiburón y mamífero que hacen posible que los anticuerpos monoclonales diseñados para humano o ratón detecten estas mismas regiones en proteínas de tiburón. De ser así, idealmente se podrían llevar a cabo múltiples ensayos utilizando anticuerpos comerciales.

Sin embargo, existe una segunda posibilidad que sugiere que los anticuerpos monoclonales diseñados para epítomos de mamífero detecten otro tipo de elementos que no necesariamente forman parte del sistema inmune. Para descartar esta posibilidad es necesario realizar otros estudios comparativos que nos permitan discriminar entre las proteínas a las cuales se unen estos anticuerpos.

Para tratar de relacionar las proteínas encontradas y su posible implicación en el sistema inmune, se realizó una cinética de detección en respuesta a un reto antigénico. Los resultados obtenidos fueron considerados como exploratorios debido a la naturaleza de los datos y la cantidad de individuos utilizados para el estudio (n=3). Dichos análisis revelaron que el estímulo con *V. harveyi* indujo un mayor porcentaje de expresión de la proteína poblacional/característica de linocitos B: CD19, y del receptor de manosa implicado en el reconocimiento entre células: CD206, usualmente encontrado en macrófagos y células dendríticas (células presentadoras de antígeno) de mamíferos. Así mismo, se observó que el porcentaje

de expresión para la proteína poblacional de linfocitos T-B: CD5, presentó una tendencia de medianas siempre por arriba del límite de detección basal al colocarse el estímulo de *S. aureus*. En los resultados presentados en este trabajo no se observó que el estímulo con *E. coli* provocara un cambio notable en la expresión de las proteínas de membrana analizadas en comparación con las dos bacterias previamente mencionadas.

Respecto a los resultados obtenidos se sugiere lo siguiente: los patrones moleculares asociados a *V. harveyi* (PAMPs) podrían inducir una señal mediada por receptores celulares (TLRs) de leucocitos inmaduros que inician un proceso de diferenciación hacia fagocitos especializados (CD206) y linfocitos B (CD19) basados en el tipo de proteína expresada en su membrana celular; bajo el mismo precepto, *S. aureus* contiene elementos que funjen como una señal de diferenciación hacia linfocitos T-B (CD5). Esta idea parte de trabajos donde se aprecian ciertas diferencias como tamaño y morfología nuclear de leucocitos de tiburón nodriza, señalando que las células del sistema inmune del tiburón presentes en sangre periférica se pueden encontrar en un estado inmaduro (Hyder *et al.*, 1983; Sylvia L. Smith y Robert B. Sim, 2014).

Otros trabajos realizados en células de mamífero señalan la relación de algunos TLRs en la diferenciación de células hematopoyéticas hacia poblaciones celulares específicas (Mcgettrick y Neill, 2007; Nymo *et al.*, 2018). Se ha demostrado que la diferenciación de células hematopoyéticas está regulada por varios factores que incluyen una gran variedad de citocinas, sin embargo, las células progenitoras también responden ante patógenos y sus derivados. Vadillo y colaboradores han mostrado que la velocidad y las condiciones de diferenciación de células altamente purificadas se ven alteradas ante la exposición a ligandos de TLRs; células hematopoyéticas de ratón tratadas con ligandos de TLR3 y elementos del virus de la influenza activadores de TLR 7 y 8 se diferenciaron hacia neutrófilos mientras que aquellas tratadas con ligandos de TLR 4 y 9 generaron células dendríticas en experimentos *in vitro* (Vadillo *et al.*, 2014). Las investigaciones señalan que al carecer de médula ósea, los procesos de diferenciación celular en el tiburón se llevan a cabo en la sangre y en órganos asociados al sistema inmune (timo, órgano de Leydig, glándulas epigonales y bazo) (Sylvia L. Smith y Robert B. Sim, 2014). En conjunto con los resultados obtenidos previamente por nuestro equipo de trabajo donde se demostró la presencia de TLR 1, 2, 3, 4 y 5 en leucocitos sanguíneos de tiburón, se podría mencionar que hay elementos asociados con bacterias que al ser reconocidos por los receptores de los leucocitos inmaduros, o bien, leucocitos *naive* del tiburón, promueven la expresión de proteínas hacia un fenotipo celular específico que podría tener similitud con poblaciones bien definidas en mamíferos e incluso compartir elementos implicados en las rutas de diferenciación.

Con el objetivo de complementar la información que se tiene sobre las células de la inmunidad innata del tiburón además del análisis fenotípico, se realizaron ensayos de función celular. En este caso se evaluó la capacidad de engullimiento de los leucocitos. Diversos autores han llevado a cabo estudios *in vitro* e *in vivo* en donde se reporta la capacidad fagocítica de los leucocitos provenientes de tejidos como la glándula epigonal y sangre periférica de distintas especies de elasmobranquios en presencia de diferentes estímulos, tales como: levaduras, eritrocitos, material particulado, complejos proteicos e incluso bacterias (Hyder *et al.*, 1983; Sylvia L. Smith y Robert B. Sim, 2014). Estos análisis se han realizado mediante técnicas de microscopía en donde se aprecia el estímulo adicionado al interior del citoplasma celular, esta estrategia ha sido empleada también para catalogar a los leucocitos con base en sus semejanzas estructurales con leucocitos de mamíferos, señalando la presencia de eosinófilos, neutrófilos, monocitos e incluso linfocitos en la sangre del tiburón.

Tratando de encontrar un criterio objetivo independiente de errores de percepción, se buscaron diferencias con respecto al tamaño, granularidad y capacidad de internalización para clasificar a las poblaciones celulares del tiburón, este proceso se realizó mediante el uso de la citometría de flujo observando que la muestra de leucocitos sanguíneos está conformada por tres grupos de células distintas: leucocitos pequeños y poco granulares, grandes y medianamente granulares, y células muy granulares. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando bacterias teñidas con el colorante TO-PRO3 (color rojo) que se une a los ácidos nucleicos, cuando los leucocitos internalizan a las bacterias teñidas, incorporan a su citoplasma este fluoróforo, que fue tomado como señal positiva durante las lecturas en el citómetro. Los resultados señalan que las tres regiones presentan porcentajes de engullimiento elevados, dependientes del estímulo (*E. coli*, *S. aureus* y *V. harveyi*); no es extraño pensar que las células responden de manera particular ante distintos retos antigénicos. Este fenómeno se observó de manera clara en los leucocitos de la región dos (células grandes y medianamente granulares), en donde se registró un engullimiento elevado para *E. coli* y valores intermedios para *S. aureus*, sin embargo, la señal de internalización para *V. harveyi* resultó casi inexistente. Esto sugiere que los leucocitos de la región dos responden de manera diferencial ante la presencia de *V. harveyi* iniciando posibles procesos de lisis o degradación de esta bacteria en tiempos muy cortos (menores a 15 minutos).

De acuerdo con los resultados de otras investigaciones realizadas con leucocitos de peces, se sabe que la fagocitosis no depende exclusivamente de células fagocíticas profesionales (macrófagos, neutrófilos y monocitos), sino que esta función en linfocitos se atribuye a la acción de células B (Li *et al.*, 2006). Estas observaciones, en conjunto con nuestros resultados, que indican que la tendencia de medianas no varía de forma abrupta en cuanto al tiempo (15 y 60 min), excepto en el caso antes

mencionado, nos daría la pauta para suponer que en sangre periférica de tiburón hay linfocitos con gran capacidad de engullimiento que internalizan patógenos sin propiciar su destrucción. Es posible, basados en la información obtenida en los análisis de citometría, en donde se evidencia la presencia de células muy granulares (característica usual de células fagocíticas), que la escasa variación de los porcentajes de engullimiento en cuanto al tiempo, se deba a que las células fagocíticas (granulocitos) están desempeñando una función de célula presentadora, internalizando a los microorganismos y preservándolos para posteriormente exponerlos a otras células.

Haciendo hincapié en los aspectos evolutivos de las células del sistema inmune y su relación con la capacidad fagocítica, Katsura en 2002 indicó una relación cercana entre las células B y los macrófagos, sugiriendo la existencia de una célula progenitora en común para ambas células en especies previas al surgimiento de los vertebrados mandibulados. Estos estudios representan una variación al paradigma que estipula que los fagocitos especializados decenden de células de origen mieloide y las células B tienen un origen linfoide (Katsura, 2002). Con base en los trabajos que sostienen esta hipótesis, sería posible pensar que los tiburones poseen células pluripotenciales a partir de las cuales se derivan estirpes particulares de células del sistema inmune dependientes de las condiciones del sistema e incluso del reto antigénico que confrontan.

Sin embargo, se necesitan más experimentos para conocer, comprender y comprobar las incógnitas que guarda un sistema inmune que precede incluso a la regencia de los dinosaurios.

Capítulo 2. Trampas Extracelulares (ETs)

2.1 Metodología

2.1.1 Tinción de bacterias para ensayos de inducción de Trampas Extracelulares (ETs)

Se recolectaron colonias de *E. coli*, *S. aureus* y *V. harveyi* y se depositaron en 1ml de PFA 4% y PBS 1X, el cual se centrifugó a 4000 g durante 5 minutos a 4º C seguido de una fijación con paraformaldehído (PFA) 4% durante 24 horas a 4º C. Transcurrida la fijación se centrifugó a 4000 g por 5 minutos a 4º C y se descartó el sobrenadante. Se re-suspendieron las bacterias en solución salina 1X y se tomó el volumen necesario para obtener 15 millones de células a las cuales se les agregaron 500 µl de diluyente C (Merck). A continuación se agregaron 500 µl de una solución de 490 µl de diluyente C y 10 µl de colorante PKH26. Se incubaron las células durante 60 min en condiciones de oscuridad y agitación, posteriormente se agregaron 500 µl de medio RPMI con suero de ratón (10%) para inactivar la actividad del diluyente C. Se realizaron dos lavados con solución salina a 4000 g durante 10 min y al finalizar se resuspendieron las células en 1 ml de solución PBS 1X.

2.1.2 Inducción de Trampas Extracelulares (ETs)

Se colocaron 200,000 células de leucocitos totales (LT) de sangre periférica de tiburón en placas con cubreobjetos a un volumen final de 500 µl de medio de cultivo. A cada pozo por separado se agregaron distintos estímulos: 50 µl de PMA [100nM] y 200,000 bacterias teñidas con PKH26 (*E. coli*, *S. aureus* y *V. harveyi*) respectivamente, y se incubaron durante 60, 120 y 180 min de acuerdo al siguiente esquema:

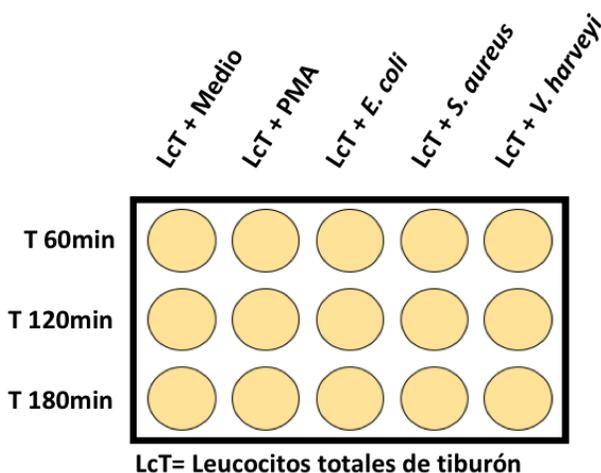


Figura 11. Diagrama experimental para ensayo de inducción de trampas extracelulares. Leucocitos totales de tiburón fueron incubados durante 60, 120 y 180 min en conjunto con distintos estímulos (PMA, *E. coli*, *S. aureus* y *V. harveyi*).

Al finalizar el tiempo de incubación se agregaron 500 μ l de PFA a una concentración final del 4% y se incubó toda la noche. Posterior a la fijación se realizaron cuidadosamente dos lavados con solución Hanks 1X y se agregó el colorante SYBR[®]Gold para la tinción de ácidos nucleicos. Los cubreobjetos fueron retirados de las placas y montados con *Vectashield* en portaobjetos para la observación y adquisición de imágenes en microscopio de epifluorescencia (Olympus IX81).

2.2 Resultados

Se obtuvieron imágenes de leucocitos de sangre periférica de tiburón posterior a la incubación durante 60, 120 y 180 min con distintos estímulos consistentes en: PMA y tres bacterias teñidas con PKH26.

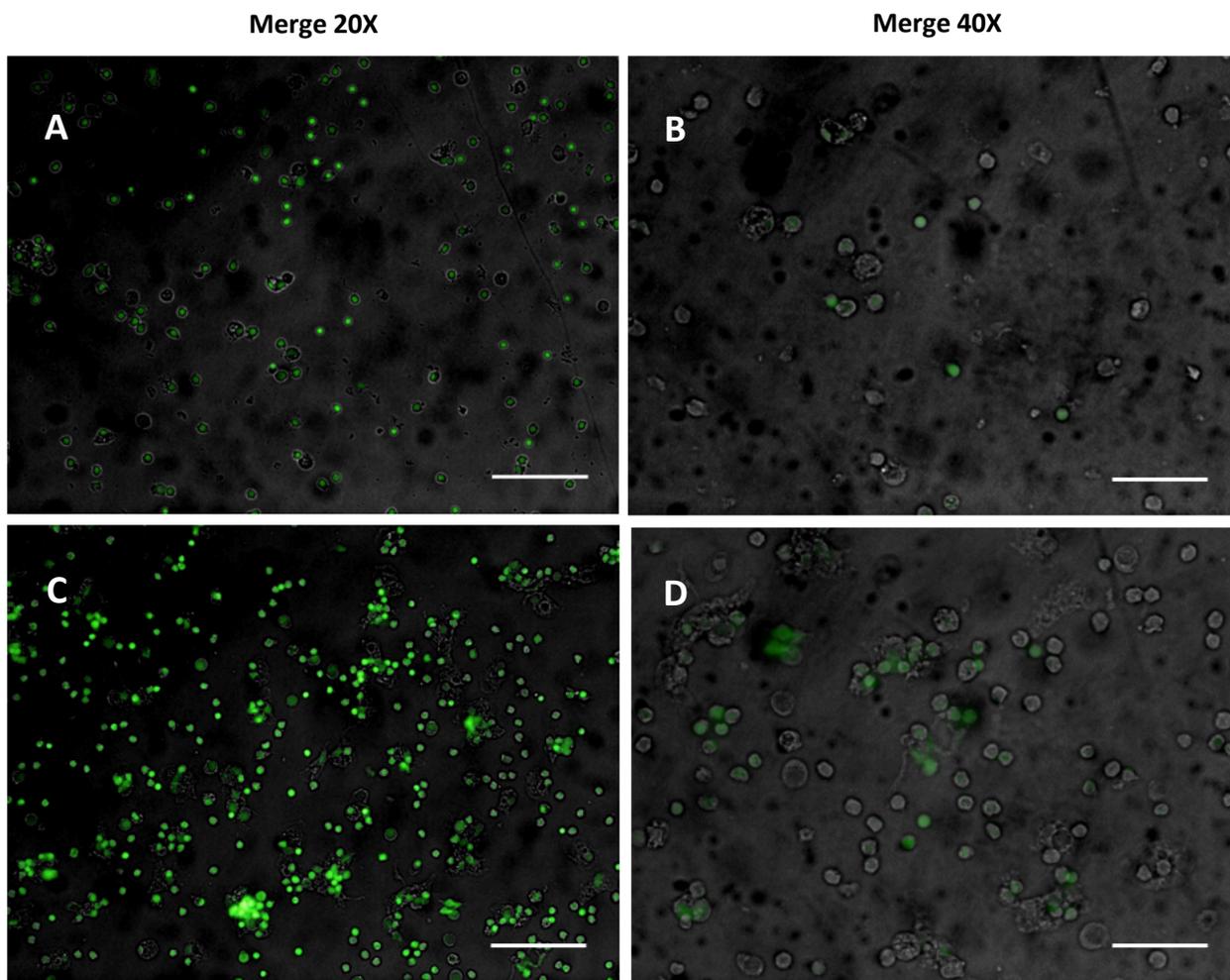


Figura 12. Imágenes de fluorescencia correspondientes al control sin estímulo (A, B) y al estímulo con PMA (C, D). Tiempo de incubación: 60 min. El ADN fue teñido con SYBR Gold (Verde). Barra de escala 20X: 50 μ m/40X: 25 μ m.

En la Figura 12, 14 y 16 (A y B) se aprecia la morfología basal de los leucocitos de tiburón incubados en medio de cultivo sin estímulos. Se observan células redondas con citoplasmas bien definidos durante los tres tiempos de incubación. Las células tratadas con PMA (C y D) presentaron una tendencia a agruparse y aumentaron el área citosólica.

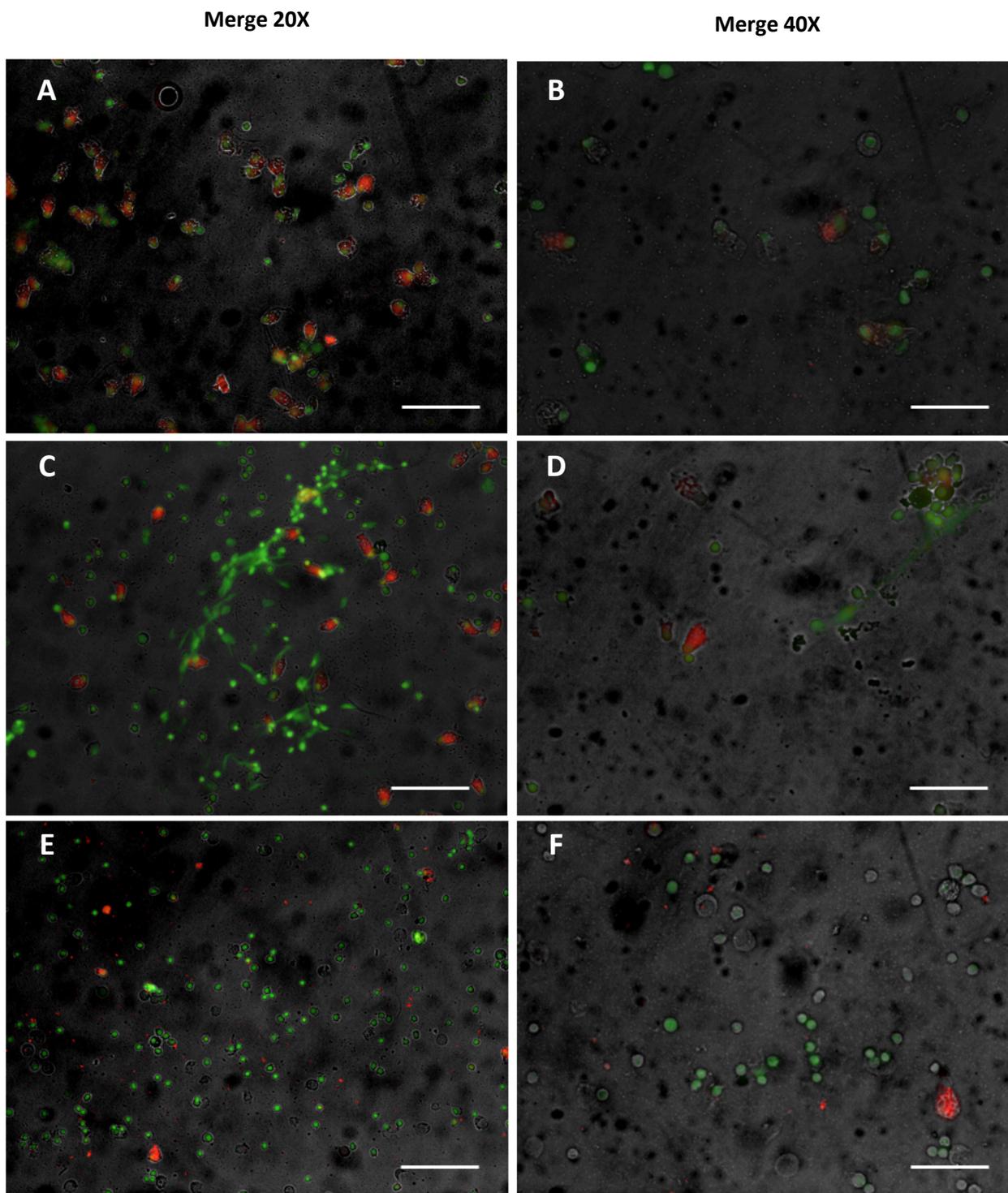


Figura 13. Imágenes de fluorescencia correspondientes a leucocitos de tiburón incubados con tres estímulos bacterianos. Tiempo de incubación: 60 min. ADN leucocitario teñido con SYBR Gold (Verde) y bacterias fijadas y teñidas con PKH26 (Rojo). Leucocitos incubados con *E. coli* (A, B), *S. aureus* (C, D) y *V. harveyi* (E, F). Barra de escala 20X: 50 μm /40X: 25 μm .

En la Figura 13 (C y D) se puede observar un efecto positivo en la inducción de estructuras similares a trampas extracelulares por parte del estímulo con *S. aureus* en el tiempo de 60 min. En color verde se indican las fibras de ADN presentes en el medio extracelular y en rojo las bacterias teñidas que en el caso de *E. coli* (A y B) y *V. harveyi* (E y F) sólo mostraron eventos de internalización por parte de los leucocitos.

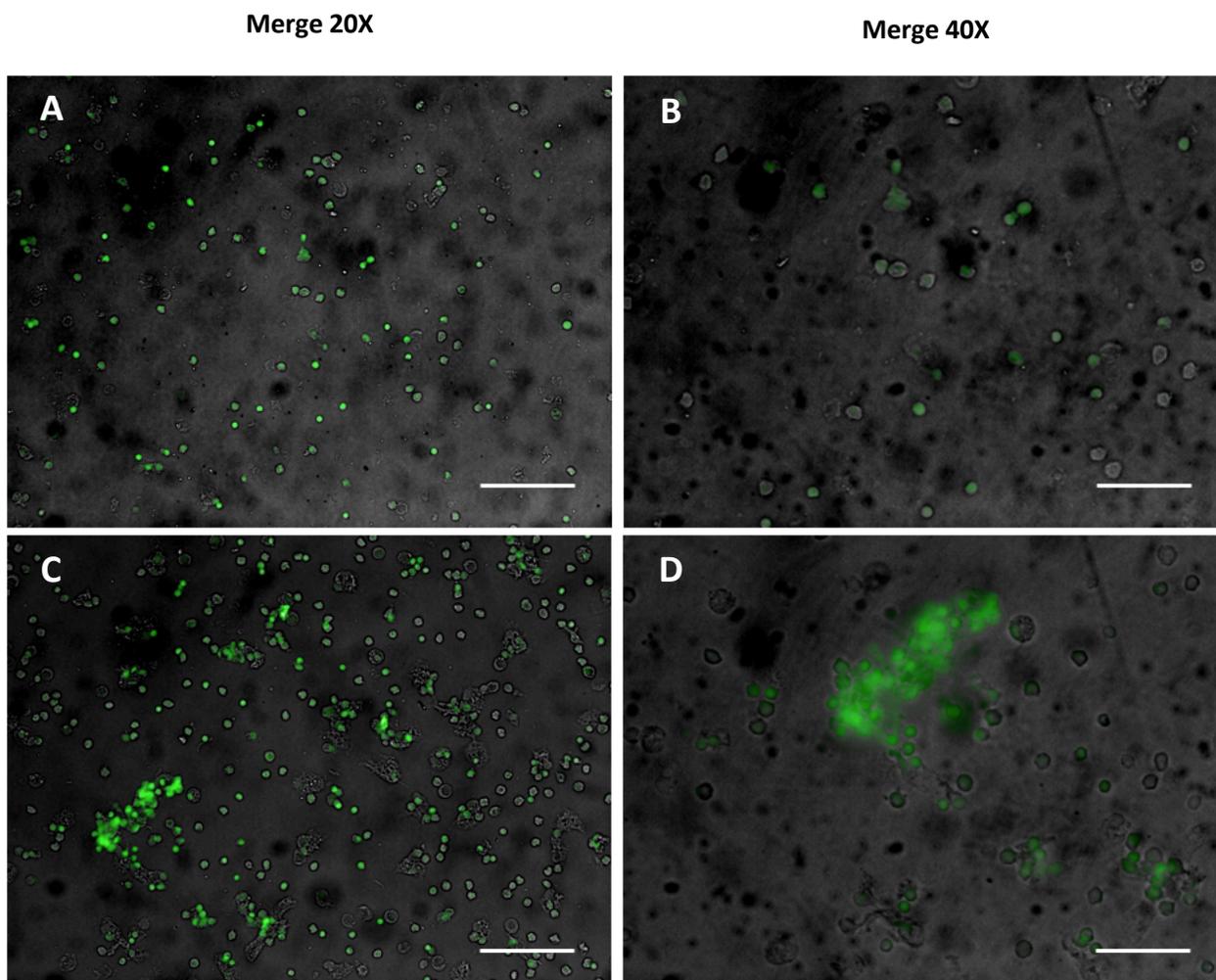


Figura 14. Imágenes de fluorescencia correspondientes al control sin estímulo (A, B) y al estímulo con PMA (C, D). Tiempo de incubación: 120 min. El ADN fue teñido con SYBR Gold (Verde). Barra de escala 20X: 50 μ m/40X: 25 μ m.

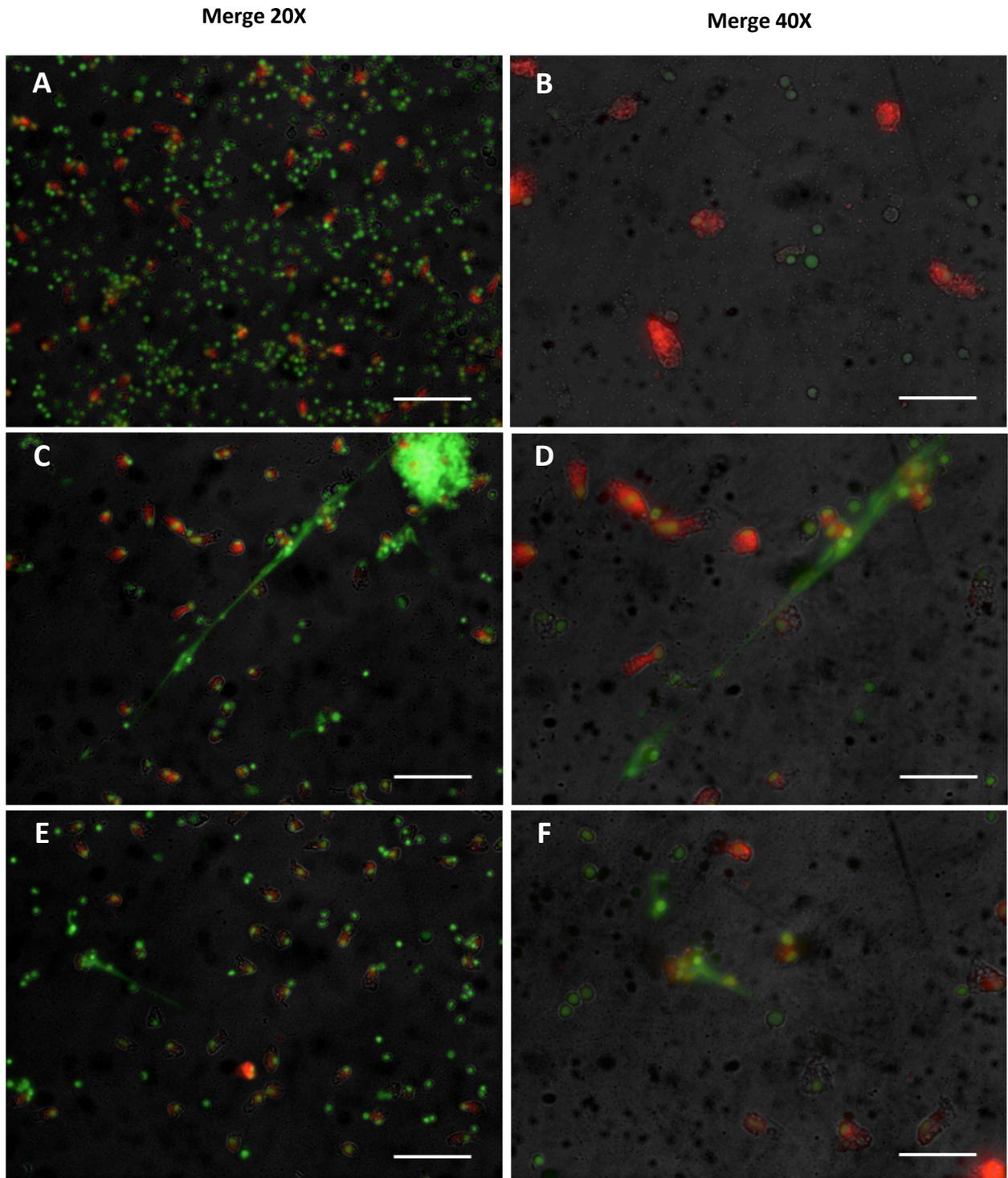


Figura 15. Imágenes de fluorescencia correspondientes a leucocitos de tiburón incubados con tres estímulos bacterianos. Tiempo de incubación: 120 min. ADN leucocitario teñido con SYBR Gold (Verde) y bacterias fijadas y teñidas con PKH26 (Rojo). Leucocitos incubados con *E. coli* (A, B), *S. aureus* (C, D) y *V. harveyi* (E, F). Barra de escala 20X: 50 μm /40X: 25 μm .

Una evidencia más clara de la presencia de estructuras similares a ETs en leucocitos de tiburón se observa en la Figura 15 de nuevo con el estímulo de *S. aureus* (C y D) para el tiempo de 120 min. En la ampliación a 40X (D) se aprecian las fibras de ADN extendiéndose a lo largo de medio extracelular inmovilizando algunas células bacterianas. Este efecto, no detectado con *V. harveyi* en el tiempo de 60 min se observa ahora en 120 min (E y F), aunque en menor medida con respecto a *S. aureus*.

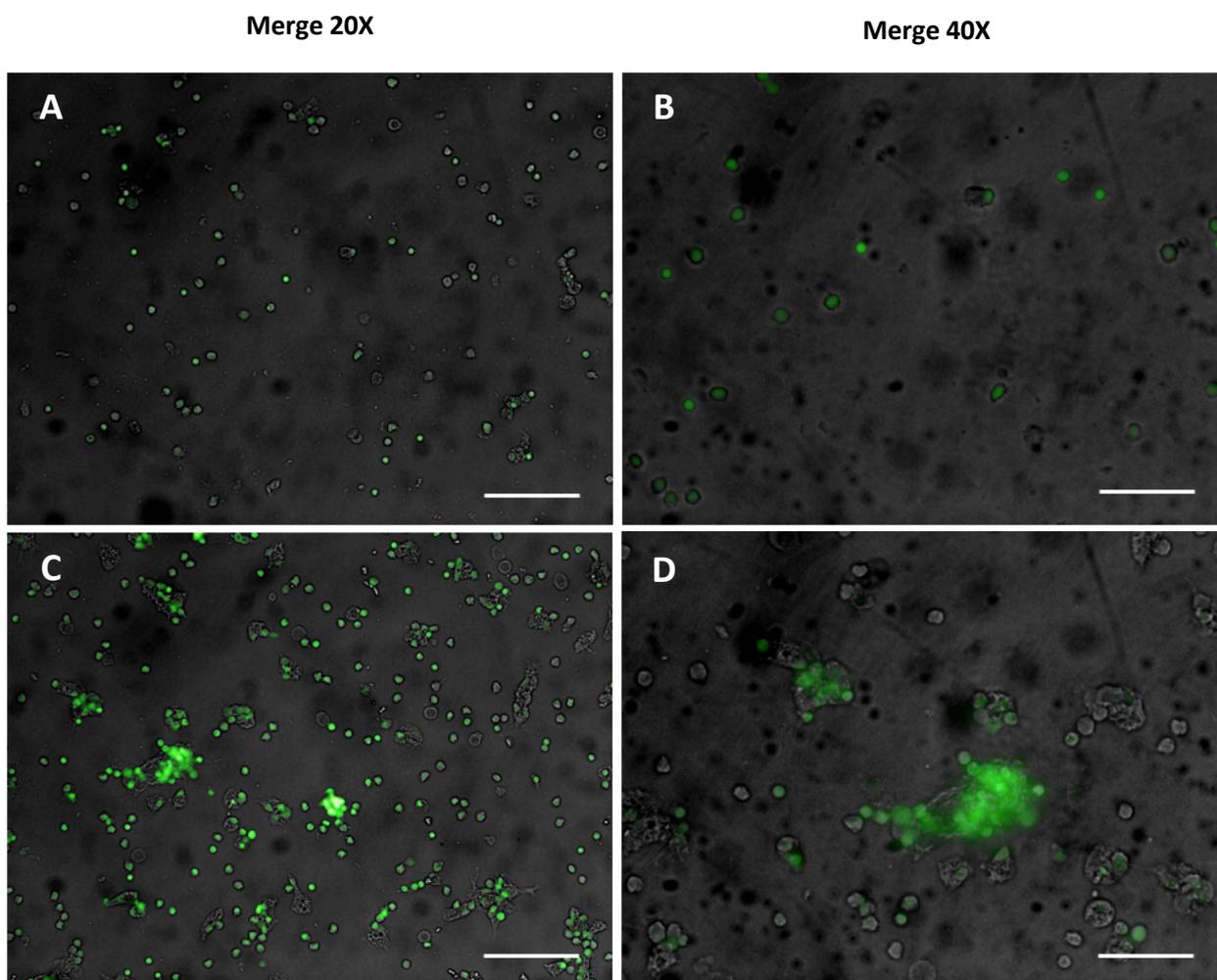


Figura 16. Imágenes de fluorescencia correspondientes al control sin estímulo (A, B) y al estímulo con PMA (C, D). Tiempo de incubación: 180 min. El ADN fue teñido con SYBR Gold (Verde). Barra de escala 20X: 50 μm /40X: 25 μm .

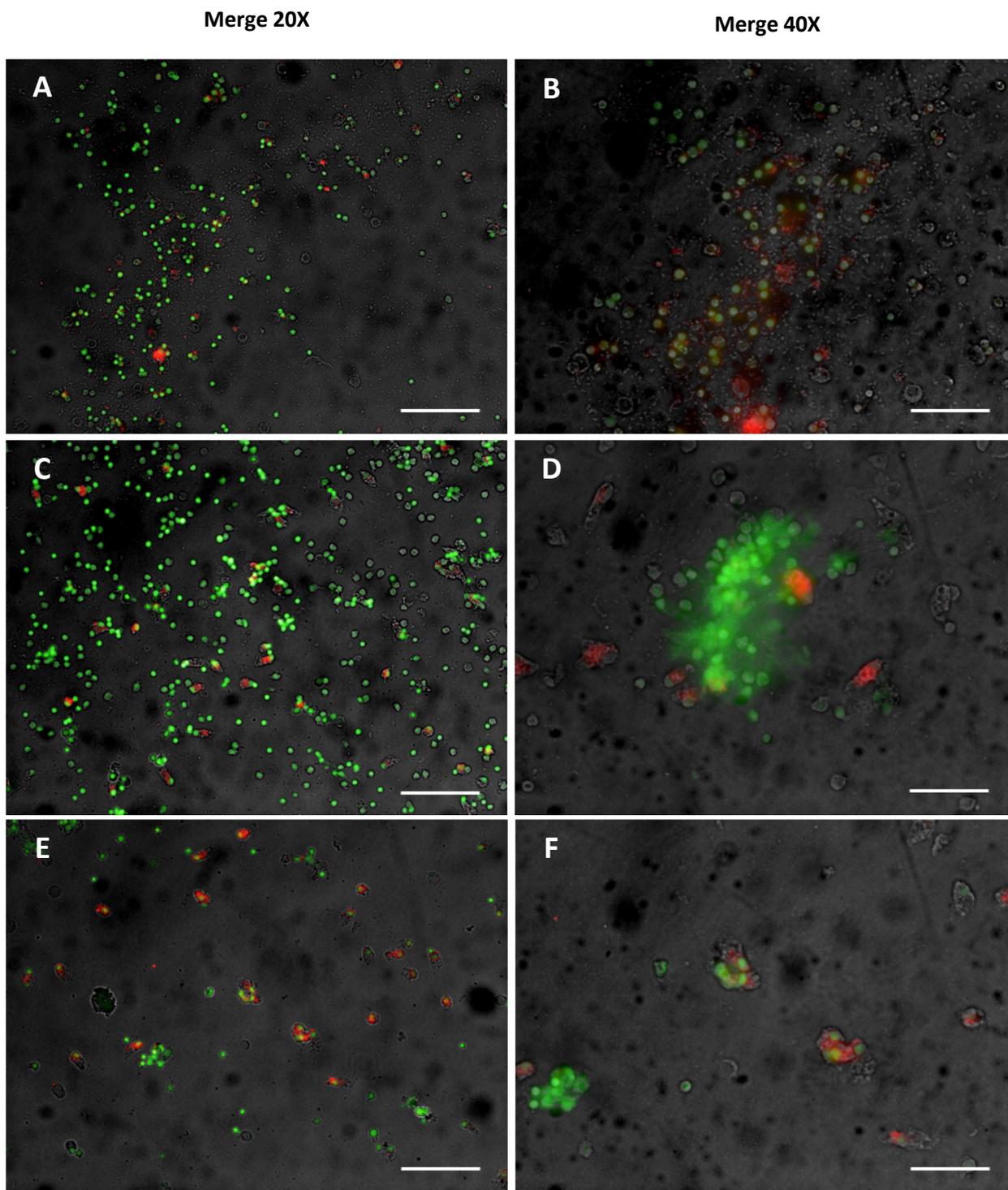


Figura 17. Imágenes de fluorescencia correspondientes a leucocitos de tiburón incubados con tres estímulos bacterianos. Tiempo de incubación: 180 min. ADN leucocitario teñido con SYBR Gold (Verde) y bacterias fijadas y teñidas con PKH26 (Rojo). Leucocitos incubados con *E. coli* (A, B), *S. aureus* (C, D) y *V. harveyi* (E, F). Barra de escala 20X: 50 μm /40X: 25 μm .

Para tiempos de incubación de 180 min con las tres bacterias mostrados en la Figura 17, se observa reiteradamente que *E. coli* no induce la formación de trampas extracelulares en leucocitos de tiburón. En cuanto al estímulo con *S. aureus* en la imagen ampliada a 40X (D) aún se aprecia una estructura con fibras de ADN alrededor de un cúmulo de células y bacterias, mientras que los leucocitos incubados con *V. harveyi* ya no muestran evidencia de la inducción de trampas extracelulares.

2.3 Discusión

Desde su descubrimiento en neutrófilos humanos (Brinkmann *et al.*, 2004) las trampas extracelulares, se han propuesto como una estrategia más del repertorio de defensa innata. Incluso, se ha mencionado que la cromatina evolucionó con dos funciones: organizar grandes cantidades de ADN y como elemento de defensa para proteger la integridad de los genomas. Se ha discutido que las trampas extracelulares pueden ser una de las configuraciones en las cuales la cromatina es utilizada como mecanismo de defensa en formas de vida ancestrales; además, otro componente asociado al ADN que pudo haber evolucionado con doble actividad (estructural y de defensa) son las histonas, proteínas que también poseen actividad antimicrobiana (Brinkmann y Zychlinsky, 2012). El hecho de haber descrito la presencia de trampas extracelulares o bien, estructuras semejantes, en diversos organismos de distintos filos nos habla de la importancia que refiere esta estrategia inmunológica que se ha conservado a lo largo de la evolución.

Como parte de los objetivos de este trabajo se trató de dilucidar la presencia de trampas extracelulares en leucocitos de tiburón *H. francisci*, un organismo que tiene un origen evolutivo dentro del grupo de los elasmobranquios desde hace aproximadamente 250 millones de años (Davies *et al.*, 1987). Se utilizó la técnica de microscopía de fluorescencia que consiste en incorporar a las células una molécula fluorescente con afinidad por estructuras específicas que al unirse a ellas, y ser estimulada con ciertas longitudes de onda emite una señal fluorescente. En nuestros experimentos se utilizó el colorante SYBR Gold para teñir el material genético en color verde ya que presenta una mayor afinidad por los ácidos nucleicos y demostró una alta sensibilidad en comparación con otras tinciones como DAPI (6-diamidino-2-fenilindol), IP (yoduro de propidio), 7AAD (7-aminoactinomicina), SYBR Green I, II y Sytox Green. Las bacterias utilizadas fueron marcadas en color rojo con el colorante PKH26 que se une a las regiones ricas en lípidos que rodean la pared celular bacteriana, de manera que se pudieron identificar en el medio extracelular, entre las redes de ADN e incluso en el citoplasma de las células.

En diversas publicaciones se utiliza al miristato acetato de forbol (*PMA*) como un potente mitógeno capaz de activar a los neutrófilos e inducir ETs (Brinkmann *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2007), por lo tanto se utilizó como estimulador de los leucocitos de tiburón sin obtener resultados positivos en los tres tiempos de incubación tal y como se observa en la Figura 12, 14 y 16 (C y D). Se ha demostrado que las ETs generadas en neutrófilos humanos y heterófilos de pollo posterior al estímulo con *PMA*, están dadas por un aumento en el estrés oxidativo (producción de ROS), producto de una activación de la vía de señalización de la proteína cinasa C (*PKC*)/NADPH (Chuammitri *et al.*, 2009). En nuestros resultados no se observó que el *PMA* propiciara la formación de ETs, lo cual sugiere que la concentración de este mitógeno fue insuficiente o que el estímulo requerido para observar tal efecto debe ser distinto; por lo tanto, podríamos plantear que en leucocitos de tiburón la presencia de *PMA* no es un indicador determinante para la producción de especies reactivas de oxígeno, especies químicas que inducen la generación de trampas extracelulares. En contraste con nuestras observaciones, se ha reportado que en neutrófilos de *Pimephales promelas*, un pez de agua dulce, la cantidad de NETs inducidas por *PMA* es significativamente menor que aquéllas inducidas mediante la incubación con iones de calcio, un activador de diversas rutas de señalización implicadas por ejemplo, en procesos de desgranulación.

Además del uso compuestos químicos, diversos autores han referido a las bacterias como *E. coli* y *S. aureus* y/o elementos asociados (LPS, toxinas preformadas, sonicados bacterianos) como agentes inductores de trampas extracelulares en neutrófilos humanos, murinos y granulocitos de peces, crustáceos y aves (Chuammitri *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2007; Grinberg *et al.*, 2008; Koiwai *et al.*, 2016; Palić *et al.*, 2007; Yipp *et al.*, 2012), por lo tanto se evaluó la capacidad de dichas bacterias para inducir ETs en leucocitos de *H. fransisci*. Además se utilizó un microorganismo marino como *Vibrio harveyi* para evaluar su efecto en este tipo de respuesta inmune innata debido al entorno en el cual habita el tiburón.

Nuestros resultados con *S. aureus* contrastan con los datos que reportan la inducción de NETs en neutrófilos de mamíferos tratados con dicha bacteria (Berends *et al.*, 2010; Brinkmann *et al.*, 2004; Yipp *et al.*, 2012), fenómeno que sugiere que los leucocitos de tiburón en contacto con elementos de esta bacteria Gram positiva son capaces de inducir ETs. En neutrófilos de ratón se demostró que hay dos sistemas claves en la respuesta contra *S. aureus*: la respuesta inflamatoria mediada por TLR2 y el complemento. La formación de trampas extracelulares es dependiente de la activación de MyD88, segundo mensajero de TLR2 y el componente C3 del complemento. En ratones deficientes de estas dos moléculas, no se generaron NETs en presencia de *S. aureus* (Yipp *et al.*, 2012). Esto sugiere que posiblemente la inducción de ETs en leucocitos de tiburón en respuesta a esta bacteria Gram positiva es mediada por una maquinaria similar a la que poseen los neutrófilos de ratón, debido al reconocimiento

por parte del TLR2; de llevarse a cabo las perspectivas de este trabajo se podría demostrar que es un mecanismo de defensa sumamente antiguo que mantiene rutas de señalización conservadas entre dos especies evolutivamente muy distantes.

Respecto a los resultados obtenidos en leucocitos de tiburón incubados con *E. coli*, se observa una ausencia de trampas extracelulares en los tres tiempos de incubación. El principal componente patógeno de las bacterias Gram negativas es el LPS. Trabajos reportados en hemocitos de crustáceos y neutrófilos humanos revelaron que el LPS así como la interleucina 8 son fuertes activadores de granulocitos que facilitan y en algunos casos promueven la formación de trampas extracelulares. En los leucocitos el TLR4 es un receptor determinante en el reconocimiento de lipopolisacáridos y desencadena procesos inflamatorios y producción de distintas citocinas que median la activación de las células. De acuerdo a nuestros experimentos se puede argumentar que el LPS presente en *E. coli* no representa una señal determinante para la formación de trampas extracelulares en leucocitos de tiburón, sugiriendo que esta bacteria promueve principalmente un estímulo que activa el proceso de internalización, el cual en granulocitos humanos está relacionado a proteínas de reconocimiento de patrones como lectinas que incluyen receptores de manosa, dectinas, receptores *scavenger* y TLRs (Abbas *et al.*, 2011), se podría aludir que la inducción de ETs en leucocitos de tiburón está más relacionada con la participación del TLR2 en respuesta a elementos de bacterias Gram positivas, o bien, probablemente se requiera utilizar dos o más estímulos simultáneos.

Finalmente con respecto a *V. harveyi*, un patógeno marino Gram negativo que afecta principalmente a peces, se ha demostrado que otras especies del mismo género como *V. cholerae*, microorganismo patógeno causante del cólera en humanos, son capaces de inducir la formación de ETs en neutrófilos de mamífero (Boe *et al.*, 2015; Seper *et al.*, 2013). Nuestros resultados muestran estructuras similares a trampas extracelulares en el tiempo de 120 minutos donde se aprecian fibras de ADN en el medio extracelular en las muestras con *V. harveyi* imitando los efectos que *V. cholerae* genera en los neutrófilos murinos. Sin embargo, para el tiempo de 180 min no se encuentran evidencias de la presencia de ETs en estas muestras. Adicionalmente se ha reportado la capacidad de *V. cholerae* para evadir las trampas extracelulares mediante el uso de nucleasas extracelulares en experimentos *in vivo* (Seper *et al.*, 2013). Dicho trabajo señala que *V. cholerae* además de inducir la producción de trampas extracelulares tiene la capacidad de escapar de ellas degradando las fibras de ADN con la participación de dos exonucleasas (Dns y Xds). De acuerdo con lo anterior, podríamos argumentar que *V. harveyi* posee elementos que, si bien son capaces de generar una respuesta en forma de ETs también tienen la capacidad de degradar a las mismas, de modo que para tiempos de 120 min el estímulo es suficiente para provocar

la expulsión del material genético de los leucocitos de tiburón que con el paso del tiempo es consumido por la acción de elementos asociados a esta bacteria.

6. Conclusiones

- Los elementos asociados a los distintos estímulos bacterianos son reconocidos por receptores leucocitarios que promueven la expresión de proteínas generando un fenotipo celular particular que podría corresponder con poblaciones definidas de leucocitos en mamíferos como linfocitos B (CD19), T-B (CD5) y fagocitos profesionales (CD206).
- La expresión de estas proteínas además de brindar una identidad a los leucocitos, mantiene relación con funciones celulares como la capacidad de engullimiento, que se ve aumentada ante la presencia de bacterias Gram negativas (*E. coli* y *V. harveyi*).
- Se demostró la presencia de estructuras semejantes a trampas extracelulares en leucocitos sanguíneos de *H. francisci* incubados con una bacteria Gram positiva (*S.aureus*). La inducción de esta respuesta inmune innata ante el estímulo con dicha bacteria en leucocitos de tiburón es semejante a la que se reporta en neutrófilos de mamífero.

La respuesta celular en leucocitos de *H. francisci* incluye la expresión de proteínas de membrana que brindan identidad a los leucocitos y la activación de funciones innatas particulares. Esta respuesta es dependiente y varía con respecto al estímulo bacteriano al que se enfrenten las células y en muchos casos presenta similitudes con los procesos de estímulo-respuesta observados en mamíferos, lo que sugiere que existe la conservación de elementos y mecanismos inmunológicos a lo largo de la evolución.

Este trabajo representa un primer acercamiento al estudio de los aspectos celulares del sistema inmune del tiburón *Heterodontus francisci*. Es necesario realizar más experimentos que incluyen:

- Identificación de proteínas de membrana mediante *Western blot*.
- Realizar ensayos de activación y función empleando agonistas de TLRs.
- Comprobar la presencia de elementos asociados a trampas extracelulares como histonas, elastasas y especies reactivas de oxígeno.
- Llevar a cabo procedimientos de separación de leucocitos por presencia de proteínas para estudios de funcionalidad.

Literatura citada

- Abbas, Abul K., Lichtman, Andrew H., Pillai, S. (2011). *Inmunología celular y molecular*.
- Anandhakumar, C., Lavanya, V., Pradheepa, G., Tirumurugaan, K. G., Dhinakar Raj, G., Raja, A., Balachandran, C. (2012). Expression profile of toll-like receptor 2 mRNA in selected tissues of shark (*Chiloscyllium* sp.). *Fish and Shellfish Immunology*, 33(5), 1174–1182. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.007>
- Berends, E. T. M., Horswill, A. R., Haste, N. M., Monestier, M., Nizet, V., & Von Köckritz-Blickwede, M. (2010). Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *Journal of Innate Immunity*, 2(6), 576–586. <https://doi.org/10.1159/000319909>
- Betts, M. R., y Koup, R. A. (2004). Detection of T-Cell Degranulation: CD107a and b. *Methods in Cell Biology*, 75, 497–512. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(04\)75020-7](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(04)75020-7)
- Boe, D. M., Curtis, B. J., Chen, M. M., Ippolito, J. A., y Kovacs, E. J. (2015). Extracellular traps and macrophages : new roles for the versatile phagocyte, 97(June). <https://doi.org/10.1189/jlb.4R1014-521R>
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria Brinkmann Science 2004.pdf. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5663), 1532–5. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
- Brinkmann, V., y Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *Journal of Cell Biology*, 198(5), 773–783. <https://doi.org/10.1083/jcb.201203170>
- Camacho-Villegas, T., Mata-Gonzalez, T., Paniagua-Solis, J., Sanchez, E., y Licea, A. (2013). Human TNF cytokine neutralization with a vNAR from *Heterodontus francisci* shark. *MAbs*, 5(1), 80–85. <https://doi.org/10.4161/mabs.22593>
- Castellanos Vidal, C. M. (2017). *Biología reproductiva de tiburón perro *Heterodontus francisci* en la laguna Ojo de Liebre , Baja California Sur , México*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.
- Chuammitri, P., Ostojić, J., Andreasen, C. B., Redmond, S. B., Lamont, S. J., y Palić, D. (2009). Chicken heterophil extracellular traps (HETs): Novel defense mechanism of chicken heterophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 129(1–2), 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.12.013>
- Davies, D. H., Lawson, R., Butch, S. J., y Hanson, J. E. (1987). Evolutionary Relationships of a " Primitive " Shark (*Heterodontus*) Assessed by Micro-complement Fixation of Serum Transferrin, 74–80.
- Dooley, H., y Flajnik, M. F. (2005). Shark immunity bites back: Affinity maturation and memory response in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *European Journal of Immunology*, 35(3), 936–945. <https://doi.org/10.1002/eji.200425760>

- Feige, M. J., Gräwert, M. A., Marcinowski, M., Hennig, J., y Behnke, J. (2014). The structural analysis of shark IgNAR antibodies reveals evolutionary principles of immunoglobulins, *111*(22), 8155–8160. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321502111>
- Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, *176*(2), 231–241. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>
- Gordon, S. (2016). Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity*, *44*(3), 463–475. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.026>
- Greenberg, A., Avila, D., Hughes, M., Hughes, A., McKinney, E., Flajnik, M. (1995). A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*, *374*, 168–173. <https://doi.org/doi:10.1038/374168a0>
- Grinberg, N., Elazar, S., Rosenshine, I., y Shpigel, N. Y. (2008). β -hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, *76*(6), 2802–2807. <https://doi.org/10.1128/IAI.00051-08>
- Häsler, J., Flajnik, M. F., Williams, G., Walsh, F. S., y Rutkowski, J. L. (2016). VNAR single-domain antibodies specific for BAFF inhibit B cell development by molecular mimicry. *Molecular Immunology*, *75*, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.05.009>
- Hyder, S. L., Cayer, M. L., y Pettey, C. L. (1983). Cell types in peripheral blood of the nurse shark: an approach to structure and function. *Tissue & Cell*, *15*(3), 437–455. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(83\)90075-7](https://doi.org/10.1016/0040-8166(83)90075-7)
- Katsura, Y. (2002). Redefinition of lymphoid progenitors, *2*(February), 1–6.
- Koiwai, K., Alenton, R. R. R., Kondo, H., y Hirono, I. (2016). Extracellular trap formation in kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) hemocytes is coupled with c-type lysozyme. *Fish and Shellfish Immunology*, *52*, 206–209. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.039>
- Li, J., Barreda, D. R., Zhang, Y., Boshra, H., Gelman, A. E., Lapatra, S., Sunyer, J. O. (2006). B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities, *7*(10), 1116–1124. <https://doi.org/10.1038/ni1389>
- Luo, M., Kim, H. R., Kudrna, D., Sisneros, N. B., Lee, S. J., Mueller, C., Ohta, Y. (2006). Construction of a nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*) bacterial artificial chromosome (BAC) library and a preliminary genome survey. *BMC Genomics*, *7*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-106>
- Mashoof, S., y Criscitiello, M. (2016). Fish Immunoglobulins. *Biology*, *5*(4), 45. <https://doi.org/10.3390/biology5040045>
- McArthur, J., y Fletcher, T. (1985). *Fish Immunology* (pp. 29-46). United Kingdom: Elsevier.
- Mcgettrick, A. F., y Neill, L. A. J. O. (2007). Toll-like receptors : key activators of leucocytes and regulator of haematopoiesis, 185–193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06802.x>

- Ng, T. H., Chang, S. H., Wu, M. H., y Wang, H. C. (2013). Shrimp hemocytes release extracellular traps that kill bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(4), 644–651. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.06.014>
- Nymo, S., Gustavsen, A., Nilsson, P. H., Lau, C., Espevik, T., y Mollnes, T. E. (2018). Human Endothelial Cell Activation by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Is Mediated by TNF and IL-1 β Secondarily to Activation of C5 and CD14 in Whole Blood. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502220>
- Palić, D., Ostojić, J., Andreasen, C. B., y Roth, J. A. (2007). Fish cast NETs: Neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. *Developmental and Comparative Immunology*, 31(8), 805–816. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.11.010>
- Parra, D., Takizawa, F., y Sunyer, J. O. (2013). Evolution of B Cell Immunity. *Annual Review of Animal Biosciences*, 1(1), 65–97. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103651>
- Pettinello, R., y Dooley, H. (2014). The immunoglobulins of cold-blooded vertebrates. *Biomolecules*, 4(4), 1045–1069. <https://doi.org/10.3390/biom4041045>
- Sánchez-Martínez, M. (2018). Caracterización Fenotípica de Poblaciones Leucocitarias y TLRs en Tiburón Cornudo (*Heterodontus francisci*) por citometría de flujo (Tesis de licenciatura). Instituto Tecnológico de Sonora, Cd. Obregón, México
- Scapigliati, G. (2013). Functional aspects of fish lymphocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(2), 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.05.012>
- Seper, A., Hosseinzadeh, A., Gorkiewicz, G., Lichtenegger, S., Roier, S., Grutsch, A., Schild, S. (2013). *Vibrio cholerae* Evades Neutrophil Extracellular Traps by the Activity of Two Extracellular Nucleases, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003614>
- Sylvia L. Smith, Robert B. Sim, M. F. F. (2014). Immunobiology of the Shark, 326.
- Vadillo, E., Dorantes-acosta, E., Arriaga-pizano, L., Chavez-gonzalez, A., Reyes-maldonado, E., y Garrett, K. P. (2014). Adult , but not neonatal , human lymphoid progenitors respond to TLR9 ligation by producing functional NK-like cells, 562–573. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2014.03.008>
- Venkatesh, B., Lee, A. P., Ravi, V., Maurya, A. K., Lian, M. M., Swann, J. B., Warren, W. C. (2014). Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution. *Nature*, 505(7482), 174–179. <https://doi.org/10.1038/nature12826>
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., y Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578–6583. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578>
- Wilhelm, S. W., y Suttle, C. A. (1999). Viruses and Nutrient Cycles the aquatic food webs, 49(10), 781–788.
- Yipp, B. G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C. N., Scott, B. N. V., Zbytniuk, L. D., Kubes, P. (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature Medicine*, 18(9), 1386–1393. <https://doi.org/10.1038/nm.2847>

Anexos

1. Lista de reactivos

Percoll: Suspensión coloidal de partículas de sílice de 15 a 30 nm de diámetro recubiertas con polivinilpirrolidona (PVP). Es utilizado para establecer gradientes no tóxicos de baja viscosidad y osmolaridad que son utilizados para la separación de células, organelos y virus.

Solución Hank's: Solución balanceada de sales diseñada para el uso con células que se mantienen en condiciones atmosféricas sin CO₂. Mantiene el pH y el balance osmótico.

Azul tripán: Colorante azul de pH ácido. Es un colorante aniónico de gran tamaño, hidrofílico, utilizado en ensayos de exclusión y viabilidad celular, en los cuales el compuesto se incorpora al medio intracelular en células muertas y las tiñe de color azul intenso.

Paraformaldehído: Compuesto químico que reacciona con los grupos funcionales de macromoléculas biológicas. Es utilizado comúnmente para fijar células. Durante este procedimiento las estructuras proteínicas se preservan pero pierden su actividad.

TOPRO-3: Colorante de ácidos nucleicos con fluorescencia en rojo lejano similar a Alexa 647. Es útil como contratinción nuclear o como indicador de muerte celular y se encuentra dentro de las sondas con mayor sensibilidad de detección de ácidos nucleicos. Máxima excitación a 642 nm y máxima emisión a 661 nm.

PKH26: Colorante fluorescente de color amarillo/anaranjado con largas extensiones alifáticas (PKH26) que se unen a las regiones ricas en lípidos de la membrana celular. Requiere el uso de un diluyente (C) que es una solución acuosa diseñada para preservar la viabilidad celular mientras maximiza la solubilidad y eficiencia de la tinción. Excitación máxima 551 nm y emisión máxima 567 nm.

SYBR Gold: Reactivo de tinción para ácidos nucleicos altamente sensible (<1000 veces) para la detección de cadena doble y sencilla de ADN y ARN. La excitación máxima para los complejos colorante-ácido nucleico se obtiene entre 499 y 300 nm y la emisión máxima es de 537nm.

Perlas de conteo: Es una suspensión calibrada de microesferas con una fluorescencia brillante en una amplia gama de longitudes de onda de emisión y excitación. Los gránulos de recuento absoluto CountBright™ se mezclan con la muestra celular y se prueban con citometría de flujo. Mediante la comparación de la relación entre eventos de los gránulos y eventos celulares es posible calcular el recuento absoluto de células.

PMA: Miristato acetato de forbol; es un potente mitógeno para leucocitos de sangre periférica humanos y murinos. Es un activador específico de proteína cinasa C (PKC) y por lo tanto de la ruta de NF- κ B que ha demostrado ser una vía de señalización para inducción de trampas extracelulares en neutrófilos humanos.

2. Preparación de soluciones

Paraformaldehído 8%:

- Paraformaldehído (sólido).....8gr
- Filtrar y Buffer de fosfatos (PBS 1X).....cbp 100ml

Ajustar pH (filtros de 0.8 y 0.2 micras).

Azul tripan 0.4%

- Azul de tripan.....0.4gr
- SSF.....100ml

Medio de Cultivo RPMI al 5% de SFB

- Suero Fetal Bovino.....5ml
- L-Glutamina 100X (200mM).....1ml
- Aminoácidos no esenciales 100X.....1ml
- HEPES.....25mM

Percoll 100%

- Percoll.....18ml
- PBS 10X.....2ml

Tomar el volumen necesario para obtener las concentraciones de 50, 40, 35, 30 y 25% diluidas en solución Hanks 1X.

3. Lista de anticuerpos

Tabla 1. Repertorio de anticuerpos contra proteínas humanas y murinas utilizados en ensayos de detección de proteínas de membrana en leucocitos sanguíneos de tiburón.

Anticuerpo	Especie que reacciona	Casa comercial	No. de catálogo
α -CD5 PE	ratón	BD	553023
α -CD19 APC Cy7	humano	BD	557791
α -CD86 PE Cy5	humano	BioLegend	305407
α -CD18 PE	ratón	BD	553293
α -CD107a PerCP	humano	Biolegend	328615
α -CD206 A647	ratón	Biolegend	141712
α -CD69 tricolor	humano		5708312