



**IDENTIFICACIÓN DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS-
NETS EN PACIENTES CON SÍNDROME POST-COVID**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ 25 DE ABRIL DEL 2025**



***IDENTIFICACIÓN DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS-NETS
EN PACIENTES CON SÍNDROME POST-COVID***

LAURA XIMENA NUMPAQUE MORALES

**ASESORAS EXTERNAS
DIANA MARCELA MONSALVE CARMONA
CAROLINA RAMÍREZ SANTANA**

**ASESORA INTERNA
YURANY DUARTE TORRES**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ 25 DE ABRIL DEL 2025**



***IDENTIFICACIÓN DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS-NETS
EN PACIENTES CON SÍNDROME POST-COVID***

APROBADA _____

JURADOS _____

ASESORES _____

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ 25 DE ABRIL DEL 2025**

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de grado primeramente a Dios, por concederme la oportunidad de alcanzar esta meta. Agradezco profundamente la fortaleza y la constancia que me permitió mantener a lo largo de este proceso.

A mis padres, por su amor incondicional, su constante motivación, por su compañía y todo su apoyo invaluable a lo largo de mi desarrollo académico y personal.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y familia, les agradezco, desde lo más profundo de mi corazón, por ser mi soporte incondicional, por creer en mí incluso cuando yo dudaba, y por cada paso de este camino con amor, paciencia y ánimo. Cada sacrificio, cada palabra de aliento y cada momento compartido han sido las bases de lo que hoy logré.

A los maestros de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca que aportaron en la construcción de mi desarrollo profesional y personal

A mi maestra Yurany Duarte, a quien expreso mi más profundo agradecimiento por su apoyo incondicional, por haber creído en mis capacidades, por sus enseñanzas, consejos, aportes significativos que marcaron cada paso de mi trayectoria universitaria, transformando no solo mi formación académica, sino también mi crecimiento personal.

Expreso mi más profundo agradecimiento a la Doctora Diana Marcela Monsalve por su invaluable apoyo, por brindarme la oportunidad de participar en su proyecto de investigación y por compartir sus conocimientos durante todo ese proceso. Su dedicación, paciencia y persistencia fueron fundamentales para lograr concluir este proceso. Ha sido un honor trabajar bajo su guía.

A la doctora Carolina Ramírez por los conocimientos brindados y su asesoría.

A la universidad del Rosario y a todas las personas que conforman el CREA, por su gran apoyo.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.	10
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	10
1.1 Pregunta Problema.....	11
2. JUSTIFICACIÓN.....	11
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 Objetivo General.	12
3.2 Objetivos Específicos.....	12
4. ANTECEDENTES.....	13
5. MARCO TEÓRICO.	17
5.1 NETs y NETosis.....	17
5.2 SARS-CoV-2.....	20
5.3 COVID-19	23
5.3 Síndrome Post-COVID.....	24
6. METODOLOGÍA.....	26
6.1 Tipo de investigación.....	26
6.2 Enfoque de la investigación.	26
6.3 Población y muestra.	26
6.4 Selección de muestras.....	27
6.5 Muestras biológicas.	28
6.6 Hipótesis.	28
6.7 Variables.....	29
6.8 Análisis estadístico.....	29
7 RESULTADOS.....	30
7.1 Protocolo de estandarización: Purificación de neutrófilos humanos.	30
7.2 Preparación de un control interno para la detección de NETs mediante ELISA (Stock de NETs).....	34
7.3 Cuantificación de complejos MPO-ADN a través de ELISA.....	35
7.4 Inducción de NETosis in vitro e identificación por IFL.	37
7.6 Características clínicas de los pacientes.	39
7.7 Detección y cuantificación de NETs en suero de pacientes COVID-19, SPC y controles sanos pre-pandémicos.	40
9 CONCLUSIÓN.....	46
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	47
11. Anexos	52
11.1 Protocolo de aislamiento de neutrófilos por gradiente- Proyecto NETs CREA.....	52
11.2 Stock de NETs para control de ELISA.....	60
11.3 Protocolo para el montaje de Elisa MPO-ADN/POD.....	64
11.4 Protocolo para Estimulación de trampas extracelulares de neutrófilos – Proyecto NETs CREA.....	75
11.5 Protocolo para Inmunofluorescencia para NETs – Proyecto NETOSIS	80

11.6 Características sociodemográficas y clínicas de los pacientes.	89
11.7 Fotografías de Inmunofluorescencia indirecta.....	93
11.8 Comité de ética en investigación de la universidad del Rosario.	94

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1: Proceso de NETosis lítica o suicida (22).	18
Ilustración 2: Proceso de NETosis no lítica. (22)	19
Ilustración 3: Ingreso del SARS-CoV-2 a la célula del huésped. (26)	21
Ilustración 4: Infección por SARS-CoV-2 y NETosis. (4)	22
Ilustración 5: Plasma rico en leucocitos, Autoría Propia.	31
Ilustración 6: Sobrenadante rico en leucocitos con Ficoll.	31
Ilustración 7: Gradiente de densidad por Ficoll.	32
Ilustración 8: Lisis de eritrocitos con ACK, Autoría Propia.	33
Ilustración 9: Aislamiento celular en 10X, Autoría Propia.	34
Ilustración 10: Aislamiento celular en 40X, Autoría Propia.	34
Ilustración 11: Células estimuladas con PMA, Autoría propia	35
Ilustración 12: Células sin estimular, Autoría Propia.	35
Ilustración 13: Medición de biomarcadores séricos asociados a NETs.	40
Ilustración 14: Análisis de Género asociado a la formación de NETs.	41
Ilustración 15: Inducción de NETosis en neutrófilos sanos por suero de pacientes con COVID-19 agudo, SPC, Pre-pandémicos.	42
Ilustración 16: Inducción de NETosis en neutrófilos sanos por suero de pacientes con COVID-19 agudo, SPC, Pre-pandémicos y controles para IFI indirecta	42
Ilustración 17: Imagen de referencia del procedimiento de centrifugación después del Ficoll, Autoría Laboratorio CREA	57
Ilustración 18: Esquema de referencia para diferenciar las capas después del Ficoll, Autoría Propia	57
Ilustración 19: Imagen de referencia del resultado óptimo después de la centrifugación, Autoría Laboratorio CREA	58
Ilustración 20: IFI, SPC	91
Ilustración 21: IFI: COVID Agudo	91
Ilustración 22: IFI, Control estimulado con PMA	91
Ilustración 23: IFI, Control Sin Estimular.	91



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**IDENTIFICACIÓN DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS-NETS EN
PACIENTES CON SÍNDROME POST-COVID**

RESUMEN.

Los neutrófilos desempeñan un papel crucial en la respuesta inmunitaria innata contra patógenos. Esta célula reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o daño celular (DAMPs). Como mecanismos de defensa emplea la fagocitosis, la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) entre otros mecanismos. La NETosis, es un proceso de muerte celular programada que implica la liberación del ADN celular, histonas y proteínas antimicrobianas como la Mieloperoxidasa (MPO) y la elastasa neutrofílica al espacio extracelular con el fin de contribuir a la defensa del hospedero. Sin embargo, se ha asociado con patologías inflamatorias como el COVID-Agudo y el Síndrome post-COVID (SPC).

Este estudio descriptivo longitudinal comparó tres grupos de pacientes, clasificados como COVID-19 agudo (n=35), SPC (n=35) y controles pre-pandémicos (n=35). Se analizaron específicamente los niveles séricos de complejos MPO-ADN (considerados como un marcador de NETs) mediante ELISA y la capacidad inductora de NETs del suero de cada grupo en neutrófilos sanos *in vitro*. Los resultados mostraron que tanto los pacientes con COVID-19 agudo como aquellos en fase de SPC presentaron niveles significativamente más elevados de complejos MPO-

ADN en comparación con los controles pre-pandémicos ($p < 0,05$), sin diferencias significativas entre las fases aguda y post-COVID de los mismos pacientes. Adicionalmente, el suero de pacientes con SPC demostró una mayor capacidad inductora de NETosis *ex vivo* en comparación con los controles pre-pandémicos, mientras que, en relación con su fase aguda de COVID-19, se observó una tendencia al aumento que no alcanzó significancia estadística.

Palabras clave: NETs, NETosis, COVID-19, Síndrome post-COVID, Neutrófilos.

Introducción.

Los neutrófilos desempeñan un papel esencial en la defensa contra infecciones, empleando mecanismos como la NETosis para contener y eliminar patógenos. Sin embargo, la liberación excesiva de NETs se ha asociado con daño tisular, enfermedades autoinmunes y procesos inflamatorios crónicos. En el contexto de la COVID-19, se ha observado que las NETs promueven fenómenos trombóticos y contribuyen a una inflamación persistente. Por su parte, el SPC, caracterizado por la persistencia de síntomas tras la infección aguda, afecta a una proporción significativa de pacientes, aunque su fisiopatología aún no se comprende completamente.

La ejecución de la presente tesis tuvo como objetivo identificar y evaluar si las NETs persisten en pacientes con SPC, mediante la comparación de marcadores de NETs entre pacientes que cursaron con COVID-19 agudo y posteriormente desarrollaron SPC. Además, se utilizaron muestras de individuos pre-pandémicos como grupo control.

1. Planteamiento del problema.

El SPC se ha consolidado como un desafío emergente de salud pública, afectando a un número considerable de pacientes que, tras superar la fase aguda de la infección por SARS-CoV-2, continúan experimentando síntomas persistentes, que pueden abarcar desde fatiga crónica hasta alteraciones cognitivas. Se estima que hasta un 69% de las personas que han padecido COVID-19 desarrollan SPC, lo que impacta de manera significativa en su calidad de vida. A pesar de los avances en el tratamiento de la infección aguda, los mecanismos fisiopatológicos subyacentes al SPC aún no se comprenden completamente, lo que limita las posibilidades de intervención terapéutica y de manejo clínico efectivo. Entre los posibles mecanismos involucrados, la persistencia de NETs ha surgido como una hipótesis relevante, dado su conocido papel en la promoción de inflamación crónica, daño tisular y disfunción inmunológica en otras enfermedades. En este contexto, comprender el papel de las NETs en el SPC podría aportar información clave para el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento, mejorando así el abordaje clínico de los pacientes afectados.

1.1 Pregunta Problema.

¿Existen trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) en pacientes con síndrome post-COVID?

2. Justificación.

A pesar de los avances en el manejo del COVID-19, un número significativo de pacientes continúa presentando síntomas prolongados o desarrollando nuevas complicaciones tras la recuperación de la fase aguda, este fenómeno clínico es conocido como SPC. Esta condición representa un desafío emergente para la salud pública, debido al impacto que tiene sobre la calidad de vida de los pacientes que lo padecen y la sobrecarga que le produce al sistema de salud.

En este contexto, es fundamental profundizar en los mecanismos fisiopatológicos que podrían estar implicados en la persistencia de síntomas. Las NETs, son estructuras liberadas por los neutrófilos activados como parte de la respuesta inmunitaria innata, también, se ha relacionado con inflamación crónica y el daño tisular en diversas enfermedades. Aunque su participación ha sido documentada en la fase aguda del COVID-19, su posible persistencia y contribución en el SPC no ha sido completamente dilucidada.

Los hallazgos de este estudio podrían tener un impacto significativo en el abordaje clínico del SPC. Al confirmar la persistencia de las NETs en estos pacientes, se podría avanzar hacia la identificación de biomarcadores que permitan reconocer a aquellos individuos con mayor riesgo de desarrollar complicaciones a largo plazo tras la infección por SARS-CoV-2. Esto posibilitaría una intervención más oportuna y personalizada.

Además, comprender el papel patogénico de las NETs en el SPC abriría nuevas oportunidades para el desarrollo de estrategias terapéuticas orientadas a modular su formación o actividad, con el objetivo de mitigar la inflamación persistente y mejorar el pronóstico de los pacientes. En conjunto, esta investigación no solo aportará evidencia sobre los mecanismos inmunopatológicos implicados en el SPC, sino que también ofrecerá herramientas potenciales para reducir la carga de esta condición en la población afectada.

3. Objetivos.

3.1 Objetivo General.

Identificar trampas extracelulares liberadas por neutrófilos en pacientes con Síndrome post-COVID.

3.2 Objetivos Específicos

- Describir las características sociodemográficas y clínicas de los pacientes con COVID-19 agudo y SPC.
- Identificar los complejos asociados a las NETs en pacientes con COVID agudo, síndrome post-COVID y controles sanos pre-pandémicos.
- Evaluar la capacidad del suero de los pacientes con COVID-19 agudo, SPC y controles sanos pre-pandémicos para inducir la formación de NETs *in vitro*.

4. Antecedentes.

En diciembre de 2019, la identificación de un nuevo coronavirus, el SARS-CoV-2 en Wuhan, China, marcó el inicio de una pandemia global sin precedentes: la enfermedad por coronavirus 2019, ampliamente conocida como COVID-19. El agente causal de esta enfermedad pertenece a la familia *Coronaviridae*, del orden *Nidoviridae*, un grupo de virus que desde 2002, han sido responsables de síndromes respiratorios graves. Estos antecedentes posicionaron a los coronavirus como patógenos emergentes de alta propagación y mortalidad, causando una gran preocupación para la salud pública en el siglo XXI. (1)

La presentación clínica de la COVID-19 depende de varios factores, incluyendo características socio-demográficas y la presencia de comorbilidades, las cuales influyen en la evolución de la infección y en la gravedad del cuadro clínico que puede llevar al paciente a una falla multiorgánica, lo que incrementa significativamente el riesgo de muerte.(2) La comprensión de los mecanismos patogénicos subyacentes al COVID-19 ha sido fundamental para controlar la propagación descontrolada de la pandemia y ha permitido el desarrollo de diversas estrategias preventivas, entre ellas la vacunación. (3)

El conocimiento de los mecanismos patológicos implicados en la COVID-19 ha impulsado a numerosos investigadores con la finalidad de comprender la progresión hacia formas graves de la enfermedad y desarrollar terapias que mejoren el pronóstico de los pacientes. Se ha encontrado material genético viral del SARS-CoV-2 en múltiples células inmunitarias como neutrófilos, macrófagos, linfocitos T y B, y células Natural Killer (NK).

Durante la fase aguda de la enfermedad destacan el estudio de la respuesta inflamatoria desregulada, el papel de las citocinas proinflamatorias como la TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, RANTES y factor plaquetario (4) así como la participación de las NETs en la progresión de daño tisular. Profundizar en estos procesos patogénicos podría conducir al desarrollo de tratamientos más efectivos y personalizados capaces de reducir la mortalidad y favorecer la recuperación de los pacientes con COVID-19.

En el año 2004, Brinkmann y colaboradores, describieron la capacidad de los neutrófilos para generar NETs (5). Estas estructuras están compuestas de ADN, histonas y proteínas de los gránulos, como la lactoferrina, catepsina G, elastasa de neutrófilos, MPO, además de proteínas

citoplasmáticas y del citoesqueleto (6,7). Cuando su regulación es deficiente, las NETs pueden desencadenar y exacerbar el proceso inflamatorio y la formación de coágulos sanguíneos lo que indica que su papel patogénico está ampliamente relacionado con estados protrombóticos, sepsis y trombosis,(8) La formación de NETs puede ser desencadenada por una amplia variedad de patógenos, especialmente por virus con potencial pandémico como el virus de la influenza H1N1, el SARS-CoV-2, y el coronavirus del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS) (8).

En un estudio realizado por Barnes y colaboradores, se observó que los pacientes con COVID-19 grave presentaban una leucocitosis anormal, con un aumento predominante de neutrófilos, lo que sugiere que la neutrofilia podría ser un marcador de mal pronóstico. Al examinar muestras pulmonares de autopsias, observaron capilaritis aguda con depósitos de fibrina debido a la infiltración masiva de neutrófilos en los capilares pulmonares. También se evidenció la extravasación de neutrófilos hacia el espacio alveolar y mucositis neutrofílica. Estas observaciones fueron corroboradas en otras autopsias de pacientes fallecidos por COVID-19. El estudio concluye que, aunque la neutrofilia es común en infecciones agudas, en el caso de la COVID-19 podría inducir a una producción excesiva y perjudicial de NETs, lo que contribuiría con la progresión de la enfermedad y al aumento de la mortalidad. (9).

Por otro lado, Yu Zuo y sus colaboradores estudiaron la presencia de NETs en muestras séricas de pacientes con COVID-19, con el objetivo de evaluar su implicación en la fisiopatología del SARS-CoV-2. El estudio se enfocó particularmente en el posible papel de las NETs en la amplificación de la respuesta inflamatoria, así como en su contribución a la llamada “tormenta de citocinas”, un fenómeno característico de los casos graves de la enfermedad. Se identificaron tres marcadores específicos de NETs: DNA libre, complejos MPO-ADN y la Histona H3 citrulinada (Cit-H3). El análisis comparativo reveló una elevación estadísticamente significativa de estos biomarcadores en pacientes hospitalizados con COVID-19 en comparación con controles sanos, lo que sugiere una marcada elevación de NETs y por ende un incremento sustancial del proceso de NETosis en el contexto de la infección por SARS-CoV-2. (10) Estos hallazgos también fueron correlacionados con parámetros clínicos, evidenciando que niveles elevados de los biomarcadores de NETs se asociaban con una mayor gravedad de la enfermedad. En relación con los posibles factores desencadenantes de la NETosis excesiva en COVID-19, se proponen diversos mecanismos

como el daño viral directo a las células epiteliales, la activación plaquetaria, la activación del endotelio vascular y el incremento de citocinas proinflamatorias como la IL-8. (10)

Huckriede y sus colaboradores, estudiaron el valor pronóstico de las NETs en pacientes que cursaban COVID-19 crítico para ello, evaluaron a 100 pacientes con manifestaciones severas de la enfermedad, enfocándose en patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) y en moduladores inhibitorios. Sus hallazgos mostraron un aumento significativo de cfDNA, histona H3 extracelular, elastasa y moduladores en comparación con individuos sanos. Estos biomarcadores mostraron una clara asociación con eventos clínicos adversos. Los marcadores de NETosis (cfDNA, Histona H3 y elastasa) se correlacionaron estrechamente con el daño tisular y elevación en los neutrófilos.

La correlación entre los niveles de cfDNA con los índices de oxigenación determinó que la disminución del cfDNA estaba asociada con la reducción en la duración del soporte ventilatorio, lo que sugiere que la disminución de las NETs podría favorecer la recuperación de la función respiratoria en pacientes que se encuentran en estado crítico. (11)

En el contexto del SPC se observa un estado proinflamatorio sistémico persistente. Se han propuesto varios mecanismos relacionados con el desarrollo de esta condición, entre ellos: inflamación crónica, persistencia de antígenos, disbiosis de la microbiota, autoinmunidad, daño orgánico, alteraciones en la coagulación, disfunción neurológica y, más recientemente, la NETosis. La presencia de NETs podría aportar información valiosa sobre la fisiopatología del SPC o incluso servir como un posible marcador de esta condición persistente. Por tanto, otros estudios se han centrado en determinar si la presencia de NETs en pacientes que desarrollaron SPC se asocia con la gravedad inicial de la enfermedad y la persistencia de los síntomas. Krinsky y sus colaboradores, realizaron un estudio enfocado en este tema en una cohorte de pacientes de Israel, evaluando los niveles séricos de NETs mediante la cuantificación de complejos MPO-DNA y citH3. Este análisis consideró variables demográficas y la presencia de comorbilidades para identificar posibles correlaciones con la persistencia de la sintomatología. (11). El estudio demostró que los niveles de NETs se correlacionaron con la gravedad de la enfermedad en pacientes que habían cursado con COVID-19, por otro lado, la medición del complejo MPO-ADN y la citH3 muestra una diferencia entre pacientes que no padecían COVID-19 y pacientes con COVID-19 y no se encontró una diferencia significativa entre pacientes con COVID-19 leve-moderado y crítico. (12)

En cuanto a los estudios que profundizan en el SPC, se han publicado algunos trabajos, como el de Pisareva y colaboradores, quienes evaluaron el papel de las NETs en la patogénesis del

COVID-19, el SPC y en individuos sanos, en el cual se involucró a 279 individuos, se observaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de elastasa de neutrófilos, MPO y ADN circulante de origen nuclear y mitocondrial entre pacientes con COVID-19 (formas leves y graves), individuos con SPC y controles sanos. Estos marcadores mostraron una alta relevancia diagnóstica, ya que, se evidenció que la persistencia de estos marcadores de NETs en el SPC, pueden indicar un desequilibrio inmunológico prolongado y un alto nivel trombótico. (13)

Se han estudiado ampliamente los aspectos inmunológicos del COVID-19, aun así, no se ha definido con precisión la relación que tiene con el SPC debido a la gran variedad de síntomas de este último, si se logran identificar manifestaciones clínicas específicamente asociadas con su respectivo proceso inmunológico se podría brindar mejores terapias para estos pacientes.

En otro estudio se evaluó por cribado proteómico, se analizaron pacientes que se encontraban en fase de recuperación de COVID-19, lograron identificar 12 marcadores sanguíneos que se correlaciona con una hiperactividad de los neutrófilos, alteraciones en la memoria de células B y el desarrollo de auto-reactividad más de un año después de la infección por SARS-CoV-2. (4) Se observó que una mayor actividad de los neutrófilos se correlacionó con biomarcadores indicativos de desgranulación y formación de NETs. (14)

5. Marco Teórico.

5.1 NETs y NETosis.

Los neutrófilos, son las células más abundantes en sangre periférica y un componente clave de la primera línea de defensa del organismo. Ante la entrada de un patógeno, se activan de forma inmediata activando la respuesta inmunitaria innata, cuyo objetivo principal es eliminar al microorganismo invasor y prevenir el desarrollo de la enfermedad. Esta respuesta no genera memoria inmunológica y se desencadena mediante el reconocimiento de PAMPs o por los DAMPs. Los neutrófilos usan distintos mecanismos bactericidas como la fagocitosis, desgranulación, la producción de ROS, la formación de NETs, así como la secreción de citocinas y quimiocinas que regulan la respuesta inflamatoria. (15) Se han desarrollado diversas investigaciones que permitan conocer mejor el papel de las NETs y su asociación con diversas patologías, estas son estructuras altamente especializadas que juegan un papel fundamental a la hora de contener y eliminar microorganismos patógenos (16). La formación de NETs, se hace a través de un proceso conocido como "NETosis", una forma especializada de muerte celular programada en la que los neutrófilos, tras activarse en respuesta a infecciones o señales inflamatorias, liberan sus componentes nucleares (ADN, histonas y diversas proteínas antimicrobianas, como elastasa y MPO) al espacio extracelular. (17)

La liberación de este material forma una red tridimensional que atrapa bacterias, virus y otros patógenos, con el objetivo de reducir la carga microbiana y facilitar su eliminación por parte del sistema inmunitario (17) Si bien la NETosis es una herramienta efectiva en la defensa contra infecciones, su activación desregulada o sostenida puede tener consecuencias patológicas. La liberación excesiva de NETs ha sido vinculada a procesos de inflamación crónica, daño tisular, desregulación inmunitaria y alteraciones vasculares. Este fenómeno se ha asociado con enfermedades autoinmunes, trombosis, vasculitis, trastornos metabólicos e incluso procesos oncológicos. (18)

Actualmente, la NETosis se divide en dos modelos; El primer modelo, conocido como "NETosis clásica o suicida", ocurre típicamente entre 2 y 4 horas tras la activación del neutrófilo. (19) Este proceso da inicio cuando los neutrófilos se activan al reconocer patógenos, anticuerpos, complejos inmunitarios, citocinas, plaquetas activadas, proteínas del complemento, microcristales

y estímulos fisiológicos, estos son captados por receptores como TLR4 (receptor tipo Toll 4), TLR8 (receptor tipo Toll 8), CLRs (receptores de lectina tipo C), CR3 (integrina $\beta 2$), TNF alfa (factor de necrosis tumoral alfa), entre otros. Lo que lleva a un aumento del calcio intracelular del retículo endoplásmico, lo cual induce la activación de la vía de señalización de la proteína quinasa C (PKC), Raf-MEK y ERK activando al complejo Nicotilamida-Adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH) y generando ROS. (20)

Los iones de calcio (Ca^{+2}) cumplen funciones de cofactores que son esenciales para la actividad de la enzima peptidil arginina deiminasa 4 (PAD4), esta se encuentra en el citoplasma de la célula, cuya acción depende del ROS. Esta enzima lleva a la desaminación de las histonas, lo que implica una modificación de los aminoácidos. Como resultado, se pierden las cargas positivas que tienen las histonas, lo que reduce la afinidad que tiene con el ADN y permite que finalmente la cromatina se descóndense. Este proceso también depende de las ROS que a su vez contribuyen a la ruptura progresiva y finalmente a la desaparición de la membrana nuclear, cuando esto ocurre, la cromatina se libera en el citoplasma, donde se mezcla con las proteínas y toxinas que derivan de la desgranulación del neutrófilo. (19, 21) Entre las que se encuentran la elastasa y la MPO que juegan un papel crucial, degradando la envoltura nuclear, fragmentando proteínas citosólicas y provocando la descondensación de la cromatina. (22)

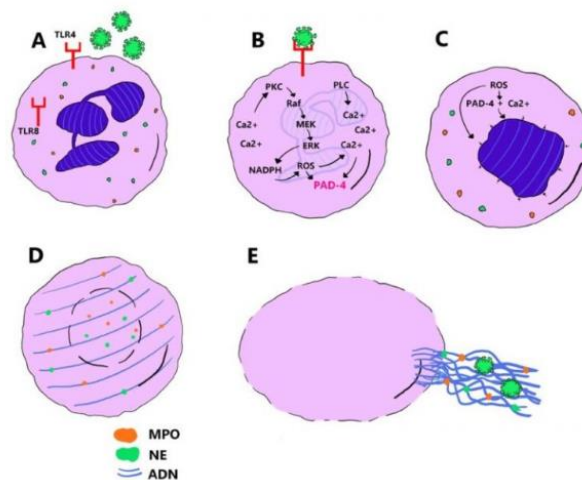


Ilustración 1: Proceso de NETosis lítica o suicida, tomado de: [https://www.rbac.org.br/artigos/el-rol-de-las-trampas-extracelulares-de-neutrofilos-en-pacientes-con-covid-19/\(22\)](https://www.rbac.org.br/artigos/el-rol-de-las-trampas-extracelulares-de-neutrofilos-en-pacientes-con-covid-19/(22)).

Ilustración1: A: Se lleva a cabo el reconocimiento del estímulo (en este ejemplo viral) por medio del receptor de membrana TLR4 y TLR8, B: Hay un aumento de Ca^{2+} intracelular que induce la activación de la vía de señalización PCK, Raf-MEK y ERK, que da como resultado la estimulación de NADPH y generación de ROS. El Ca^{2+} también actúa como un cofactor de la enzima PAD4, la cual requiere de ROS (anteriormente generado). C: De esta manera se promueve la desaminación de histonas y se descondensa la cromatina. D: ocurre la separación gradual y la pérdida de la membrana nuclear producida por ROS. La cromatina se dispersa en el citoplasma y se mezcla con proteínas y toxinas, como la MPO y la elastasa de neutrófilos producto de la desgranulación de los neutrófilos. E: La MPO y la elastasa escinden las histonas facilitando así la descondensación de la cromatina. Que se dispone en forma de red tridimensional y se libera de la célula como un mecanismo de protección contra patógenos, al liberarse, simultáneamente ocurre la lisis celular. (22). En contraste, el segundo modelo, denominado "NETosis vital", permite la liberación de NET sin provocar la muerte celular, es decir, evita la destrucción de la membrana nuclear y plasmática de la célula.

Este modelo tiene una duración más breve, entre 5 y 60 minutos, y permite que los neutrófilos conserven sus capacidades fagocíticas. A diferencia de la NETosis clásica, este proceso es independiente de oxidantes (como las ROS). En este modelo, el ADN nuclear se libera como resultado de una serie de cambios morfológicos en donde primero se expande la envoltura nuclear y se forman vesículas que pueden atravesarla, posteriormente se produce la descondensación del contenido nuclear para que finalmente la envoltura nuclear se rompa. Esta forma de NETosis se activa cuando los neutrófilos detectan ciertos estímulos a través de receptores tipo TLR 2 y 4 o receptores del complemento, todo esto ocurre sin requerir la activación de la enzima NADPH oxidasa. A este punto los neutrófilos han perdido su ADN durante la liberación de NETs, pese a esto, permanecen vivos como citoplastos (células sin núcleo) y conservan su capacidad para moverse y fagocitar patógenos. (21)

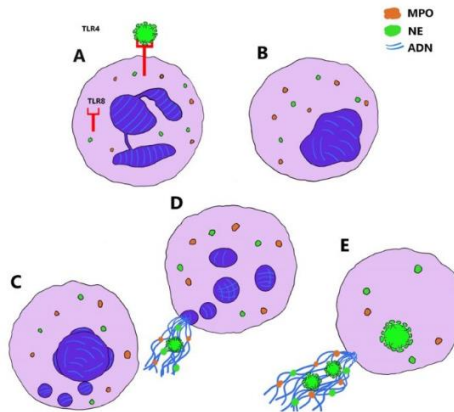


Ilustración 2: Proceso de NETosis no lítica, tomado de <https://www.rbac.org.br/artigos/el-rol-de-las-trampas-extracelulares-de-neutrofilos-en-pacientes-con-covid-19/>

Ilustración 2: A: Se lleva a cabo el reconocimiento del estímulo (en este ejemplo viral) por medio del receptor de membrana TLR4 y TLR8, B: Se producen cambios morfológicos en la célula y la envoltura nuclear. C: Se liberan las vesículas con ADN. D: inicia la descondensación de núcleo y la ruptura de la envoltura nuclear, La MPO y la elastasa escinden las histonas facilitando así la descondensación de la cromatina. Que se dispone en forma de red tridimensional y se libera de la célula como un mecanismo de protección contra patógenos. E: al liberarse no se produce lisis celular, así que el neutrófilo, mantiene la forma del citoplasto, conservando sus funciones vitales básicas como la movilidad y su capacidad fagocítica. (22)

5.2 SARS-CoV-2.

En diciembre de 2019, en la ciudad de Wuhan (China), se identificó el SARS-CoV-2, un nuevo coronavirus que rápidamente se expandió a nivel global, dando origen a una de las pandemias más significativas del siglo XXI: la enfermedad por coronavirus 2019, conocida como COVID-19 (7).

Este patógeno pertenece a la familia *Coronaviridae*, un grupo de virus de ARN monocatenario con envoltura lipídica. Mediante microscopía electrónica, puede observarse su estructura esférica, caracterizada por la presencia de espículas en su superficie, las cuales forman una figura semejante a una corona solar, donde se origina su nombre "Coronavirus".

Este virus tiene cuatro proteínas estructurales que forman la partícula viral: la proteína S (Spike) es la más inmunogénica y externa, además es la responsable de reconocer la proteína celular Enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) como receptor para fijarse a la célula hospedadora,

la proteína de envoltura (E) funciona como un canal iónico con que cumple funciones durante el ensamblaje y salida del virión de la célula hospedadora, la proteína de membrana (M), proporciona estructura y estabilidad al virión y la nucleoproteína (N) que interviene en la síntesis de ARN viral. Por otro lado, cuenta con aproximadamente 16 proteínas no estructurales que se conocen como nsp1 a nsp 16 que cumplen diversas funciones que finalmente llevan a que el virus logre replicarse e infectar al hospedador. (4)

El SARS-CoV-2 se caracteriza por su capacidad de infectar tanto a humanos como a diversas especies animales. A diferencia de otros coronavirus previamente identificados, como el SARS-CoV y el MERS-CoV, este virus destaca por su alta transmisibilidad, su notable variabilidad genética y la amplia gama de manifestaciones clínicas que puede inducir, las cuales van desde cuadros asintomáticos hasta formas graves de enfermedad con desenlaces fatales. (23)

Se ha demostrado que el SARS-CoV-2 puede desencadenar la liberación de NETs mediante diversos mecanismos, destacándose especialmente la inflamación mediada por citocinas. Durante la infección, los neutrófilos se activan no solo por la presencia directa del patógeno, sino también por los productos de la respuesta inflamatoria del huésped, como las citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IL-6 y TNF- α) y las quimioquinas (24) Estos mediadores inflamatorios no sólo amplifican la actividad neutrofílica, sino que también promueven la formación de NETs, exacerbando la respuesta inmunitaria instaurando un ciclo inflamatorio que puede tornarse descontrolado. De esta forma, la interacción entre el virus y el sistema inmunitario puede tener implicaciones clínicas importantes, especialmente en la progresión hacia formas graves de la COVID-19, donde la activación excesiva de neutrófilos y la producción desregulada de NETs contribuyen al daño tisular ya la disfunción multiorgánica. (25)

Respecto a los mecanismos de entrada del virus, se ha determinado que el SARS-CoV-2 invade selectivamente ciertas células del organismo, tales como, células epiteliales de la mucosa nasal y bronquial, incluidos los neumocitos tipo II. Este proceso ocurre a través de la unión de las subunidades S1 y S2 de la proteína Spike del virus con el receptor de la enzima ACE2, presente en la superficie de las células epiteliales respiratorias (2).

Una vez que el virus se une al receptor ACE2, la serina proteasa transmembrana (TMPRSS2) escinde la subunidad S2, permitiendo así la exposición del péptido de fusión (FP). Esta escisión desencadena transformaciones estructurales que facilitan la inserción del FP en la membrana de la célula huésped, dando inicio al proceso de fusión mediante la formación de un

poro que facilita la introducción del material genético (ARN) del virus en el citoplasma de la célula, donde posteriormente será detectado y replicado. (2)

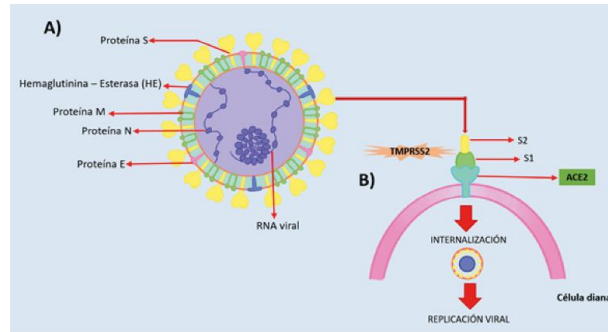


Ilustración 3: Ingreso del SARS-CoV-2 a la célula del huésped, extraído de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662020000200009

Ilustración 3: Se observa la estructura del SARS-Co-V-2 (Causante de COVID-19) con sus respectivas proteínas estructurales. B: Se observa el mecanismo de unión de la proteína S al receptor de la ACE2, se aprecia como la proteína S del virus es escindida por la serina proteasa de TMPRRS2, en la subunidad S1 (N-terminal) y S2 (C-terminal) mediando la unión del virus a la célula diana facilitando el ingreso del mismo. (26)

Estudios han mostrado la presencia del ARN de SARS-CoV-2 no solo en células epiteliales, sino también en diversas células del sistema inmunitario, incluyendo neutrófilos, macrófagos, linfocitos T y B y células NK, lo que sugiere una diseminación sistémica del virus y una participación directa del sistema inmunitario en su patogénesis. (4, 16) Durante la fase aguda de la infección, se desencadenan cascadas inflamatorias junto con alteraciones en los mecanismos de coagulación. Estas respuestas provocan un incremento significativo de marcadores proinflamatorios circulantes, como el TNF, IL-1, IL-6, IL8 y factores plaquetarios, todos los cuales contribuyen al estado de hipercoagulabilidad e inflamación sistémica observado en los pacientes con COVID-19 grave (4, 16)

Tras la unión de la proteína S del SARS-CoV-2 al receptor ACE2 esta sufre un corte proteolítico que facilita la entrada del virus en la célula huésped. Una vez infectada, la célula reconoce elementos vitales que activan su respuesta inmunitaria mediante la detección de PAMP y DAMP por los PRR, la presentación de antígenos a través del complejo mayor de

histocompatibilidad, la liberación de citocinas y quimiocinas inflamatorias, y la movilización de células inmunitarias como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y linfocitos T y B. Estas células ejecutan funciones muy específicas para neutralizar el virus. (4)

5.3 COVID-19

Para determinar el tiempo de aislamiento de los pacientes infectados por SARS-CoV-2 se desarrollaron diversos estudios en los cuales se determinó que, en la mayoría de los casos, los síntomas aparecieron antes de los 13 días, especialmente en personas mayores de 60 años, por otro lado, observaron que este periodo puede variar aproximadamente un día por cada 10 años adicionales de edad. (27)

La presentación clínica de la COVID-19 es altamente variable y depende de múltiples factores, incluyendo características sociodemográficas, la presencia de comorbilidades, factores genéticos e inmunológicos del paciente. Estos factores influyen tanto en la evolución de la infección como en la gravedad del cuadro clínico. En los casos leves, los síntomas más comunes incluyen fiebre, fatiga, tos seca y neumonía, así como alteraciones sensoriales como anosmia (pérdida del olfato) y ageusia (pérdida del gusto). En cambio, los casos graves o críticos de COVID-19 pueden progresar hacia complicaciones respiratorias severas, como el SDRA (Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda), además de presentar trastornos de la coagulación, trombosis venosa y en algunos casos, embolismo pulmonar. Estas complicaciones pueden requerir hospitalización convirtiéndose en un factor de mal pronóstico para los pacientes. (1,2,3,4) En su forma más grave, la enfermedad puede evolucionar hacia una falla multiorgánica, lo que incrementa significativamente el riesgo de muerte. (19)

Las características inmunopatógenas más relevantes en los casos graves de COVID-19, lo correlacionan con el desarrollo de enfermedades no infecciosas como trastornos de origen autoinmunitario como la Artritis Reumatoide, Lupus Eritematoso Sistémico, Síndrome Antifosfolípido, Esclerosis Sistémica, Vasculitis asociada a ANCAS, etc. Y otras enfermedades como la diabetes mellitus. (28). Dentro de estas posibles causas de gravedad se ha estudiado la formación excesiva de NETs. En estos cuadros graves, se ha observado que la NETosis contribuye de manera activa a procesos como la disfunción del endotelio vascular, la pérdida de la integridad de la barrera alveolo-capilar, el aumento de la permeabilidad pulmonar y la liberación masiva de citocinas proinflamatorias. Además, se ha establecido una relación entre la formación de NETs y

la activación desregulada de la coagulación, lo que favorece la aparición de microtrombos y fenómenos tromboembólicos sistémicos. (29,30)

5.3 Síndrome Post-COVID.

El SPC, también conocido como COVID prolongado, se caracteriza por la persistencia o aparición de síntomas nuevos que se presentan al menos 3 meses después de la infección inicial por el SARS-CoV-2 y que persisten durante un mínimo de 2 meses sin una causa alternativa evidente, según la definición establecida por la OMS (Organización Mundial de la Salud). (31)

La progresión y severidad del SPC están influenciadas por múltiples factores, entre ellos las características demográficas (como el sexo y la edad avanzada), condiciones clínicas preexistentes (como la obesidad, el tabaquismo y enfermedades crónicas), y aspectos biológicos e inmunológicos que aún están en proceso de investigación (2).

Según estudios, se estima que aproximadamente del 31% al 69% de los pacientes que cursaron una infección aguda por COVID-19 pueden desarrollar este síndrome, incluso tras haber superado la fase inicial de forma leve o moderada. (32)

Normalmente, los primeros síntomas del SPC comprenden fatiga (29%), dolor muscular, palpitaciones, problemas cognitivos (28%), dificultad para respirar (21%), ansiedad (27%), dolor torácico y artralgia (18%).

Aunque los mecanismos fisiopatológicos exactos del SPC aún no se comprenden completamente, se han propuesto diversas hipótesis, entre las cuales resaltan la presencia de una respuesta crónica inflamatoria, la reactivación de otros virus como el virus de Epstein-Barr o herpes virus humano, disbiosis intestinal, trastornos autoinmunes, recuperación incompleta de los pulmones, corazón, riñones o cerebro tras lesiones agudas o crónicas, formación de coágulos en las microvasculaturas con difusión de las células endoteliales, alteraciones en la señalización del tronco encefálico y/o el nervio vago, y más recientemente, el papel de la NETosis como un posible mecanismo subyacente. (26, 33, 34, 35)

Estudios recientes han comenzado a explorar el papel de las NETs en el desarrollo del SPC. Se ha sugerido que la persistencia de la inflamación inducida por las NETs podría contribuir significativamente a algunos de los síntomas a largo plazo asociados con el SPC, manteniendo un estado inflamatorio crónico que afecta a múltiples sistemas del organismo (36). En particular, se

ha asociado la liberación prolongada de NETs con síntomas como fatiga persistente, alteraciones cognitivas y problemas musculoesqueléticos, todos ellos característicos del SPC.

Además, se ha planteado que la presencia prolongada de NETs podría contribuir al daño endotelial y a la disfunción vascular, elevando el riesgo de complicaciones tromboembólicas y cardiovasculares en pacientes con SPC. Estos hallazgos han llevado a que algunas investigaciones consideran a las NETs como posibles biomarcadores de severidad en el COVID prolongado, así como blancos terapéuticos potenciales. En esta línea, diversos estudios están evaluando tratamientos enfocados en inhibir la formación o actividad de las NETs, con la esperanza de reducir la inflamación crónica y mejorar los síntomas persistentes en los pacientes afectados. (37)

6. Metodología.

6.1 Tipo de investigación.

El diseño metodológico de esta investigación corresponde a un estudio longitudinal de tipo descriptivo. Se realizó el seguimiento de tres grupos poblacionales: pacientes con COVID-19 agudo que posteriormente desarrollaron SPC e individuos sanos pre-pandémicos. Se analizaron variables cualitativas y cuantitativas con el objetivo de describir las diferencias entre los grupos y establecer correlaciones entre los hallazgos obtenidos.

6.2 Enfoque de la investigación.

El proyecto adopta un enfoque cuantitativo. Se obtuvieron datos medibles a partir de los ensayos de laboratorio, los cuales fueron sometidos a análisis estadísticos para comparar entre los grupos de estudio.

6.3 Población y muestra.

Se incluyeron tres grupos poblacionales: pacientes con COVID-19 agudo (n=35), pacientes con síndrome post-COVID (SPC) (n=35) y un grupo de individuos sanos pre-pandémicos (n=35). Todos los participantes formaron parte de estudios previos realizados por el Centro de Estudio de Enfermedades Autoinmunes (CREA). Los pacientes con COVID-19 agudo fueron reclutados entre julio y agosto de 2020, y posteriormente se les realizó seguimiento durante la fase post-COVID entre marzo y mayo de 2021, en la Clínica del Occidente, en Bogotá, Colombia. Los datos clínicos y las muestras serológicas de los individuos sanos pre-pandémicos fueron recolectados entre 2017 y 2019. Adicionalmente, para los ensayos funcionales con neutrófilos se incluyeron cinco voluntarios sanos post-pandémicos. Se recopiló información sociodemográfica, así como datos clínicos relacionados con signos, síntomas y antecedentes médicos. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado y fueron notificados sobre la Ley de Protección de Datos Personales en Colombia (Ley 1581 de 2012). Esta tesis se desarrolló en el marco del proyecto “NETosis en síndrome post-COVID”, aprobado por el Comité de Ética de la Universidad del Rosario. **Anexos 11.8 Aprobación del comité de ética.**

6.4 Selección de muestras.

Criterios de inclusión:

Controles pre-pandémicos: Pacientes de ambos sexos, mayores de 18 años, sin diagnóstico clínico de autoinmunidad, sin antecedente de autoinmunidad familiar, y con muestras recolectadas antes del primer caso en Colombia de COVID-19.

Pacientes con COVID-19 agudo: Pacientes de ambos sexos, mayores de 18 años, hospitalizados con diagnóstico positivo para COVID-19 por RT-PCR, casos severos de acuerdo con la guía oficial "Pneumonia Diagnosis and Treatment Scheme for Novel Coronavirus Infection (Trial Version7)" (Cualquiera de los siguientes): **Saturación de oxígeno $\leq 90\%$ en reposo, o frecuencia respiratoria ≥ 30 respiraciones/min, o Presión arterial parcial de oxígeno (PaO₂) / fracción de oxígeno inspirado (FiO₂) ≤ 300 mmHg (1 mmHg = 0.133kPa) (ciudades ubicadas a más de 1000 mts sobre el nivel mar utilizar la fórmula PaO₂/ FiO₂ [presión atmosférica (mmHg)/760]), o más del 50% en la progresión de compromiso pulmonar por imágenes dentro de 24-48 horas, Sequential Organ Failure Assessment score (SOFA) < 6 .**

Pacientes con SPC: Pacientes de ambos sexos, mayores de 18 años con previo diagnóstico positivo para COVID-19 por RT-PCR, casos severos de acuerdo con la guía oficial "Pneumonia Diagnosis and Treatment Scheme for Novel Coronavirus Infection (Trial Version7)", y con persistencia de síntomas por más de 4 semanas después del egreso hospitalario.

Criterios de exclusión:

Mujeres embarazadas o que se encuentren en etapa de lactancia, ingreso a Unidad de Cuidados Intensivos, pacientes con neumonía severa con requerimiento de soporte ventilatorio, con riesgo o antecedentes de riesgo por la administración del medicamento, pacientes con procedimientos quirúrgicos realizados en los últimos 30 días contados a partir del momento de reclutamiento, pacientes con tratamiento activo para cualquier tipo de cáncer (quimioterapia y radioterapia), pacientes diagnosticados con VIH con falla viral (carga viral detectable >1000 copias/mL persistente, dos mediciones de carga viral consecutivas dentro de un intervalo de 3

meses, con adherencia al medicamento entre mediciones) después de al menos 6 meses de comenzar un nuevo régimen de antirretrovirales), coinfección demostrada que explique los síntomas del paciente, con enfermedad renal crónica terminal (Tasa de Filtración Glomerular <15 mL/min/1.73 m²), cirrosis hepática estadio Child Pugh C, que tengan enfermedades de alto gasto cardíaco, enfermedades autoinmunes o nefropatía por IgA, pacientes con antecedente de reacción adversa a transfusiones previas, pacientes con puntaje SOFA ≥6, y personas incapaces de suministrar el consentimiento informado.

6.5 Muestras biológicas.

Las muestras biológicas de los individuos participantes fueron obtenidas mediante venopunción, conforme al protocolo establecido por el CREA. Este procedimiento se llevó a cabo una vez obtenida la aceptación voluntaria de cada participante y la firma del consentimiento informado, de acuerdo con las disposiciones éticas de los estudios en los que originalmente fueron incluidos. La sangre recolectada en el tubo seco fue centrifugada a 3500 r.p.m durante 10 minutos para lograr la separación del suero. Posteriormente, el suero fue alicuotado bajo condiciones de esterilidad y almacenado a -80 °C para su análisis posterior. Las muestras fueron procesadas y conservadas bajo condiciones controladas en el laboratorio, lo que garantiza su integridad y trazabilidad. Para el desarrollo de esta tesis, se utilizaron exclusivamente muestras que ya habían sido recolectadas, procesadas y almacenadas en el marco de estudios aprobados y registrados por el CREA, lo cual permitió aprovechar los recursos existentes sin necesidad de nuevas intervenciones en los participantes.

6.6 Hipótesis.

- **Hipótesis Nula:** Los pacientes con SPC no presentan diferencias significativas en los niveles de NETs en comparación con los controles pre-pandémicos ni con los pacientes con COVID-19 agudo.
- **Hipótesis Alterna:** Los pacientes con SPC presentan niveles de NETs significativamente mayores que los controles pre-pandémicos, y comparables o superiores a los observados en pacientes con COVID-19 agudo.

6.7 Variables.

Variables Independientes: Grupo de estudio (COVID-19 agudo, SPC, control sano pre-pandémico), sexo edad, inicio de la enfermedad COVID y del SPC.

Variables Dependientes:

- **Presencia y cantidad de NETs:** los niveles de NETs se evaluaron a través de una ELISA y por medio de IFI.
- **Inducción de NETs:** se evaluó la capacidad de inducción de NETs *in vitro* usando neutrófilos de pacientes sanos más el suero de los pacientes pertenecientes a cada grupo de estudio. (COVID-Agudo, SPC y controles sanos pre-pandémicos).
- **Porcentaje de neutrófilos que liberan NETs:** Se estima la proporción de neutrófilos productores de NETs frente al total de neutrófilos presentes en las muestras. Esto se determinó dividiendo el número de eventos NETs observados en los canales de fluorescencia MPO-ADN/H1 por el número total de eventos en el canal Hoechst multiplicado por 100.

6.8 Análisis estadístico.

En el análisis univariado, las variables categóricas se analizaron mediante frecuencias, mientras que las variables cuantitativas continuas se expresaron como media y desviación estándar (DE) o como mediana y rango intercuartílico (RIC), según correspondiera. Ninguno de los parámetros incluidos fue sometido a transformación o normalización estadística.

Dado el diseño longitudinal del estudio, se utilizó la prueba t pareada para comparar las mediciones entre la fase aguda y la fase SPC. Además, para evaluar las diferencias entre estos grupos y los controles pre-pandémicos (PPC), se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con ajuste de los valores de p para comparaciones múltiples mediante la prueba de Dunnett. Esta misma prueba fue empleada para los análisis por subgrupos según el sexo. Se estableció como significativo un valor de $P < 0.05$. Los análisis se realizaron utilizando R versión 4.2.1 y GraphPad versión 10.0.2.

7 Resultados.

Como paso inicial para el desarrollo experimental de la tesis, se llevó a cabo la estandarización del protocolo de aislamiento de neutrófilos humanos a partir de sangre periférica. Esta optimización fue fundamental, ya que los neutrófilos purificados serían utilizados posteriormente tanto en la generación de controles internos para la técnica ELISA (condiciones basal y estimulada con PMA (Forbol-12-miristato-13-acetato)) como en los ensayos de IFI (Inmunofluorescencia Indirecta). Durante esta etapa, se evaluaron diferentes métodos de purificación celular, y se ajustaron parámetros clave como la proporción de reactivos, los tiempos de incubación y las condiciones de centrifugación, con el objetivo de obtener poblaciones celulares viables, de alta pureza y adecuadas para los ensayos posteriores.

7.1 Protocolo de estandarización: Purificación de neutrófilos humanos.

La extracción de neutrófilos se realizó a partir de sangre venosa recién recolectada de un voluntario sano, utilizando un sistema BD Vacutainer 21G x 1.5 (Ref: 360213) y tubos de recolección de 4 mL con EDTA como anticoagulante (se recolectaron dos tubos). La sangre obtenida fue transferida a un tubo Falcon estéril de 15 mL. Se procuró obtener un volumen mínimo de 5.5 mL para asegurar un rendimiento adecuado en las etapas posteriores.

A continuación, se añadió un volumen igual de dextrán al 6% (Ref: 02101514-CF, MP Biomedicals), manteniendo una proporción 1:1 (sangre: dextrán). La mezcla fue homogeneizada mediante agitación por inversión (10 veces con movimiento moderado), y posteriormente se dejó reposar en posición vertical, en oscuridad, durante 40 minutos a temperatura ambiente.

Finalizada la incubación, se observaron dos fases: una capa superior, rica en leucocitos y pobre en eritrocitos, y una capa inferior correspondiente al paquete eritrocitario sedimentado (Ilustración 1). Con una pipeta Pasteur estéril de 3 mL, se aspiró cuidadosamente la fase superior y se transfirió a un nuevo tubo Falcon estéril de 15 mL. Se procuró obtener un volumen mínimo de 6 mL de plasma rico en leucocitos.



Ilustración 5: Plasma rico en leucocitos, Autoría Propia, 2024.

Posteriormente, se realizó la separación de los neutrófilos mediante un gradiente de densidad. En un tubo Falcon estéril de 15 mL, se añadió Ficoll-Hypaque con una densidad de 1.077 g/mL (Ref: 10771, Sigma-Aldrich). A continuación, se incorporó cuidadosamente el sobrenadante rico en leucocitos, manteniendo una proporción 1:2 (una parte de Ficoll por dos partes de sobrenadante), como se muestra en la ilustración 6

Para preservar la integridad celular, el sobrenadante fue añadido lentamente por las paredes del tubo, evitando su mezcla directa con el Ficoll. Este procedimiento se realizó utilizando una pipeta Pasteur estéril de 3 mL, sin generar turbidez en la interfase.

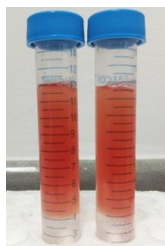


Ilustración 6: Sobrenadante rico en leucocitos con Ficoll, Autoría Propia, 2024.

Una vez obtenidas las dos fases descritas previamente, la muestra fue sometida a centrifugación a $600 \times g$ durante 20 minutos a 20°C , con una aceleración de cuatro y sin desaceleración (frecuencia de frenado = 0). Tras la centrifugación, se observaron cinco bandas bien definidas en el interior del tubo Falcon.

La capa superior, de color amarillo, correspondió al plasma; inmediatamente debajo, se evidenció una capa de aspecto turbio compuesta por células mononucleares. Esta fue seguida por la fase de Ficoll, y luego por una banda delgada, clara y densa, correspondiente a las células

polimorfonucleares (PMN). Finalmente, en el fondo del tubo, se identificó una capa roja compuesta principalmente por eritrocitos sedimentados (Ilustración 7).

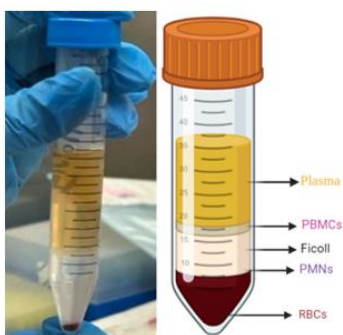


Ilustración 7: Gradiente de densidad por Ficoll, Autoría Propia, 2024.

Después de diferenciar las capas obtenidas tras la centrifugación, se procedió a retirar cuidadosamente las fases superiores. Con una pipeta Pasteur estéril de 3 mL, se aspiraron y descartaron las capas correspondientes al plasma, las células mononucleares y el Ficoll, procurando no perturbar ni contaminar la capa inferior que contenía los PMNs. A continuación, con una nueva pipeta Pasteur estéril, se aspiró cuidadosamente la fracción rica en PMNs, minimizando la captación de eritrocitos. Esta fracción fue transferida a un tubo Falcon estéril de 15 mL.

Posteriormente, se realizó un tratamiento de lisis eritrocitaria. Para ello, el sedimento celular rico en PMNs fue resuspendido en 6 mL de solución ACK (ammonium-chloride-potassium) y mezclado por pipeteo (10 veces). La suspensión fue incubada durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 4 °C, con aceleración y desaceleración programadas en nivel 9.

El sobrenadante fue descartado y se conservó el botón celular, al cual se le añadieron 5 mL adicionales de solución ACK. La muestra fue nuevamente incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y luego centrifugada bajo las mismas condiciones anteriores (1500 rpm, 5 minutos, 4 °C, aceleración y desaceleración en 9). (Ilustración 8)



Ilustración 8: Lisis de eritrocitos con ACK, Autoría Propia, 2024.

Finalizado el segundo paso de lisis eritrocitaria, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular rico en PMNs en 3 mL de medio RPMI 1640 sin Ca ni Mg (Ref: 11875093, Thermo Fisher Scientific). La resuspensión se realizó mediante pipeteo suave, procurando no generar burbujas, hasta lograr una disgregación completa del botón celular.

Una vez aisladas las células, se procedió a evaluar la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión con azul de tripano al 0.4%. Para ello, se mezclaron 20 μ L del aislado celular con 80 μ L de azul de tripano, manteniendo una proporción 1:5 (una parte de células por cinco partes de colorante). La mezcla fue homogeneizada por inversión suave (tres veces) y posteriormente se realizó el montaje en una cámara de Neubauer. Se esperaba obtener una concentración celular entre 5×10^6 y 8×10^6 neutrófilos viables por muestra de 7 a 8 mL de sangre, rango considerado como indicativo de un aislamiento exitoso. Adicionalmente, para evaluar la pureza y morfología del aislamiento, se realizó una tinción con azul de metileno al 0.1%. Se realiza una dilución 1:2 entre el aislamiento celular y el colorante, se mezcla suavemente por inmersión (tres veces) y se colocó una gota de la preparación sobre una lámina portaobjetos, la cual fue cubierta con un cubreobjetos. La muestra fue incubada durante 15 minutos a temperatura ambiente y observada posteriormente al microscopio. Se obtuvo una pureza en los ensayos de alrededor del 90%.

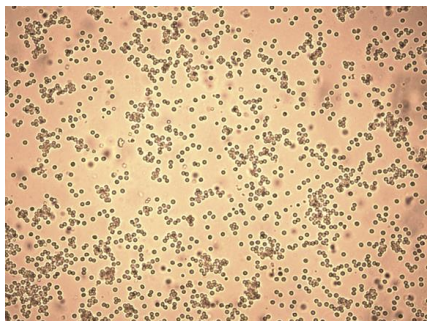


Ilustración 9: Aislamiento celular en 10X, Autoría Propia, 2024.

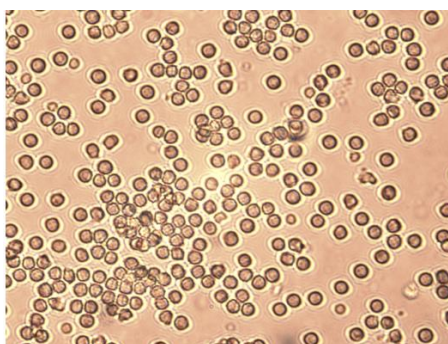


Ilustración 10: Aislamiento celular en 40X, Autoría Propia, 2024.

7.2 Preparación de un control interno para la detección de NETs mediante ELISA (Stock de NETs).

Con el objetivo de minimizar la variabilidad entre ensayos y ante la ausencia de un estándar internacional para la medición de complejos de NETs, se preparó una solución stock de NETs, definida como el 100% de contenido de NETs. Esta preparación permitió la generación de una curva estándar para la cuantificación relativa de NETs en las muestras analizadas. Para su obtención, tras la optimización del protocolo de aislamiento de neutrófilos, se recolectaron muestras de sangre venosa de cuatro individuos sanos (tres mujeres y un hombre) utilizando tubos con EDTA. El aislamiento celular se llevó a cabo siguiendo el protocolo previamente estandarizado, que incluyó la sedimentación con dextrán, la separación por gradiente de densidad, la lisis eritrocitaria con solución ACK y la resuspensión final de los neutrófilos en medio RPMI 1640 sin calcio ni magnesio.

Los neutrófilos purificados fueron sembrados a una densidad de 2.5×10^5 células por pozo en una placa de cultivo de 24 pozos (92024, TPP). Posteriormente, las células fueron estimuladas

con PMA a una concentración de 100 nM (P8139, Sigma-Aldrich) como control positivo, o bien, se dejaron sin estimular como control negativo, durante 4 horas en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire. Tras la incubación, los sobrenadantes fueron recolectados cuidadosamente de los pozos y transferidos a tubos estériles. Las células restantes fueron tratadas con DNasa (10 U/mL; 79254, Qiagen), diluida en RPMI-1640, con el objetivo de disolver las NETs. Posteriormente, se incubaron durante 30 minutos a 37 °C, y luego se centrifugaron las placas a 1500 rpm durante 5 minutos para recolectar los sobrenadantes. Finalmente, los sobrenadantes provenientes de células estimuladas y no estimuladas, obtenidos de los cinco donantes independientes, fueron agrupados para su análisis posterior mediante ELISA.

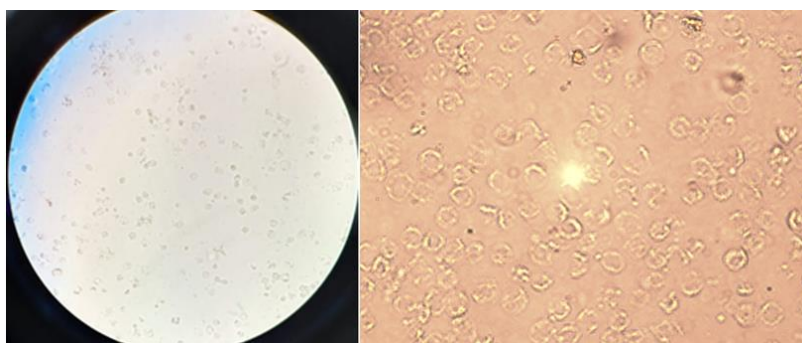


Ilustración 11: Células estimuladas con PMA, Autoría propia, 2024.

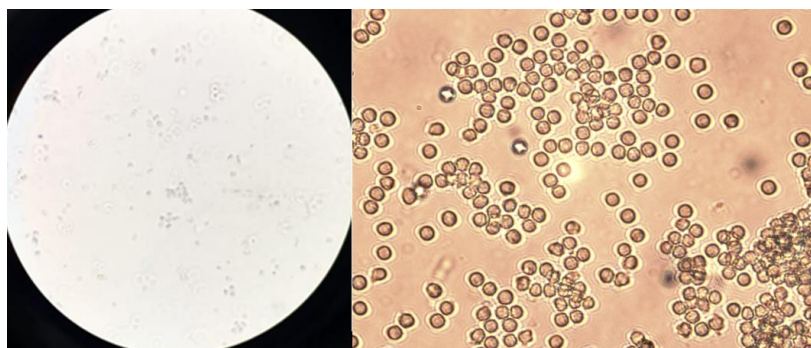


Ilustración 12: Células sin estimular, Autoría Propia, 2024.

7.3 Cuantificación de complejos MPO-ADN a través de ELISA.

Para cuantificar la presencia de NETs en muestras de suero, se empleó un ensayo tipo ELISA sándwich dirigido a la detección de complejos MPO-ADN, considerados un biomarcador indirecto y ampliamente validado de NETosis. Esta técnica permite identificar específicamente la unión entre la enzima MPO, presente en los gránulos de neutrófilos, y el ADN extracelular liberado

durante la formación de NETs. El protocolo utilizado fue una adaptación del método de ELISA tipo sándwich descrito previamente por Kessenbrock et al. (50) y Zuo (10)

Para el anticuerpo Anti-MPO (Bio-Rad 0400-0002 se probaron concentraciones de 5 µg/mL y 1 µg/mL, ambas efectivas, pero al realizar los análisis estadísticos la última concentración ofreció una mejor diferenciación estadística y optimizar el uso del reactivo, por otro lado, la identificación y medición de complejos requería de los sueros de cada paciente incluido en el estudio, se compararon metodologías que usaban 40 µL de suero del paciente más 60 µL de incubación frente a otro artículo que lo hizo a 1:10 (1 de muestra del paciente con 10 de buffer de incubación), seleccionando esta última por su desempeño en cuanto a los análisis estadísticos aplicados. Para la solución de bloqueo, se ajustó la composición original (PBS1X + BSA 5%) añadiendo Tween al 0,05% para reducir el ruido observado en ensayos anteriores, además se evaluaron tiempos del TMB (10, 8, 5 y 3 minutos), seleccionando finalmente 5 minutos para evitar sobresaturación (10 y 8 minutos) o bajo tiempo de reacción (3 minutos). Finalmente se optimizó el número de lavados y tiempo de incubación hasta establecer las condiciones adecuadas y definitivas para el montaje.

Los complejos MPO-ADN se cuantifican usando varios reactivos del kit ELISA de detección de muerte celular (Ref: Cell Death Detection ELISA n.º 11544675001, Sigma Aldrich). En placas de 96 pozos de alta absorción (Greiner Bio-One, Ref: 762071) se recubrieron con anticuerpo Anti-MPO (Ref: Bio Rad 0400-002), diluido a una concentración final de 1 mg/mL en PBS 1X (Life Technologies, Ref: 70011044). Se incubó durante toda la noche a 4°C.

Al siguiente día, la solución del anticuerpo fue retirada y se lavaron 3 veces las placas con 200 µL de tampón de lavado (PBS 1X con 0,05% Tween-20; Ref: P1379, Sigma-Aldrich).

Posteriormente, las placas fueron bloqueadas con 200 µL por pozos de tampón de bloqueo compuesta por albúmina sérica bovina (BSA, 5%; Ref: A3912, Sigma-Aldrich) y 0,05% Tween-20 en PBS 1X, y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente (RT) en agitación a 30 RPM. Después del tiempo de incubación se realizaron 5 lavados y se incubaron con 100 µL de las muestras control, preparadas en diluciones seriadas 1:2, iniciando desde una dilución 1:5 (NETs provenientes de sobrenadantes de neutrófilos estimulados o no con PMA) o con muestras de suero

al 10% diluidas en 5% BSA en PBS 1 X. Se incubaron las placas a RT con agitación de 30 rpm durante 90 minutos.

Tras 5 lavados con buffer de lavado (PBS 1 X + 0,05% Tween 20), se añadieron 100 µL por pozo anticuerpo anti-ADN conjugado con peroxidasa (Roche-Cell Death Detection ELISA PLUS Anti-ADN/ POD, Ref: 11774425001), diluido 1:100 en 5% BSA + 0,05% Tween-20 en PBS 1X nuevamente a RT con agitación a 30 rpm durante 90 minutos. Luego se realizan 5 lavados, se añadieron 100 µL de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB; Ref: T 2885, Sigma-Aldrich) se incubaron durante 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y para finalizar se detuvo agregando 100 µL por pozo de solución de detención 2N (H₂SO₄). Se leen los pozos a 450 nm y se realiza una segunda lectura a 655 nm como longitud de corrección. Los controles montados en esta ELISA, se usaron para realizar una curva estándar que permite así calcular los niveles de complejos MPO-ADN en las muestras de suero, expresados como porcentaje relativo al estándar de NETs.

7.4 Inducción de NETosis *in vitro* e identificación por IFI.

Para evaluar la capacidad de inducción de NETs por parte de los sueros de los distintos grupos de estudio, se llevó a cabo la estandarización de una técnica de IFI. Este procedimiento permitió visualizar y cuantificar la formación de NETs *in vitro* mediante la detección simultánea de ADN y proteínas características del proceso, como la MPO y las histonas. Durante la fase de estandarización, se optimizaron condiciones críticas como la concentración de suero, el tiempo de estimulación, el número de neutrófilos por campo, el protocolo de fijación y permeabilización, así como las diluciones y combinaciones de anticuerpos primarios y secundarios. Esta técnica resultó clave para determinar el efecto de los sueros de pacientes con COVID-19 agudo, SPC y controles pre-pandémicos sobre la inducción de NETosis en neutrófilos de individuos sanos.

Los neutrófilos fueron aislados a partir de muestras de sangre recién recolectada de individuos sanos (2 voluntarios) siguiendo el protocolo de purificación de neutrófilos humanos descrito previamente. Para evaluar la capacidad para inducir NETs se selecciona una n=5 de cada grupo, esto se hizo usando métodos estadísticos que seleccionaron de forma aleatoria las 5 muestras de cada grupo.

Para hacer la inmunofluorescencia se usó una placa de 24 pozos (Ref: 92024, TPP / 128*85*22) en donde se agregó por pozo un cubreobjetos recubierto con poli-L-Lisina al 0.01% (Ref: P8920, Sigma-Aldrich) más 2.5×10^5 del aislado celular de neutrófilos. Las células fueron incubadas bajo tres condiciones: sin estímulo, estimuladas con PMA a 100 nM (controles), o en presencia de suero al 10%. Se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire. Y cada condición se realizó por duplicado. Tras 4 horas de incubación, se fijaron las células con paraformaldehído al 4% (Ref: 150146, MP Biomedicals) durante 15 minutos a RT. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS 1X, las células fijadas fueron permeabilizadas durante 5 minutos con Tritón X-100 al 0.5% (Ref: G5516, Sigma-Aldrich) y posteriormente bloqueadas con albúmina sérica bovina (BSA) al 5% (Ref: A3912, Sigma-Aldrich) en PBS, durante 30 minutos a RT.

Para observar las NETs, se incubó un anticuerpo primario contra MPO (MPO; Ref: Ab9535, Abcam) diluido 1:30 en solución de bloqueo, durante la noche a 4°C. Después se lavó tres veces con PBS 1X que contenía 0.2% Tritón X-100, luego se realizó una incubación secuencial con un anticuerpo anti-ADN/Histona H1 (Ref: Mab3864, Sigma-Aldrich), diluido 1:100, durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, los anticuerpos primarios fueron revelados utilizando anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor 488 (Ref: A11001, Thermo Fisher Scientific) y Alexa Fluor 546 (Ref: A11010, Thermo Fisher Scientific), ambos diluidos 1:1000 en solución de bloqueo. Se realizaron 3 lavados para posteriormente teñir el ADN con Hoechst33342 (Ref: H3570, Thermo Fisher Scientific) y los cubreobjetos fueron montados con glicerol al 70%.

Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio Leica DMI8 y procesadas con el software Leica Application Suite X (LAS-X). **(Anexos, 11.6)**

Una vez completado el proceso de estandarización de los protocolos experimentales, tanto para la detección de complejos MPO-ADN mediante ELISA como para la evaluación de la capacidad inductora de NETs mediante IFI, se procedió a la aplicación de estos ensayos en las poblaciones de estudio. Las muestras correspondientes a pacientes con COVID-19 agudo, SPC e individuos sanos pre-pandémicos fueron analizadas utilizando los protocolos previamente optimizados, lo que permitió garantizar la comparabilidad de los resultados.

7.6 Características clínicas de los pacientes.

Se incluyeron y evaluaron pacientes con COVID-19 agudo severo y con SPC según lo descrito previamente. Al momento del estudio, ninguno de los pacientes estaba vacunado. La mayoría de los pacientes eran hombres (62.9%), con una mediana de edad de 50 años (rango intercuartílico [RI] de 41 a 56). La mediana del tiempo desde el inicio de los síntomas hasta la inclusión fue de 9 días (RI, 7 a 11). Todos los pacientes fueron hospitalizados, y el 17.2% requirió ingreso a la unidad de cuidados intensivos (UCI). Los síntomas más comunes al ingreso durante la fase aguda de COVID-19, reportados por más del 80% de los pacientes, fueron fatiga y malestar general, tos seca, fiebre, disnea, mialgia y artralgia. Las comorbilidades más prevalentes fueron enfermedad ácido-péptica (40%), obesidad (34.3%) y dislipidemia (34.3%). Todos los pacientes recibieron antibióticos, y la mayoría también fue tratada con heparina (91.4%) y corticosteroides (80%).

Estos mismos pacientes presentaron posteriormente manifestaciones del SPC. El tiempo mediano post-COVID fue de 217 días (RIC, 186 a 238). Los síntomas musculoesqueléticos (74.3%), principalmente caracterizados por artralgia, dolor de espalda y sensación de pesadez en brazos y piernas, fueron los más frecuentemente observados en el SPC, seguidos por síntomas neurológicos (54.3%), incluyendo cefalea, parestesias y mareo. También se reportaron con frecuencia síntomas pulmonares (45.7%), como dolor torácico, disnea y rinorrea. En los pacientes con SPC, tanto los síntomas neurofisiológicos, incluyendo depresión evaluada mediante la escala de Zung, como los síntomas autonómicos evaluados con el cuestionario COMPASS-31, presentaron puntajes bajos, lo que indica una severidad leve de dichos síntomas. En comparación con los pacientes con COVID-19, los controles sanos HC presentaron una mayor proporción de mujeres (71.4%, $p = 0.004$) y eran más jóvenes (mediana de edad de 40 años, $p < 0.006$). En la siguiente tabla se muestran las características sociodemográficas y clínicas de los **pacientes** (Anexo 11.6)

7.7 Detección y cuantificación de NETs en suero de pacientes COVID-19, SPC y controles sanos pre-pandémicos.

Una vez estandarizada la prueba de ELISA para la detección de complejos MPO-ADN, se procedió a la evaluación de los niveles de este biomarcador en las tres poblaciones de estudio: pacientes con COVID-19 agudo, SPC e individuos sanos pre-pandémicos. El objetivo de esta medición fue determinar la presencia y persistencia de NETs en el contexto de la infección aguda y su posible asociación con el desarrollo posterior de SPC. Los niveles séricos de complejos MPO-ADN, considerados un marcador indirecto de NETosis, fueron significativamente más elevados tanto en pacientes con COVID-19 agudo como en aquellos con SPC, en comparación con los controles pre-pandémicos. En particular, se observaron diferencias altamente significativas para ambos grupos: pacientes con COVID-19 agudo (p ajustado <0.0001) y pacientes con SPC (p ajustado <0.0001). Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que la formación de NETs no solo está intensamente activada durante la fase aguda de la infección por SARS-CoV-2, sino que también podría persistir en fases posteriores, contribuyendo a la fisiopatología del síndrome post-COVID.

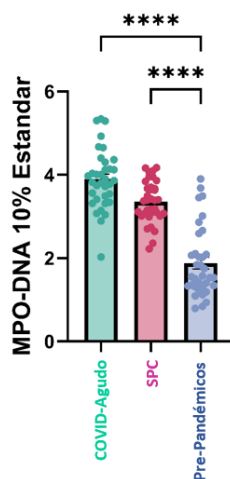


Ilustración 13: Medición de biomarcadores séricos asociados a NETs, realizada con el software GraphPad Versión

10.0.2

Considerando la posible influencia del género en la promoción de la formación de NETs, se evaluó el impacto del sexo biológico sobre los niveles de biomarcadores relacionados con NETosis. Para ello, se compararon los niveles de complejos MPO-ADN entre hombres y mujeres

en los distintos grupos de estudio. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de complejos MPO-ADN en función del género, lo que sugiere que, en esta cohorte, el sexo no fue un factor determinante en la formación o persistencia de NETs.

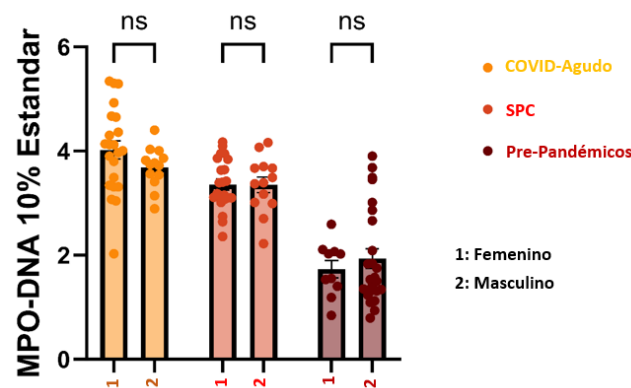
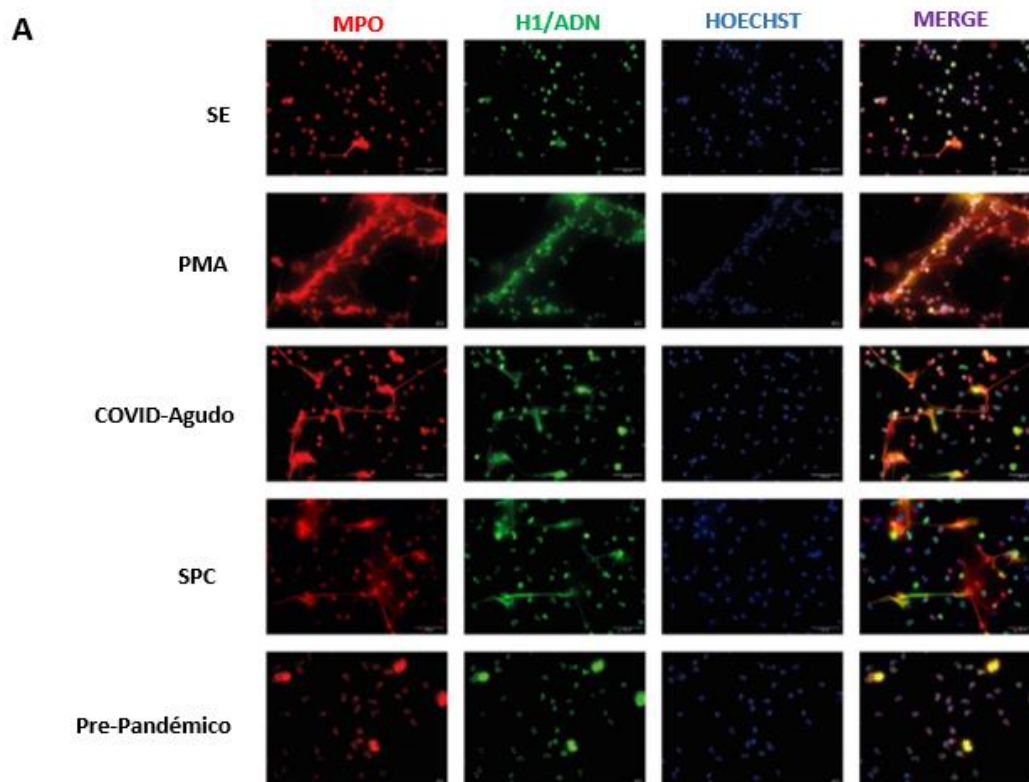


Ilustración 14: Análisis de Género asociado a la formación de NETs, realizada con el software GraphPad Versión 10.0.2

7.8 Inducción de NETosis en neutrófilos sanos por suero de pacientes *in vitro*.

Dado que la infección por SARS-CoV-2 genera un entorno proinflamatorio que favorece la formación de NETs, se evaluó la capacidad del suero de pacientes con COVID-19 agudo para inducir NETosis *in vitro* utilizando neutrófilos de donantes sanos. Asimismo, se investigó si este efecto se mantenía en la fase de SPC. Los resultados mostraron que el suero de pacientes con SPC presentó una capacidad significativamente mayor para inducir la formación de NETs en comparación con los controles sanos pre-pandémicos ($p = 0.0334$). En contraste, aunque el suero de pacientes con COVID-19 agudo mostró una tendencia al aumento de la NETosis respecto a los controles, esta diferencia no alcanzó significación estadística. Además, no se observaron diferencias significativas en los niveles de NETosis entre los grupos de COVID-19 agudo y SPC (Ilustración A y B). Estos hallazgos sugieren que el suero de pacientes con SPC mantiene un potencial inductivo de NETosis comparable al observado durante la fase aguda de la enfermedad. (Ilustración A)



En la ilustración A: se evaluó la capacidad de muestras de suero de pacientes con COVID-19 agudo (n=5), SPC y controles sanos (HC, n=5) para inducir la liberación de NETs en neutrófilos aislados de individuos sanos. Las muestras fueron seleccionadas del total mediante un muestreo aleatorio ponderado, con el fin de asegurar una distribución representativa entre los tres grupos evaluados. (A) Se realizó tinción por inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos contra MPO (rojo), anti-ADN/Histona H1 (verde) y Hoechst (azul) para visualizar los NETs. Se muestran imágenes representativas de neutrófilos no estimulados, neutrófilos estimulados con 100 nM de PMA (controles negativo y positivo, respectivamente), y neutrófilos estimulados con suero de pacientes con COVID-19 agudo, SPC y controles pre-pandémicos.

La formación de NETs fue confirmada mediante la cuantificación de complejos MPO-ADN en los sobrenadantes, utilizando ensayos de ELISA. Los niveles de complejos MPO-ADN fueron significativamente más elevados tanto en los pacientes con COVID-19 agudo ($p = 0.0035$) como en aquellos con SPC ($p = 0.0498$) en comparación con los controles pre-pandémicos. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos de COVID-19 agudo y SPC para ninguno de los parámetros evaluados (Ilustración B y C)

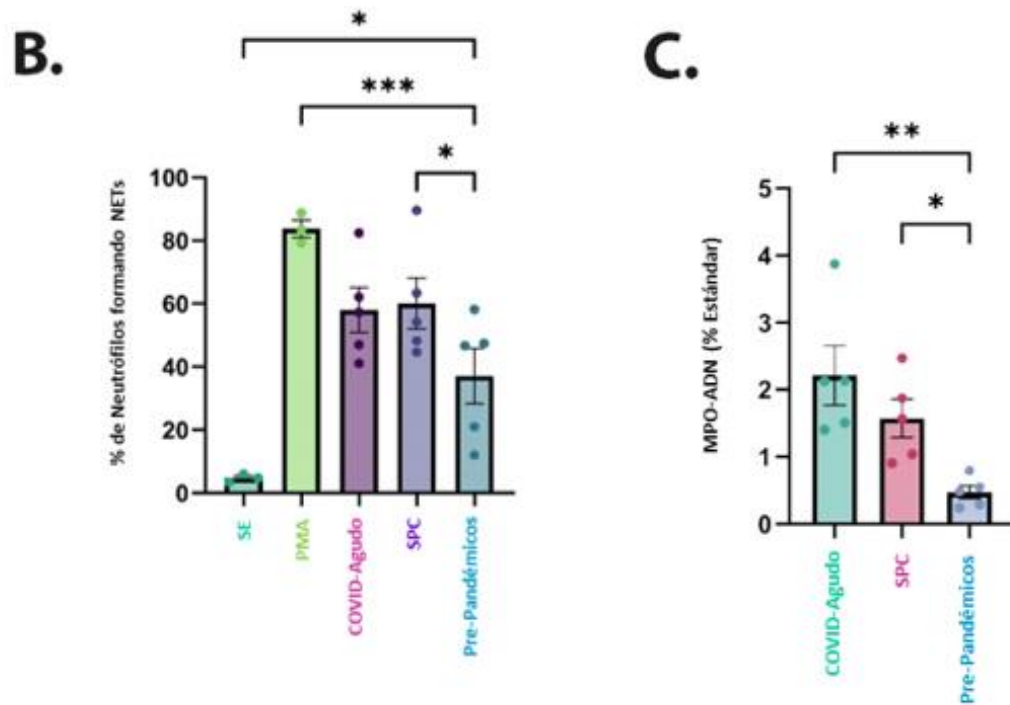


Ilustración 15: Inducción de NETosis en neutrófilos sanos por suero de pacientes con COVID-19 agudo, SPC, Pre-pandémicos.

En la ilustración B y C: Muestra la formación de NETs, se cuantificó utilizando el software ImageJ. El porcentaje de NETs se determinó dividiendo el número de eventos NET observados en los canales de fluorescencia MPO-ADN/H1 por el número total de eventos en el canal DAPI, y luego multiplicando por 100. C: Los complejos MPO-ADN. Los datos de los grupos COVID-Agudo, SPC y Pre-pandémicos se compararon mediante ANOVA (* $P < 0.1$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$).

8 Discusión.

Los niveles séricos del complejo MPO-ADN se evaluaron en este estudio mediante una ELISA tipo sándwich estandarizada, en donde se encontró una elevación significativa en los pacientes con COVID-19 Agudo que posteriormente desarrollaron SPC, en comparación con los controles pre-pandémicos ($P^* <$ para ambos grupos). Este hallazgo sugiere que la formación excesiva de NETs se encuentra asociada particularmente a casos graves de COVID-19 Agudo, principalmente cuando el paciente presenta un compromiso tisular y trastornos de coagulación. La persistencia de niveles elevados de estos complejos en el SPC indica que la activación de neutrófilos y la liberación de NETs podrían contribuir al desarrollo de manifestaciones clínicas de carácter musculoesquelético y neurológico reportados en este estudio. Esta activación de neutrófilos se correlaciona con una neutrofilia marcada.

Un metaanálisis reciente de 15 estudios (3.090 individuos infectados con SARS-CoV-2) señaló que el recuento alto de neutrófilos está asociado con la gravedad de la enfermedad, (38) debido a una liberación masiva de NETs que, en este contexto, ya no tiene como objetivo la defensa, sino se convierte en un factor patógeno.

Nuestros datos muestran que los pacientes con COVID-19 Agudo presentan niveles significativamente elevados de biomarcadores de NETs (Complejo MPO-ADN) en comparación con los controles pre-pandémicos, correlacionándose con la gravedad clínica. Esto respalda el papel patogénico de la NETosis en COVID-19, incluyendo la tormenta de citocinas por activación inmunitaria descontrolada y alta incidencia de eventos trombóticos, ambos estrechamente vinculados a la actividad funcional y desregulada de los neutrófilos. (39) Los sueros de estos pacientes pueden contener plaquetas activadas, células endoteliales activadas, citocinas inflamatorias (IL-1 β , IL-8), factor estimulante de colonias de granulocitos y otros mediadores que favorecen la formación de NETs. Autores como Chen et al. En sus estudios observaron que los pacientes fallecidos por COVID-19 Agudo mantenían niveles elevados de neutrófilos, IL-6, IL-8, procalcitonina, dímero-D y proteína C reactiva, los cuales pueden tener un papel importante como marcadores útiles para predecir el mal pronóstico de estos pacientes. (40,41,42)

Zuo et al. En su estudio analizó sueros de 50 individuos con COVID-19, determinó que hay una mayor cantidad de NETs, esto indica que una sobreactivación de neutrófilos agrava la

fisiopatología de la enfermedad. Otros estudios resaltan el efecto adverso de la producción desregulada de NETs, con un aumento de ADN libre, histonas citrulinadas y complejos MPO-ADN en individuos infectados por SARS CoV-2 (10).

Aunque los biomarcadores de NETs disminuyen en el SPC, no retornan a niveles bajos o comparados con los Pre-Pandémicos, lo que podría explicar las manifestaciones clínicas persistentes. Pocos estudios han demostrado NETs en SPC, pero análisis proteómicos han detectado niveles elevados de histonas citrulinadas, MPO y ADN. (38)

Nuestro estudio destaca por evaluar la capacidad del suero de pacientes con SPC para inducir NETs en neutrófilos sanos *in vitro*, se determinó una diferencia significativa frente a los controles pre-pandémicos. Aunque los de la fase aguda mostró una tendencia similar, la falta de significancia estadística podría deberse a variabilidad inflamatoria o diferencias en la composición del suero. Sin embargo, la similitud en los niveles de NETs entre COVID-Agudo y SPC sugiere que los mecanismos que promueven la formación de NETs se mantienen con el tiempo.

Un estudio con 155 pacientes con COVID-19 asoció la elastasa neutrofílica y el complejo ADN-Histona (marcadores de NETs) con daño multiorgánico (pulmones, corazón y riñones), proponen que niveles >593 ng/mL podrían predecir falla orgánica. (43) El uso de sueros para evaluar la formación de NETs se sustenta en estudios como el de Ebrahimi et al., observó un aumento de NETs séricos en neumonías asociadas al uso de ventiladores, y Mikacenic et al., halló MPO-ADN incrementado en líquido alveolar de pacientes con SDRA. (44) Además, se encontraron histonas extracelulares en lavados Bronco alveolares y plasma de estos últimos pacientes, sugiriendo su papel inductor de NETosis *in vitro*.

Cabe destacar que no todas las vías de NETosis dependen de PAD4 (45), los estímulos generados por ROS pueden ser independientes de esta enzima. (46) En SPC, un estudio con 279 pacientes mostró que los biomarcadores de NETs persisten hasta seis meses post-infección. (47) Otro análisis proteómico identificó un subgrupo de SPC con firmas inflamatorias, correlacionados con desgranulación de neutrófilos y formación de NETs. (48) Todos estos estudios sugieren que los NETs contribuyen a complicaciones de carácter autoinmune, pulmonar, cardiovascular y neurológico en SPC. (49)

9 Conclusión.

Los resultados de este estudio demuestran que la desregulación de la actividad neutrofílica y la formación de NETs no son fenómenos exclusivos de la fase aguda del COVID-19, sino que persisten en el SPC. Estos hallazgos amplían la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes al SPC y resaltan el papel de la NETosis como un posible contribuyente a la inflamación persistente y las manifestaciones clínicas prolongadas observadas en estos pacientes. Además, la identificación de NETs como biomarcadores potenciales abre nuevas oportunidades para el desarrollo de estrategias diagnósticas y terapéuticas dirigidas, que podrían mejorar el manejo clínico y la calidad de vida de las personas afectadas por el SPC.

10. Referencias Bibliográficas.

1. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi Z-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2021;19(3):141–54. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
2. Puntando a posibles impulsores de COVID-19: trampas extracelulares de neutrófilos. *Journal of Experimental Medicine*. 2020;217(6).
3. Pilsczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* [Internet]. 2010;185(12):7413–25. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1000675>
4. Monsalve DM, Acosta-Ampudia Y, Acosta NG, Celis-Andrade M, Şahin A, Yilmaz AM, et al. NETosis: A key player in autoimmunity, COVID-19, and long COVID. *J Transl Autoimmun* [Internet]. 2025;10(100280):100280. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtauto.2025.100280>
5. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* [Internet]. 2004;303(5663):1532–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1092385>
6. Soheili M, Khateri S, Moradpour F, Mohammadzadeh P, Zareie M, Mortazavi SMM, et al. The efficacy and effectiveness of COVID-19 vaccines around the world: a mini-review and meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [Internet]. 2023;22(1):42. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12941-023-00594-y>
7. Delorey TM, Ziegler CGK, Heimberg G, Normand R, Yang Y, Segerstolpe Å, et al. COVID-19 tissue atlases reveal SARS-CoV-2 pathology and cellular targets. *Nature* [Internet]. 2021 [citado el 25 de abril de 2025];595(7865):107–13. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03570-8>
8. Garrido FI, Zaror LC, Lara NI, Zúñiga CN. El rol de las Trampas Extracelulares de Neutrófilos en pacientes con Covid-19. *RBAC* [Internet]. 2023;55(4). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.21877/2448-3877.202300144>
9. Barnes BJ, Adrover JM, Baxter-Stoltzfus A, Borczuk A, Cools-Lartigue J, Crawford JM, et al. Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* [Internet]. 2020;217(6). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20200652>
10. Zuo Y, Kanthi Y, Knight JS, Kim AHJ. The interplay between neutrophils, complement, and microthrombi in COVID-19. *Best Pract Res Clin Rheumatol* [Internet]. 2021;35(1):101661. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.berh.2021.101661>
11. de Vries F, Huckriede J, Wichapong K, Reutelingsperger C, Nicolaes GAF. The role of extracellular histones in COVID-19. *J Intern Med* [Internet]. 2023;293(3):275–92. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/joim.13585>
12. Krinsky N, Sizikov S, Nissim S, Dror A, Sas A, Prinz H, et al. NETosis induction reflects COVID-19 severity and long COVID: insights from a 2-center patient cohort study in Israel. *J*

Thromb Haemost [Internet]. 2023;21(9):2569–84. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtha.2023.02.033>

13. Post COVID-19 condition (Long COVID) [Internet]. Who.int. [citado el 25 de abril de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/post-covid-19-condition>

14. Koc y colaboradores. HC. COVID prolongado y su manejo. Revista Internacional de Ciencias Biológicas. 2022;18(12):4768-4780.

15. Rojas-Valles EU, Magaña-González CA, Herrera-Barrios MT. ¿Los neutrófilos como células de defensa? Inmunobiología y fisiopatología en las enfermedades infecciosas respiratorias humanas. Neumol Cir Torax [Internet]. 2023 [citado el 25 de abril de 2025];82(3):162–73. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0028-37462023000300162

16. Yam-Puc JC. Trampas extracelulares de neutrófilos (NET), consecuencia de un suicidio celular. Gaceta Médica de México. :68–75.

17. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. Nat Rev Immunol [Internet]. 2018 [citado el 25 de abril de 2025];18(2):134–47. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nri.2017.105>

18. Janiuk K, Jabłońska E, Garley M. Significance of NETs formation in COVID-19. Cells [Internet]. 2021;10(1):151. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/cells10010151>

19. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, Gockman K, Zuo M, Madison JA, et al. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. JCI Insight [Internet]. 6 2020;5(11). Disponible en: <https://insight.jci.org/articles/view/138999>

20. Favor OK, Pestka JJ, Bates MA, Lee KSS. Centrality of myeloid-lineage phagocytes in particle-triggered inflammation and autoimmunity. Front Toxicol [Internet]. 2021;3:777768. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/ftox.2021.777768>

21. Lcznilycnz F. El rol de las Trampas Extracelulares de Neutrófilos en pacientes con Covid-19. Revista RBAC. :245–65.

22. El rol de las Trampas Extracelulares de Neutrófilos en pacientes con Covid-19 [Internet]. Revista RBAC. 2024 [citado el 25 de abril de 2025]. Disponible en: <https://www.rbac.org.br/artigos/el-rol-de-las-trampas-extracelulares-de-neutrofilos-en-pacientes-con-covid-19/>

23. Santos-López G, Cortés-Hernández P, Vallejo-Ruiz V, Reyes-Leyva J. SARS-CoV-2: generalidades, origen y avances en el tratamiento. Gac Med Mex [Internet]. 2021 [citado el 25 de abril de 2025];157(1):88–93. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-38132021000100088

24. Rosazza T, Warner J, Sollberger G. NET formation - mechanisms and how they relate to other cell death pathways. FEBS J [Internet]. 2021;288(11):3334–50. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/febs.15589>

25. Yang H, Biermann MH, Brauner JM, Liu Y, Zhao Y, Herrmann M. New insights into neutrophil extracellular traps: Mechanisms of formation and role in inflammation. Front Immunol [Internet]. 2016;7:302. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2016.00302>

26. Llaveta GA, Arandia-Guzmán J. SARS-CoV-2: estructura, replicación y mecanismos fisiopatológicos relacionados con COVID-19. *Gac médica boliv* [Internet]. 2020 [citado el 25 de abril de 2025];43(2):170–8. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662020000200009
27. Quesada JA, López-Pineda A, Gil-Guillén VF, Arriero-Marín JM, Gutiérrez F, Carratala-Munuera C. Período de incubación de la COVID-19: revisión sistemática y metaanálisis. *Rev Clin Esp* (Barc) [Internet]. 2021;221(2):109–17. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rce.2020.08.005>
28. Bouza E, Cantón Moreno R, De Lucas Ramos P, García-Botella A, García-Lledó A, Gómez-Pavón J, et al. Síndrome post-COVID: Un documento de reflexión y opinión. *Rev Esp Quimioter* [Internet]. 2021;34(4):269–79. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.37201/req/023.2021>
29. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* [Internet]. 2012;189(6):2689–95. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1201719>
30. Vorobjeva NV, Chernyak BV. NETosis: Molecular mechanisms, role in physiology and pathology. *Biochemistry (Mosc)* [Internet]. 2020;85(10):1178–90. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1134/S0006297920100065>
31. Rueda Barragán FE, Jara González FE, Vélez-Páez JL. Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) y COVID-19: revisión de la literatura científica. *Rev Chilena Infectol* [Internet]. 2024;41(4):513–22. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182024000400135>
32. Huckriede J, Anderberg SB, Morales A, de Vries F, Hultström M, Bergqvist A, et al. Evolution of NETosis markers and DAMPs have prognostic value in critically ill COVID-19 patients. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):15701. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-95209-x>
33. Forero Argüello H, Hernández Martínez A, Lobo Moncada D, García Bohórquez DF, Fajardo Rivera JE. Caracterización y fisiopatología del Sars-Cov-2, Revisión de la literatura actual. *Rev médicas UIS* [Internet]. 2021;34(2). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.18273/revmed.v34n2-2021006>
34. Blanch-Ruiz MA, Ortega-Luna R, Gómez-García G, Martínez-Cuesta MÁ, Álvarez Á. Role of neutrophil extracellular traps in COVID-19 progression: An insight for effective treatment. *Biomedicines* [Internet]. 2021;10(1):31. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines10010031>
35. Vista de La “niebla mental”, una manifestación neurocognitiva del síndrome post-COVID-19 [Internet]. *Sld.cu*. [citado el 25 de abril de 2025]. Disponible en: <https://revmedmilitar.sld.cu/index.php/mil/article/view/2463/2206>
36. Camicia G, de Larrañaga G. Trampas extracelulares de neutrófilos: un mecanismo de defensa con dos caras. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2013;140(2):70–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2012.04.022>
37. Shafqat A, Omer MH, Albalkhi I, Alabdul Razzak G, Abdulkader H, Abdul Rab S, et al. Neutrophil extracellular traps and long COVID. *Front Immunol* [Internet]. 2023;14:1254310. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2023.1254310>

38. Joshi MB, Kamath A, Nair AS, Yedehali Thimmappa P, Sriranjini SJ, Gangadharan GG, et al. Modulation of neutrophil (dys)function by Ayurvedic herbs and its potential influence on SARS-CoV-2 infection. *J Ayurveda Integr Med* [Internet]. 2022;13(1):100424. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaim.2021.03.006>
39. Li J, Zhang K, Zhang Y, Gu Z, Huang C. Neutrophils in COVID-19: recent insights and advances. *Virol J* [Internet]. 2023;20(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-023-02116-w>
40. Chen R, Sang L, Jiang M, Yang Z, Jia N, Fu W, et al. Longitudinal hematologic and immunologic variations associated with the progression of COVID-19 patients in China. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2020;146(1):89–100. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2020.05.003>
41. Chiang C-C, Korinek M, Cheng W-J, Hwang T-L. Targeting neutrophils to treat acute respiratory distress syndrome in Coronavirus disease. *Front Pharmacol* [Internet]. 2020;11:572009. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2020.572009>
42. Liberale L, Holy EW, Akhmedov A, Bonetti NR, Nietlispach F, Matter CM, et al. Interleukin-1 β mediates arterial thrombus formation via NET-associated tissue factor. *J Clin Med* [Internet]. 2019;8(12):2072. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm8122072>
43. Cavalcante-Silva LHA, Carvalho DCM, Lima É de A, Galvão JGFM, da Silva JS de F, Sales-Neto JM de, et al. Neutrophils and COVID-19: The road so far. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2021;90(107233):107233. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107233>
44. Ebrahimi F, Giaglis S, Hahn S, Blum CA, Baumgartner C, Kutz A, et al. Markers of neutrophil extracellular traps predict adverse outcome in community-acquired pneumonia: secondary analysis of a randomised controlled trial. *Eur Respir J* [Internet]. 2018;51(4):1701389. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1183/13993003.01389-2017>
45. Tatsiy O, McDonald PP. Physiological stimuli induce PAD4-dependent, ROS-independent NETosis, with early and late events controlled by discrete signaling pathways. *Front Immunol* [Internet]. 2018;9:2036. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.02036>
46. Kenny EF, Herzig A, Krüger R, Muth A, Mondal S, Thompson PR, et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife* [Internet]. 2017;6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.24437>
47. Pisareva E, Badiou S, Mihalovičová L, Mirandola A, Pastor B, Kudriavtsev A, et al. Persistence of neutrophil extracellular traps and anticardiolipin auto-antibodies in post-acute phase COVID-19 patients. *J Med Virol* [Internet]. 2023;95(1):e28209. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.28209>
48. Woodruff MC, Bonham KS, Anam FA, Walker TA, Faliti CE, Ishii Y, et al. Chronic inflammation, neutrophil activity, and autoreactivity splits long COVID. *Nat Commun* [Internet]. 2023 [citado el 25 de abril de 2025];14(1):4201. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41467-023-40012-7>
49. Lachowicz-Scroggins ME, Dunican EM, Charbit AR, Raymond W, Looney MR, Peters MC, et al. Extracellular DNA, neutrophil extracellular traps, and inflammasome activation in

severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2019;199(9):1076–85. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201810-1869OC>

50. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* [Internet]. 2009;15(6):623–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.1959>

11. Anexos

11.1 Protocolo de aislamiento de neutrófilos por gradiente- Proyecto NETs CREA

Material

- Tubos falcón de 15ml y 50ml
- Pipetas Pasteur de 3ml estériles
- Kit BD Vacutainer 21G x 1.5 (Ref: 360213)
- Tubos de 4ml para toma de muestra con EDTA
- Recipientes de desechos

Reactivos

- Cloruro de amonio (NH_4Cl – pm: 53,49g/mol)
- EDTA disódico
- HCL
- Ficoll-HystoPaque (densidad 1.077 g/ml) (Ref: 10771, sigma)
- Dextran 6% (ref: 02101514-CF mp biomedical)
- PBS 10X Ca^{+2} – Mg (Ref: 70011044, Life technologies)
- Cloruro de amonio (NH_4Cl – pm: 53,49g/mol)
- EDTA disódico
- HCL
- Cultivo RPMI 1640 (Ref: 11875093, Thermo Fisher)
- 25 Mm HERPES (ref: bp310-5, Fischer)
- Penicilina y estreptomycin (Ref: p4333, Sigma-Aldrich)
- Suero fetal bovino inactivado por calor (ref: s18b, Biowest)
- Dextran (Ref 02101514-CF mp biomedical)
- Azul de tripano
- Etanol al 70%

Equipos

- Centrífuga
- Agitador
- Cabina de flujo laminar

Antes del procedimiento

- **Esterilización:** Se debe esterilizar la cabina de flujo laminar junto con todos los materiales e implementos (nombrados anteriormente) con etanol al 70%
- **Preparar la cabina de flujo láminas:** Abrir la cabina de flujo hasta lo indicado (apertura de aproximadamente 15 cm), se debe esperar hasta la aprobación de uso (OK) para iniciar el procesamiento.
- **Ingreso de material:** pipetas graduadas estériles, pipetas Pasteur estériles (3 ml), gradillas, tubos falcón de 15 ml, pipeteador, marcador y reactivos.

- **Centrifuga:** Atemperar la centrifuga a 4°C
- **Reactivos:** Atemperar reactivos Ficoll-HystoPaque, Dextran 6%, PBS y solución de lisis se encuentren a una temperatura de 18°C a 22°C.
- Preparación de reactivos

Preparación de reactivos

PBS 1X				
Componentes	Reactivos	Referencia del reactivo	Presentación del reactivo	Preparación de 500 ml para PBS 1X – $Ca^{+2} - Mg$
PBS 1X – $Ca^{+2} - Mg$	PBS 10X – $Ca^{+2} - Mg$	70011044, Life thecnologies	Frasco/500 mL	$500ml = 10X$ $? = 1X$ 50ml
NOTAS	● Esta solución se debe preparar a la concentración requerida para los reactivos que se usaran para este montaje. ● Esta se almacena a temperatura ambiente rotulada con componentes, fecha, nombre del proyecto y quien la preparó			

RPMI 1640 con L-glutamina Ca- y Mg- para neutrófilos con 25mM Hepes + 10% FBS + 100 U penicilina/100 ug/mL estreptomycin	
Materiales	Reactivos
● Probeta de 1L ● Pipetas de diferentes volúmenes ● Cabina de flujo laminar	● RPMI 1640 con L-glutamina Ca- y Mg- (Ref: 11875093 Gibco, presentación de 500mL) ● Hepes (ref: bp310-5, Fisher Scientific) ● FBS inactivado (Ref: S181B-500 de Biowest). ● penicilina/estreptomycin (Ref: p4333 de Sigma).
Preparación para una botella de 500ml: Agregar 1. 12.5 mL Hepes 2. 50mL de FBS inactivado 3. 5mL de penicilina/estreptomycin (stock: 10.000 U penicilina/10 mg/mL estreptomycin)	
NOTAS	● Este reactivo se debe preparar en la cabina manteniendo la esterilidad. ● Almacenar a 4°C

Dextran al 6%	
Material	Reactivos
● Probeta de 1L ● Balanza ● Cabina de flujo laminar ● Agitador ● Filtro pirinola de 0,2uM ● Jeringa de 20ml	● Dextran al 6% (ref: 02101514-CF mp biomedical, peso molecular 200.000 – 300.000 Da.) ● RPMI 1640 con L-glutamina Ca- y Mg- (Ref: 11875093)
Preparación para 10ml: Agregar 1. Pesar 0.6 gr de dextran y diluirlo en 10 ml de RPMI medio 1640. 2. Posteriormente filtre el dextran preparado por un filtro pirinola para usar en cultivo celular.	
NOTAS	● Se usa dextran en polvo, altamente volátil y poco soluble es altamente volátil y poco soluble, por ello es NECESARIO llevar al vórtex de 3-5 minutos para homogeneización completamente. ● Se prepara el dextran al 6% para posteriormente diluir esta solución con la muestra del paciente y obtener una concentración final de dextran al 3%.

Preparación de ACK (buffer de lisis)	
Material	Reactivos
● Probeta de 1L ● Agua destilada 1L ● Balanza ● Medidor de Ph ● Filtro ● Cabina de flujo laminar ● Filtro cafetera.	● Cloruro de amonio (NH₄CL – pm: 53,49g/mol) ● EDTA disódico ● HCL
Preparación: 1. En la probeta agregue 800ml de agua destilada. 2. Agregue 8,02 g de cloruro de amonio a la solución anterior 3. Agregar 0,0372 g de EDTA disódico a la solución anterior. 4. Medir el Ph de la solución este debe estar entre 7,2 y 7,4 *(en el caso de no estar dentro de este intervalo, agregar 2 gotas de HCL con una pipeta Pasteur para ajustarlo). 5. Llevar a un volumen final de 1L. 6. Finalmente se debe esterilizar por filtración en cabina.	

Preparación de Poly-L-Lisina al 0,01%
--

Materiales		Reactivos	
● Beaker ● Pipetas de diferentes volúmenes ● Filtro ● Tubos falcón de 15 ml		● Poli-L-lisina (Ref: p8920, Sigma) 0.1% (w/v) ● Agua destilada (previamente preparada)	
Preparación: Diluir la solución de Poli-L-Lisina al 1% en agua destilada manteniendo una relación de 1:10 (1 Poli-L-Lisina:10 agua destilada) para finalmente obtener una concentración final de 0.01%			
NOTAS	● Debe filtrar esta solución antes de su uso y mantener la esterilidad para usar en cultivo celular. ● Se debe almacenar de 2-4°C y tiene una viabilidad de 3 meses). ● Esta solución debe realizarla solo si va a realizar estimulación e inmunofluorescencia.		

Procedimiento

*Se realizará el protocolo con los mililitros del ejemplo, sin embargo, tenga en cuenta que debe ajustar los cálculos y proporciones de acuerdo a los ml de sangre obtenidos.

1. Extracción de muestra:

- Se realiza la extracción de neutrófilos a partir de sangre venosa recién recolectada utilizando el Kit BD Vacutainer 21G x 1.5 (Ref: 360213) y tubos de 4ml con EDTA. Se recomienda tomar 2 o 3 tubos para obtener un volumen final de 7 a 10 ml de sangre.
*(Procesar muestra dentro de los 30 minutos posteriores a la extracción)

2. Sedimentación:

- En un tubo falcón de 15 ml, agregue la sangre obtenida en todos los tubos EDTA que fueron extraídos anteriormente. (Se obtendrá un volumen final de aproximadamente 7 ml). Se obtuvo un volumen final de 5.5 ml de sangre.
- Agregar un volumen de 5,5 ml de Dextran al 6% manteniendo una relación de 1:1 (sangre: dextran)
- Agitar los tubos por inversión (hacer 10 veces / movimiento moderado). Luego, sedimentar colocando los tubos en posición vertical durante 40 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad.
- Posteriormente visualizará dos capas, aspirar la capa superior (rica en leucocitos y pobre en eritrocitos) con una pipeta Pasteur estéril de 3 ml, transferir el aspirado a un tubo falcón estéril de 15 mL. Se obtuvo 6 mL de plasma rico en leucocitos.

Fotografía de referencia	NOTAS del procedimiento:
---------------------------------	---------------------------------

	Después de los 40 minutos se deben observar estas dos capas: 1. La primera capa color amarillo claro, corresponde a la capa rica en leucocitos 2. La capa inferior color rojo oscuro, corresponde a la capa de eritrocitos sedimentados ● Al aspirar la capa superior debe hacerlo con cuidado para evitar contaminar el sobrenadante con los eritrocitos sedimentados.
---	---

3. Aislamiento por densidades:

En un tubo falcón de 15mL añadir el Ficoll manteniendo una relación 1:2 (Ficoll: sobrenadante de leucocitos).

Fotografía de referencia	NOTAS del procedimiento
	● La capa superior de color rojo, corresponde al sobrenadante rico en leucocitos ● La capa inferior de color transparente, corresponde al Ficoll. 1. Es importante añadir primero el Ficoll y luego, agregar CUIDADOSAMENTE el sobrenadante de leucocitos. 2. Debe añadir el sobrenadante despacio para no alterar las células, para ello, agregue el sobrenadante lentamente y que no toque directamente el Ficoll, sino que se deslice por las paredes del tubo.

- Posteriormente debe centrifugar a:

Gravedades	Tiempo	Temperatura	Aceleración	Desaceleración.
600g	20 min	25-27°C	4	0

Fotografía de referencia	NOTAS del procedimiento
--------------------------	-------------------------



Ilustración 17: Imagen de referencia del procedimiento de centrifugación después del Ficoll, Autoría Laboratorio CREA

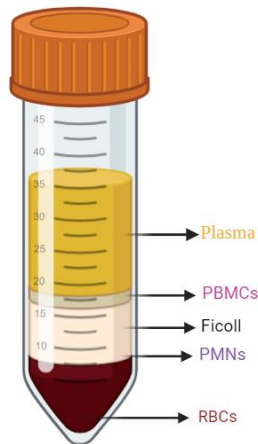


Ilustración 18: Esquema de referencia para diferenciar las capas después del Ficoll, Autoría Propia

Posterior a la centrifugación se deben las siguientes bandas en el tubo cónico:

- La capa superior, color amarillo es el plasma
- La capa siguiente, color claro contiene las células mononucleares (aspecto turbio)
- Seguido de la banda de Ficoll
- Finalmente, la banda clara, pero con un aspecto turbio y denso contiene las células polimorfonucleares y los eritrocitos.

*Después de diferenciar las capas, con **CUIDADO** aspire la capa de plasma, PBMCs y Ficoll.

- Aspirar con una pipeta Pasteur y descartar la capa celular que tiene los mononucleares y el Ficoll. (se debe realizar **CUIDADOSAMENTE** para evitar contaminar la capa de celular rica en PMNs).

4. Lisis de eritrocitos:

- Suspender el sedimento rico en PMNs en 6ml de solución de ACK. Se debe incubar a temperatura ambiente durante 15 min en la oscuridad.

NOTA: Mezclar por pipeteo 10 veces

IMPORTANTE: inicie el paso 1 del procedimiento de estimulación de trampas extracelulares, el cual pide que recubra los cubreobjetos con Poly-L-Lisina al 0.01% *(Este procedimiento **SOLO** lo debe realizar si va a realizar estimulación e inmunofluorescencia).

- Posteriormente se debe centrifugar:

RPM	Tiempo	Temperatura	Aceleración	desaceleración
1500 RPM	5 min	4°C	9	9

- Decantar el sobrenadante manteniendo el botón (contiene los PMNs) dentro del tubo.
- Para obtener un resultado óptimo, se deben añadir 5 ml de solución ACK (nuevamente), se incuba 5 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

- Posteriormente se debe centrifugar:

RPM	Tiempo	Temperatura	Aceleración	desaceleración	Fotografía
1500 RPM	5 min	4°C	9	9	 <i>Ilustración 19: Imagen de referencia del resultado óptimo después de la centrifugación, Autoría Laboratorio CREA</i>

- Resuspender el botón el botón de PMNs con 3 ml de RPMI 1640, se debe mezclar con el pipeteador sin generar burbujas.

5. Visualización:

- Una vez aisladas, se debe evaluar la viabilidad celular con azul de Tripano (0.4%). Para evaluar la morfología nuclear se realiza una tinción con azul de metileno (0.1%) en combinación con una técnica de portaobjetos de vidrio. (para determinar rendimiento y pureza).

Montaje en cámara de Neubauer	
Materiales	Reactivos
• Cámara de Neubauer • Tubos Eppendorf • Micropipeta • Puntas estériles	• Azul de tripán • Cultivo de neutrófilos previamente preparado
Fundamento	El principio se basa en que las células vivas, al tener una membrana citoplasmática intacta, son capaces de excluir el colorante y permanecen sin teñirse; por el contrario, en las células muertas, cuya membrana está dañada, el colorante puede penetrar, lo que provoca que adquieran un tono azul
Procedimiento • En un tubo eppendorf realice una dilución 1:5 (células aisladas: Azul de tripán), es decir, 80µL de azul de Tripano y 20µL de células	

- Posteriormente, realice el montaje en la cámara de Neubauer y realice el conteo celular teniendo en cuenta el fundamento de la prueba de viabilidad celular

6. Conteo Celular:

- Realizar conteo en cámara de Neubauer de acuerdo con el protocolo institucional (procedimiento anterior). Para muestras de 7-8 ml de sangre, se espera obtener entre 5×10^6 y 8×10^6 neutrófilos.

7. Pureza y morfología

- Para determinar la pureza y morfología del aislamiento se debe realizar el siguiente montaje.

Montaje con Azul de Metileno	
Materiales	Reactivos
• Lámina portaobjetos y cubreobjetos • Tubos Eppendorf • Micropipeta • Puntas estériles • Pipeta Pasteur	• Azul de Metileno • Cultivo de neutrófilos previamente preparado
Procedimiento • En un tubo eppendorf agregue: • 50µL de azul de metileno y 50µL de células aisladas. Montaje • En una lámina portaobjetos agregue una gota de la preparación previa (azul de metileno y células) y cubra con una lámina cubreobjetos y deje secar durante 15 minutos y lleve al microscopio para lectura Lectura • Recorra la lámina y realice conteo celular a 100 células. Resultado esperado • El total de neutrófilos que obtenga será el % de pureza que tiene el cultivo celular, durante la lectura debe verificar que la morfología de estos neutrófilos sea la acorde.	
NOTAS	• La lámina cubreobjetos y portaobjetos debe estar nueva y muy limpia. • Agregue una gota pequeña para que no se desborde la preparación al colocar la lámina cubreobjetos.

11.2 Stock de NETs para control de ELISA.

Materialles

- Micropipetas multicanal
- Micropipetas de diferentes volúmenes
- Parafilms
- tubos eppendorf
- Tubos falcón de 15ml
- Puntas para micropipetas estériles
- pipetas graduadas estériles

Reactivos

- Ficoll-HystoPaque (densidad 1.077 g/ml) (Ref: 10771, Sigma Aldrich)
- Dextran 6% (ref: 02101514-CF mp biomedical)
- PBS 10X $-Ca^{+2} - Mg$ (Ref: 70011044, Life technologies)
- Cloruro de amonio (NH₄CL – pm: 53,49g/mol)
- EDTA disódico
- HCL
- Cultivo RPMI 1640 (Ref: 11875093, Thermo Fisher)
- 25 Mm HERPES (ref: bp310-5, Fischer)
- Penicilina y estreptomycin (Ref: p4333, Sigma-Aldrich)
- Suero fetal bovino inactivado por calor (ref: s18b, Biowest)
- Dextran (Ref 02101514-CF mp biomedical)
- Forbol 12-miristato 13- acetato (PMA; Sigma, P8139). Concentración stock de 5 mg/ml en alícuotas.

Equipos

- Centrífuga
- Cabina de flujo laminar
- Vórtex

Antes del procedimiento

- **Esterilización:** Se debe esterilizar la cabina de flujo laminar junto con todos los materiales e implementos (nombrados anteriormente) con etanol al 70%
- **Preparar la cabina de flujo láminas:** Abrir la cabina de flujo hasta lo indicado (apertura de aproximadamente 15 cm), se debe esperar hasta la aprobación de uso (OK) para iniciar el procesamiento.
- **Centrifuga:** Atemperar la centrifuga a 4°C

- **Reactivos:** Atemperar reactivos Ficoll-HystoPaque, Dextran 6%, PBS y solución de lisis se encuentren a una temperatura de 18°C a 22°C.
- **Preparación de dextran 6%** (ref: 02101514-CF mp biomedicals, peso molecular 200.000 – 300.000 Da.)
- Preparación de solución de lisis de eritrocitos (Nombre: ACK)

Preparación de reactivos

Preparación de ACK	
Materiales	Reactivos
● Probeta de 1L ● Agua destilada 1L ● Balanza ● Medidor de Ph ● Filtro ● Cabina de flujo laminar	● Cloruro de amonio (NH₄CL – pm: 53,49g/mol) ● EDTA disódico ● HCL
Preparación: 4. En la probeta agregue 800ml de agua destilada. 5. Agregue 8,02 g de cloruro de amonio a la solución anterior. 6. Agregar 0,0372 g de EDTA disódico a la solución anterior. 7. Medir el Ph de la solución este debe estar entre 7,2 y 7,4 *(en el caso de no estar dentro de este intervalo, agregar 2 gotas de HCL con una pipeta Pasteur para ajustarlo). 8. Llevar a un volumen final de 1L. 9. Finalmente se debe esterilizar por filtración en cabina.	

Preparación de medio RPMI 1640	
Materiales	Reactivos
● Probeta de 1L ● Agua destilada 1L ● Cabina de flujo laminar	● Cultivo RPMI 1640 más L-glutamina ● 25 Mm HERPES ● 5ml de penicilina (cf 100und/ml) ● estreptomicina (cf: 100pg/ml) ● Suero fetal bovino inactivado por calor
Preparación de medio RPMI 1640 Para un volumen final de 500 ml agregar: ● 50 ml de SFB al 100% ● 12.5 Ml DE herpes concentración de 25 mM ● 5ml de penicilina (cf 100 und/ml) estreptomicina (cf: 100pg/ml)	

NOTAS:	● Almacenar a 4 C bien cerrado ● Se alícuota el medio para evitar la contaminación.
---------------	--

Preparación de PMA al 10nm
● Concentración stock de 5 mg/ml en alícuotas. ● Tomar 6.18 µL de la alícuota y realizar una dilución en solución intermedia de PBS 1X en una relación 1:1000 (PMA: PBS).

Procedimiento

1. Extracción de muestra:

- El aislamiento de neutrófilos se realiza a partir de sangre venosa recién recolectada de 4 individuos sanos (3 mujeres y 1 hombre) utilizando el Kit BD Vacutainer 21G x 1.5 (Ref: 360213) y tubos de 4 ml con EDTA. Se recolectaron 3 tubos de cada individuo para obtener un volumen final 3ml por tubo *(procesar muestra dentro de los 30 minutos posteriores a la extracción).
- Se toma un tubo de 4 ml con EDTA (muestra previamente tomada) y se añade PMA a una concentración de 100nM, se realizan los cálculos y esto arroja que se deben agregar 43,12 µL de PMA a cada tubo de muestra.

Aislamiento Celular

- Se toma un tubo de 4ml con EDTA (muestra previamente tomada) y se procede a determinar el volumen total de cada muestra, para ellos, se usa un tubo falcón de 15 ml en donde se vacía la muestra previamente tomada.

Individuos	Muestra 2 (Tubo EDTA)
Individuo 1 (Laura)	Se obtuvo un volumen final de 3 ml
Individuo 2 (Dra. Diana)	
Individuo 3 (Dra. Yeny)	
Individuo 4 (Alejandro)	

Sedimentación:

- Posteriormente se agrega 3ml de dextran al 6% a cada tubo, manteniendo una relación de 1:1 (sangre: dextran)
- Se agitan los tubos por inversión un total de 10 veces (movimiento moderado). Luego, se posicionan los tubos verticalmente (gradilla) y se incuban 40 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

- Posteriormente se visualizarán dos capas, se debe aspirar la capa superior (rica en leucocitos y pobre en eritrocitos) con una pipeta Pasteur estéril de 3 ml, este se debe transferir a un tubo falcón estéril de 15 mL. Se obtuvo en total de 4 ml de sobrenadante de cada muestra

Aislamiento por densidades:

- En un tubo falcón de 15mL (por muestra) se agregan 2ml de Ficoll y **CUIDADOSAMENTE** se deben añadir los 4ml del sobrenadante previamente obtenido (sobrenadante rico en leucocitos y pobre en eritrocitos)

NOTA: *Siempre se debe mantener una relación 2:1 (Sobrenadante: Ficoll)

- Posteriormente se debe centrifugar a $600\times g$ durante 20 minutos a 20°C con una aceleración de cuatro y sin desaceleración (frecuencia de frenado = 0).

NOTA: *Posterior a la centrifugación se deben observar tres bandas en los tubos falcón. La banda con un color claro contiene las células mononucleares, seguido de la banda de Ficoll y por último la banda clara, pero con un aspecto turbio y denso contiene las células polimorfonucleares y los eritrocitos.

- Aspirar con una pipeta Pasteur y descartar la capa celular que tiene los mononucleares y la banda de Ficoll. (se debe realizar CUIDADOSAMENTE para evitar contaminar la capa de celular rica en PMNs).

Lisis de eritrocitos:

- Suspender el sedimento rico en PMNs en 3ml de solución de ACK. Se debe incubar a temperatura ambiente durante 15 min en la oscuridad.
- Posteriormente se debe centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C , con aceleración y desaceleración programadas en nivel 9.
- Decantar el sobrenadante manteniendo el botón (contiene los PMNs) dentro de los tubos.
- Para obtener un resultado óptimo: Se añaden 3ml de solución ACK (nuevamente), se incuba 5 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
- Posteriormente se debe centrifugar 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C , con aceleración y desaceleración programadas en nivel 9.
- Se decantan los sobrenadantes, manteniendo el botón que contiene los PMNs dentro de los tubos.
- Resuspender el botón de PMNs con 3 ml de RPMI 1640, posteriormente se mezcla suavemente con el pipeteador sin generar burbujas.

Visualización:

- Una vez aisladas las células, se debe evaluar la viabilidad celular con azul de Tripano (0.4%). Para evaluar la morfología nuclear se realiza una tinción con azul de metileno

(0.1%) en combinación con una técnica de portaobjetos de vidrio. (para determinar rendimiento y pureza).

Conteo Celular:

- Para ello, se mezclaron 20 μL del aislado celular con 80 μL de azul de tripano, manteniendo una proporción 1:5 (una parte de células por cinco partes de colorante). La mezcla fue homogeneizada por inversión suave (tres veces) y posteriormente se realizó el montaje en una cámara de Neubauer.
- Los datos obtenidos fueron los siguiente:

Individuo	Promedio de células	Dilución (azul de Tripano)	MI del medio	Constante	Total
1	58	1/5	3 ml	10.000	8.700.000
2	104				15.600.000
3	64				9.600.000
4	22				3.300.000
Notas	Los resultados obtenidos fueron óptimos y lo que se esperaba seguir realizando este protocolo (cada individuo debía tener mínimo 3.000.000 de células)				

Estimulación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)

- Realizar una guía en donde se determina el orden de las muestras
- En la placa de 24 pozos estériles, agregar por pozo 250 μL de las células aisladas anteriormente y 250 μL de medio RPMI 1640 para obtener un volumen final de 500 μL por pozo.
- Posteriormente se añade PMA a una concentración de 100 nM, se realizan los cálculos y esto nos indica que se deben agregar 6,18 μL por pozo, lo mezclamos 3 veces (usando una pipeta de 1000 μL) y se llevaron a incubación a 37°C durante 4 horas.
- Se aspira suavemente el sobrenadante del cultivo (este se almacena en un tubo falcón de 15 mL)
- Se añaden (500 μL o 300 μL) de medio RPMI 1640 y se realiza un lavado para separar todo el material adherido en la placa

Posteriormente se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos a 4 °C, con aceleración y desaceleración programadas en nivel 9. Para sedimentar los neutrófilos y dejar los NETs suspendidos en el sobrenadante se recolectó el sobrenadante y se almacenó en alícuotas de 350 μL a -20°C para posteriormente ser usados.

11.3Protocolo para el montaje de Elisa MPO-ADN/POD

Materiales

- Micropipetas multicanal de 50 µl a 300 µl
- Micropipetas monocanal de 5µl a 1000 µl
- Pipetas graduadas de 5 y 10 ml
- Parafilms
- tubos eppendorf
- Tubos falcon de 15ml
- Puntas para micropipetas estériles y desechables
- Botellas o recipientes de lavado

Reactivos

- Anti-MPO (Ref: Bio Rad 0400-0002)
- Anti-DNA-POD (Ref: Cell Death Detection ELISA, n.º 11544675001, Sigma-Aldrich)
- Isotipo control IgG2b (Ref: Mab: 004)¹
- microplacas de 96 pocillos de alta absorción (Ref: 762071, GBO)
- PBS 10X $-Ca^{+2} - Mg$ (Ref: 70011044, Life technologies)
- Tween 20 (Ref: P1379, Sigma Aldrich)
- BSA (Ref: A3912, Sigma Aldrich)
- TMB CREA²
- H2SO4 al 2N

Equipos

- pHchímetro
- Espectrofotómetro
- Balancín (Thermo Scientific Compact Digital Rocker)
-

Antes de empezar

1. Realice un mapa para poder guiarse durante el montaje.
2. Preparación de soluciones.

Aquí se presentarán las soluciones necesarias para llevar a cabo el montaje. Es importante tener en cuenta las notas específicas indicadas en cada cuadro para la correcta preparación de cada solución.

Coating Buffer				
Componentes	Reactivos	Referencia del reactivo	Presentación del reactivo	Preparación de 500 ml para PBS 1X $-Ca^{+2} - Mg$

¹ Se pueden realizar 5 alícuotas de 200 µl del isotipo control y almacenarlos en -20°C

² Se realiza la preparación paso a paso en este protocolo

PBS 1X – $Ca^{+2} - Mg$	PBS 10X – $Ca^{+2} - Mg$	70011044, Life technologies	Frasco/500 mL	$500ml = 10X$ $? = 1X$ 50ml
Notas	- Esta solución “coating buffer” se debe preparar a la concentración requerida para los reactivos que se usarán para este montaje. - Esta se almacena a temperatura ambiente rotulada con componentes, fecha, nombre del proyecto y quien la preparó			

Solución de lavado				
Componentes	Reactivos	Referencia del reactivo	Presentación del reactivo	Preparación para 500ml
PBS 1X + Tween 20 al 0,05%	PBS 1X – Ca^{+2} – Mg	Preparado previamente en el laboratorio (solución madre)	Frasco rotulado (CREA)	$500ml = 100\%$ $? = 0,05\%$ =250 µl de Tween 20 en 500 ml de PBS 1 X
	Tween 20	P1379, Sigma Aldrich	Frasco/100m L	
Notas	● Esta solución se almacena a -4°C rotulada con componentes, fecha, nombre del proyecto y quien la preparó			

Solución de bloqueo				
Componentes	Reactivos	Referencia del reactivo	Presentación del reactivo	Preparación para 50 ml
PBS1X + Tween al 0,05% + BSA al 5%	PBS 1X – Ca^{+2} – Mg	Preparado previamente en el laboratorio (solución madre)	Frasco rotulado (CREA)	$50ml = 100\%$ $? = 5\%$ =2,5 g de BSA en 50 ml de PBS1X
	Tween 20	P1379, Sigma Aldrich	Frasco/100mL	
	BSA	A3912, Sigma Aldrich	Frasco/100 g	
Notas	- Esta solución se prepara 30 min antes de su uso - Los reactivos deben estar a temperatura ambiente para su correcta preparación			

	Recuerde que los sólidos desplazan volumen así que diluya primero el BSA en 20 ml de PBS 1 X + Tween al 0.05% y luego aforar a 50 ml de PBS 1 X + Tween al 0,05%
--	--

Solución de bloqueo para las muestras				
Componentes	Reactivos	Referencia del reactivo	Presentación del reactivo	Preparación para 20ml
PBS1X + BSA5 al 5%	PBS 1X – Ca^{+2} – Mg	Preparado previamente en el laboratorio (solución madre)	Frasco rotulado (CREA)	$20ml = 100\%? = 5\%$ =1 g de BSA en 20 ml de PBS 1 X
	BSA	A3912, Sigma Aldrich	Frasco/100 g	
Notas	- Esta solución se prepara 30 min antes de su uso - Los reactivos deben estar a temperatura ambiente para su correcta preparación - Recuerde que los sólidos desplazan volumen así que diluya primero el BSA en 10 ml de PBS 1 X y luego afore a 20 ml de PBS 1 X			

Solución de Parada			
Componentes	Reactivos	Referencia del reactivo	Presentación del reactivo
H2SO4 al 2N	H2SO4	-----	-----
Preparación para 50 ml			
Formula: $1,84g \text{ de } sl * \frac{96,563g \text{ de } sl}{100g \text{ de } sl} * \frac{1mol}{98,08g \text{ (concentración ácido)}} * \frac{1000ml}{1l} * \frac{2equ}{1mol} = 36,23N$			
Al 2N:			
$V1 * C1 = V2 * C2$			
Datos: - V1=? - C1= 36,23N - V2= 50ml - C2= 2N			
$V1 * 36,32N = 50ml * 2N$			

$I = \frac{50\text{ml} * 2N}{36,32N} = 2,75\text{ml de H}_2\text{SO}_4 \text{ puro } 98\% \text{ para } 50 \text{ ml}$	
Nota	• Debe almacenarse a temperatura ambiente en un frasco ámbar para evitar su degradación.

TMB (Elaborado por CREA)		
Para la preparación del TMB en el laboratorio CREA, es necesario preparar previamente las siguientes soluciones.		
Solución madre		
Reactivos	Referencia de reactivo	Presentación del reactivo
TMB	T2885, Sigma Aldrich	Frasco/5gr
DMCO	D2650, Sigma Aldrich	Frasco/10ml
Preparación para alícuotas de 1ml		
*Se realiza teniendo en cuenta las siguientes proporciones: $10\text{mg (TMB)} + 10\text{ml (DMCO)}$		
Notas	• Se hicieron alícuotas de 1ml de la solución previamente preparada (solución madre) y se almacenó a -20°C	

Solución de ácido cítrico (0,1M)		
Reactivos	Referencia de reactivo	Presentación del reactivo
Ácido cítrico monohidratado	1310181210, PANREAC	Frasco/500g
Preparación para 100 ml		
Preparación al 0,1N		
DATOS: • Peso molecular: 210,14g • Concentración final: 0,1M • Volumen final 100ml / 0,1L		
1.	Hallar Molaridad (M)	

$$M = \frac{\text{moles Solute}}{\text{litros de solución}} = 0,1M = \frac{?}{0,1l} = 0,1M * 0,1L = 0,01mol$$

2. Cálculo de gramos para la preparación

$$0,01mol * \frac{210,14g}{1 mol} = 2,1g \text{ de Ácido cítrico}$$

Notas

- Se almacenan por a 4°C para futuras preparaciones
- Rotulada con componentes, fecha, nombre del proyecto y quien la preparó

Solución de fosfato no dibásico (0,2M)

Reactivos	Referencia de reactivo	Presentación del reactivo
Sodium phosphate dibasic	S0876, Sigma Aldrich	Frasco/500g
Preparación para 100 ml		
Preparación al 0,2N		
DATOS: • Peso molecular: 210,14g • Concentración final: 0,2M • Volumen final 100ml / 0,1L		
3. Hallar Molaridad (M)		
$M = \frac{\text{moles Solute}}{\text{litros de solución}} = 0,2M = \frac{?}{0,1l} = 0,2m * 0,1l = 0,02m$		
4. Cálculo de gramos para la preparación		
$0,02 mol * \frac{210,14g}{1 mol} = 4,20 g \text{ de fosfato no dibásico}$		
Notas	• Se almacenan a 4°C para futuras preparaciones.	

	• Rotulada con componentes, fecha, nombre del proyecto y quien la preparó.
--	--

Buffer Citrato-Fosfato		
Reactivos	Referencia de reactivo	Presentación del reactivo
H2O ultrapura	*Preparado previamente	*Frasco Rotulada con componentes, fecha, nombre del proyecto y quien la preparó
Solución de fosfato no dibásico (0,2M)	*Preparado previamente	*Frasco Rotulada con componentes, fecha, nombre del proyecto y quien la preparó
Solución de Ácido cítrico (0,1M)	*Preparado previamente	*Frasco Rotulada con componentes, fecha, nombre del proyecto y quien la preparó
Preparación para 100ml / 0,1L a una concentración de 0,05		
Formula: $V1 * C1 = V2 * C2$ Calculo para el fosfato no dibásico (0,2M) Datos: • V1=? • C1= 0,2m • V2= 100ml /0,1L • C2= 0.05m $? * 0,2m = 100ml * 0,05m$ $? = \frac{100ml * 0,05m}{0,2m} = 25ml \text{ de fosfato no dibásico (0,2M)}$ Cálculo para el Ácido cítrico (0,1M) Datos: • V1=? • C1= 0,1m • V2= 100ml • C2= 0.05m $? * 0,1m = 100ml * 0,05m$		

$$? = \frac{100\text{ml} * 0,05\text{M}}{0,1\text{M}} = 50\text{ml de Ácido cítrico}$$

Calculo para el H₂O ultra pura

$$25\text{ml} - 50\text{ml} = 25\text{ml de H}_2\text{O ultrapura}$$

Preparación final de Buffer citrato-fosfato a 0,05M

$$25\text{ml de fosfato no dibásico (0,2M)} + 50\text{ml de Ácido cítrico} \\ + 25\text{ml de H}_2\text{O ultrapura} = 100\text{ ml de Buffer citrato - fosfato}$$

Notas	● Se almacenan por separado a 4°C para futuras preparaciones ● Se debe medir el PH y ajustarlo a 5 ● Rotulada con componentes, fecha, nombre del proyecto y quien la preparó
-------	--

TMB semillero CREA		
Reactivos	Referencia de reactivo	Presentación del reactivo
Buffer Citrato-Fosfato al 0,05M	*Preparado previamente	*Frasco Rotulada con componentes, fecha, nombre del proyecto y quien la preparó
Solución madre	*Preparado previamente	*Frasco Rotulada con componentes, fecha, nombre del proyecto y quien la preparó
Peróxido de hidrógeno al 30%	107210, Merck	Frasco/1L
Preparación para 100ml a una concentración de 1mg/ml		
1. Preparación de solución de trabajo Añadir: ● 1ml de solución madre ● 9ml de Buffer citrato-fosfato a 0,05M con PH de 5 ● 2 µl de peróxido de hidrógeno al 30%		
Notas	● El TMB se debe preparar 5 minutos antes de su uso para evitar su degradación. ● La preparación de esta solución debe hacerse en la oscuridad. ● Los reactivos deben estar atemperados (mínimo 30 minutos).	

Montaje de ELISA MPO-DNA

Primera parte: Día 1 del montaje

- Se realiza la preparación de anticuerpo Anti-MPO (Ref: Bio Rad 0400-0002 para anclar en la placa.
- Los siguientes anticuerpos se diluyeron para lograr una concentración de 1 µg/ml para el recubrimiento de la placa:

Anti-MPO (Ref: Bio Rad 0400-0002)		
Componentes	Referencia del reactivo	Presentación del reactivo
Anti-MPO	Bio Rad 0400-0002	200 µl
PBS 1X	*Preparado previamente	-----
• Se realiza un ejemplo, haciendo cálculos para 96 pozos Este anticuerpo tiene un vial de 0.2 mg (200 µl) con una concentración de 1,0 mg/ml (1000 µg/ml) 1. Se debe hacer el cálculo del volumen requerido por pozo $96 \text{ pozos} * 100\mu\text{l} = 9.600\mu\text{l}/1000 \text{ (mililitro)} = 9,6\text{ml se aproxima a } 10 \text{ ml}$ NOTA: Siempre se debe añadir un volumen adicional teniendo en cuenta el error de pipeteo Datos V1: C1: 1000 µg/ml VF: 10.000 µl CF: 1 µg/ml Fórmula: $V1 * C1 = VF * CF$ $\text{¿?} * 1000 = 10.000 * 1$ $\frac{10.000 * 1}{1000} = 10 \mu\text{l de Anti/MPO} + 9.990 \mu\text{l PBS 1X sin calcio ni magnesio}$		

1. Las microplacas se recubrieron durante la noche añadiendo 100 µl de anticuerpo en cada pozo (Anti-MPO (Ref: Bio Rad 0400-0002) a una concentración final de 1µg/ml (cálculos anteriores), se incubó a 4 °C, se recubre la placa con parafilms y papel aluminio para mantener la humedad de la placa.

Parte 2: Día 2 del montaje

2. Al día siguiente, se realizan 3 lavados a la placa, usando 200 µl por pozo de tampón de lavado (PBS 1 X más 0,05%Tween 20).
3. Posteriormente se bloquean los pozos con 200 µl de tampón de bloqueo (PBS 1X + BSA 5% + Tween al 0,05%) durante 2h a temperatura ambiente en agitación (uso de balancín: 20 RPM)
4. Luego se realizan 5 lavados utilizando 200 µl de tampón de lavado (PBS 1 X + 0,05%Tween 20) por pozo.

NOTA: Los lavados entre placas se realizan seguidos, si es una sola placa, se deja 15 segundos entre lavados

5. Posteriormente añadir el suero de los pacientes y los controles de la siguiente manera:
 - Se deben hacer diluciones 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 para los controles (Pool SN SE y Pool SN PMA)
 - Se deben hacer diluciones 1/10 para las muestras de suero (muestra: solución de bloque sin tween 20)

Cálculo: Se realiza el siguiente ejemplo; el volumen final de cada pozo es de 100 µl

$$100 = 10$$

$$¿? = 1$$

$$\frac{1 * 100}{10} = 10 \mu\text{l de la muestra del paciente} + 90 \mu\text{l de bloqueo (BSA 5\% + Tween 0,05\%)}$$

Una vez puestas las muestras y los controles se llevan a incubar 1h 30 min a temperatura ambiente en agitación (uso de balancín: 30 RPM)

6. Posteriormente se realizan 5 lavados utilizando 200 µl de tampón de lavado (PBS 1 X más 0,05%Tween 20) por pozo.

NOTA: Los lavados entre placas se realizan seguidos, si es una sola placa, se deja 15 segundos entre lavados

Anti-DNA-POD (Ref: Cell Death Detection ELISA, n.º 11544675001, Sigma-Aldrich)

Cálculos para 96 pozos

1. Se tiene un total de 96 pozos a los cuales se les añaden 100 µl a cada pozo

*96 pozos * 100µl = 9.600 µl se aproxima a 10.000 µl por el error de pipeteo*

1. Se realiza el cálculo para lograr una dilución 1:100 (anti-DNA: solución de bloqueo)

$$10.000 = 10$$

$$\text{¿?} = 1$$

$$\frac{10.000 * 1}{100} = 100 \mu\text{l de Anti-DNA} + 9.900 \mu\text{l de buffer de bloqueo}$$

7. Se añaden 100 µl del Anti-DNA-POD (previamente preparado) (Cell Death Detection ELISA, n.º 11544675001, Sigma-Aldrich) y se deja en incubación 1h 30 min a temperatura ambiente en agitación (uso de balancín: 30 RPM).
8. Se realizan 5 lavados utilizando 200 µl de tampón de lavado (PBS 1 X más 0,05% Tween 20) por pozo.

NOTA: Los lavados entre placas se realizan seguidos, si es una sola placa, se deja 15 segundos entre lavados

9. Posteriormente se añaden 100 µl de TMB (Ref: 508504, Innova) y se deja desarrollar la reacción por 10 minutos (todo este paso se desarrolla en la oscuridad) para posteriormente añadir la solución de parada, 100 µl por pozo (H2SO4 al 2N, previamente preparado).
10. Se realiza la lectura de la placa a 450 nm y una segunda lectura a 655nm

11.4 Protocolo para Estimulación de trampas extracelulares de neutrófilos – Proyecto NETs CREA

Reactivos:

- Agua libre de endotoxinas
- Solución de PBS al 1% libre de endotoxinas
- Medio RPMI 1640 (Ref: 11875093) suplementado con SFB (ref: s18b, Biowest) al 10%, 25mM de Herpes (ref: bp310-5, Fischer), penicilina (100U/mL) y estreptomicina (100 µg / mL), 10.000 penicilina unidades 10mg de estreptomicina por ml (Ref: p4333, Sigma-Aldrich). (en preparación de reactivos se explica)
- BSA (Ref: A3912, Sigma Aldrich)
- PBS 10X $-Ca^{+2} - Mg$ (Ref: 70011044, Life technologies)
- NaOH (Ref: 106498, Merck)
- Forbol 12-miristato 13- acetato (PMA; Sigma, P8139). Concentración stock de 5 mg/ml en alícuotas.
- Paraformaldehído (Ref: 150146, Mpbimedicals)
- Solución de Poli-L-lisina al 0.01% *Filtrada estérilmente, adecuada para cultivo celular. (Ref: p8920, Sigma) 0.1% (w/v)

Materiales

- Placa de 24 pocillos estériles (Ref: 92024, TPP / 128*85*22)
- Cubreobjetos de vidrio redondos de 13 mm (Ref: 174950, nunc)
- Portaobjetos de microscopios transparente, Vidrio flotado W×D×H: 76×26×1 mm (Ref: 631-1550, VWR)
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml
- Pinzas curvas
- Portaobjetos de microscopio de 75x25x1mm
- Cámara Húmeda
- Equipos
- Incubadora condicionada (37°C al 5% de CO₂)
- Microscopio de epifluorescencia o confocal equipado con objetivo de 40X y filtros para detectar excitación / emisión.
- centrifuga

Preparar antes de comenzar:

- Agregar 300 µL de etanol al 70% para esterilizar el portaobjetos durante 10 min. Este proceso se debe hacer por ambas caras del portaobjetos con ayuda de unas pinzas y una aguja curva para lograr darle la vuelta. Posteriormente lavar con PBS 1 X dos veces.
- Debe tener las células aisladas, para ellos, debe realizar el protocolo de aislamiento de neutrófilos del centro de investigación de enfermedades autoinmunes (CREA)

- Preparar los reactivos (lea las notas de cada reactivo para saber si lo puede preparar previamente o debe minutos antes del montaje)

Preparación de reactivos

Preparación de medio RPMI 1640	
Materiales	Reactivos
Probeta de 1L Agua destilada 1L Cabina de flujo laminar	Cultivo RPMI 1640 más L-glutamina 25 Mm HERPES 5 ml de penicilina (cf. 100 und/ml) estreptomycin (cf.: 100 pg/ml) Suero fetal bovino inactivado por calor
Preparación de medio RPMI 1640 Para un volumen final de 500 ml agregar: • 50 ml de SFB al 100% • 12.5 ml DE herpes concentración de 25 mM • 5ml de penicilina (cf. 100 und/ml) estreptomycin (cf.: 100 pg/ml)	
NOTAS:	Preservar: a 4°C

PBS 1X				
Componentes	Reactivos	Referencia del reactivo	Presentación del reactivo	Preparación de 500 ml para PBS 1X – $Ca^{+2} - Mg$
PBS 1X – $Ca^{+2} - Mg$	PBS 10X – $Ca^{+2} - Mg$	70011044, Life technologies	Frasco/500 mL	$500ml = 10X$ $? = 1X$ 50ml
Notas	• Esta solución se debe preparar a la concentración requerida para los reactivos que se usarán para este montaje. • Esta se almacena a temperatura ambiente rotulada con componentes, fecha, nombre del proyecto y quien la preparó.			

Paraformaldehído al 8% (Solución PFA al 8%)	
Materiales y equipos	Reactivos
• Placa térmica • Pipeta • Beaker • Cámara de extracción • Agitador magnético	• PBS 1X – $Ca^{+2} - Mg$ (previamente preparada) • Paraformaldehído (Ref: 150146, Mpbimedicals) • NaOH al 5N

Preparación de 100 ml a 4% 1. Llevar a una temperatura de 60°C, un volumen de 60 ml de PBS 1X y agregar 8 g de paraformaldehído. 2. Se debe mezclar con un agitador magnético hasta observar la producción de gases en el beaker. 3. Agregar 16 gotas de NaOH a una concentración de 5N para ayudar a disolver el paraformaldehído. (Esperar a que disuelva y la solución se torne transparente) 4. Una vez disuelto el paraformaldehído, la solución debe enfriarse y filtrarse 5. Posteriormente se ajusta el volumen de la solución a 100 ml con PBS 1X.	
NOTAS:	• Este procedimiento se debe realizar en cámara de extracción, ya que, la preparación produce gases tóxicos. • Use TODOS los elementos de protección personal: bata, tapaboca, guantes. • Se puede almacenar a 4°C (para uso de 2 semanas) o a temperatura ambiente (1 semana)

Poly-L-Lisina 0.01%	
Materiales y equipos	Reactivos
Beaker Pipeta Filtro Tubo falcón de 15ml	Poli-L-lisina *Filtrada estérilmente, adecuada para cultivo celular. (Ref: p8920, Sigma) 0.1% (w/v) Agua destilada (previamente preparada)
1. Diluir la solución de Poli-L-Lisina al 1% en agua destilada manteniendo una relación de 1:10 (1 Poli-L-Lisina:9 agua destilada) para finalmente obtener una concentración final de 0.01%	
NOTAS:	• Se debe esterilizar por filtración. • Esta se almacena de 2-4°C (viabilidad por 3 meses)

Preparación de PMA al 10nm
• Concentración stock de 5 mg/ml en alícuotas. • Tomar 6.18 µL de la alícuota y realizar una dilución en solución intermedia de PBS 1X en una relación 1:1000 (PMA: PBS).

Suspensión celular	
Materiales y equipos	Reactivos
• Tubo falcón de 15 ml	• Aislamiento celular previo

	Medio RPMI 1640 (Ref: 11875093) previamente preparado
Suspensión celular para agregar $2,5 * 10^5$ células por pozo 1. En un falcón de 15ml Agregar 250 µL del cultivo celular (protocolo previamente elaborado) y se agregan 2500 µL de medio RPMI (homogenice suavemente). 2. Esta suspensión se prepara teniendo en cuenta que al añadir 500µL por pozo abran $2,5 * 10^5$ células por pozo.	

Procedimiento

1. Cubrir los portaobjetos con 500 µL de Poli-L-Lisina al 0.01% (p/v) en PBS 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente.

IMPORTANTE: inicie este paso del procedimiento de estimulación de trampas extracelulares, cuando se encuentre en el numeral 4 del protocolo de aislamiento por gradiente, el cual se titula **LISIS DE ERITROCITOS con ACK.**

2. Transcurrido el tiempo aspirar la solución y lavar los portaobjetos 3 veces con 500 µL PBS 1X libre de endotoxinas para eliminar la poli-L-lisina no unida.
3. Preparar suspensión celular para agregar $2,5 * 10^5$ células por pozo (Es decir, deben quedar 250.000 células por pozo). **NOTA: Se anexa una tabla con los volúmenes exactos de cada preparado por pozo.**

Número de pozo	Muestra	Células	Medio	Adicional	Volumen final
1	Control SE	250 µl	250 µl	-----	500 µl
2	Control PMA	250 µl	243,82 µl	6,18 µL PMA al 10nm	500 µl
3	Muestra 1	250 µl	200 µl	50 µL Suero del paciente	500 µl
NOTA	Mezcle SUAVEMENTE por pipeteo 2 veces para mezclar muy bien las células, el medio y los adicionales.				

4. Posteriormente, se debe incubar durante 4 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de Co₂.
5. Si desea almacenar los sobrenadantes, extraigamos con una pipeta y almacénese en tubos eppendorf. Llévalos a -80°C para procedimientos posteriores o puede **OMITIR** este paso
6. En una cabina de extracción, lleve la placa y agregue 500 µL por pozo de PFA al 8% e incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente.

7. Aspirar **CUIDADOSAMENTE** y lavar la muestra fijada en los pocillos que contienen los portaobjetos agregando 500 μ L de PBS 1X. (Solo realizar 1 lavado/ este lavado es instantáneo).

NOTA: Para aspirar incline la placa y aspire el pocillo desde la pared del pozo, nunca toque el fondo y hágalo CUIDADOSAMENTE

8. Si la tinción no se realiza de inmediato (protocolo de inmunofluorescencia NETs), es posible almacenar la placa a 4°C.

NOTA: Para almacenarla debe cubrir la placa con Parafilm y papel aluminio para evitar que los portaobjetos se sequen. NO OMITA esto.

11.5 Protocolo para Inmunofluorescencia para NETs – Proyecto NETOSIS

Reactivos:

- Agua libre de endotoxinas
- Solución de PBS al 1% libre de endotoxinas
- Medio RPMI 1640 (Ref: 11875093) suplementado con SFB (ref: s18b, Biowest) al 10%, 25mM de Herpes (ref: bp310-5, Fischer), penicilina (100U/mL) y estreptomicina (100 µg / mL), 10.000 penicilina unidades 10mg de estreptomicina por ml (Ref: p4333, Sigma-Aldrich). (en preparación de reactivos se explica)
- BSA (Ref: A3912, Sigma Aldrich)
- PBS 10X $-Ca^{+2} - Mg$ (Ref: 70011044, Life technologies)
- NaOH / Hidroxido de sodio en lentejas (Ref: 106498, Merck / 500g)
- Forbol 12-miristato 13- acetato (PMA; Sigma, P8139). Concentración stock de 5 mg/ml en alícuotas.
- Paraformaldehido (Ref: 150146, Mpbimedicals)
- Triton X-100 (Ref: G5516, Sigma-Aldrich)
- Solución de Poli-L-lisina al 0.01% *Filtrada estérilmente, adecuada para cultivo celular. (Ref: p8920, Sigma) 0.1% (w/v)
- BSA (Ref: A3912, Sigma-Aldrich)
- Anti-DNA/Histona H1 (Ref: Mab3864).
- Hoechst 33342 (Ref: h3570, life technologies)
- Alexa 488 (Ref: A1101, Invitrogen)
- Alexa 546 (Ref: A11001, Invitrogen)
- Anti-MPO (Ref: Ab9535)

Materiales

- Placa de 24 pocillos estériles (Ref: 92024, TPP / 128*85*22)
- Cámara Húmeda
- Toallas de papel
- Parafilm
- Cubreobjetos de vidrio redondos de 13 mm recubiertos con poli-l-lisina (Ref: 174950, nunc)
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml
- Pinzas curvas
- Portaobjetos de microscopio de 75x25x1mm (Ref: VWR Scientific Microscope Micro Slides Plain 3x1x1mm 1/2 Gross Cat. 48300-047)

Equipos

- Incubadora condicionada (37°C al 5% de Co2)

- Microscopio de epifluorescencia o confocal equipado con objetivo de 40X y filtros para detectar excitación / emisión.
- Centrífuga
- bomba de vacío

Preparar antes de comenzar:

- Debió a ver realizado el Protocolo para Aislamiento y Estimulación de trampas extracelulares de neutrófilos – Proyecto NETs CREA (revisar los protocolos del CREA hay lo puede encontrar)
- Preparación de reactivos para el montaje (debe leer las notas para saber si puede almacenar los reactivos o debe prepararlos minutos antes de su uso)

Preparación de reactivos

Preparación de medio RPMI 1640	
Materiales	Reactivos
• Probeta de 1L • Agua destilada 1L • Cabina de flujo laminar	• Cultivo RPMI 1640 más L-glutamina • 25 Mm HERPES • 5 ml de penicilina (cf. 100 und/ml) • estreptomicina (cf.: 100 pg/ml) • Suero fetal bovino inactivado por calor
Preparación de medio RPMI 1640	
Para un volumen final de 500 ml agregar: • 50 ml de SFB al 100% • 12.5 MI DE herpes concentración de 25 mM • 5 ml de penicilina (cf. 100 und/ml) estreptomicina (cf.: 100 pg/ml)	
NOTAS:	• Preservar: a 4°C • Se recomienda trabajar con alícuotas de 50ml para evitar contaminación del medio.

PBS 1X				
Componentes	Reactivos	Referencia del reactivo	Presentación del reactivo	Preparación de 500 ml para PBS 1X – Ca^{+2} – Mg
PBS 1X – Ca^{+2} – Mg	PBS 10X – Ca^{+2} – Mg	70011044, Life technologies	Frasco/500 mL	$500ml = 10X$ $? = 1X$ 50ml
Notas	• Esta solución se debe preparar a la concentración requerida para los reactivos que se usarán para este montaje. • Esta se almacena a temperatura ambiente rotulada con componentes, fecha, nombre del proyecto y quien la preparó			

Tritón al 0.5%	
Materiales y equipos	Reactivos
Recipiente de almacenamiento de 50 ml (Falcon)	- Triton X-100 (Ref: G5516, Sigma-Aldrich) - PBS 1X $-Ca^{+2} - Mg$ (previamente preparada)
Preparación para 50ml - Realizar los cálculos para concentrar el tritón al 0,5% $50ml = 100\%$ $X = 0.5\%$ $= \frac{0,5 * 50}{100} = 0,25 \text{ ml} * 1000 = 250\mu\text{L de tritón}$ - En el recipiente de almacenamiento agregue 50 ml de PBS 1 X y agregue 250 μL de tritón	
NOTAS:	Prepare la cantidad que requiera para el montaje, no se debe almacenar.

Solución de bloqueo al 5%	
Materiales	Reactivos
- Tubo falcón de 15ml - Balanza - Pipeta	- BSA (Ref: A3912, Sigma Aldrich) - PBS 1X $-Ca^{+2} - Mg$ (previamente preparada)
Preparación para 15ml - Determinar los gramos de BSA para que tenga una concentración de 5% $15ml = 100\%$ $X = 5\%$ $= \frac{5 * 15}{100} = 0,75 \text{ g}$ - En un tubo falcón de 15ml agregue el BSA al 3% (0.45g) y afora a 15 ml con PBS1X	
NOTAS:	Esta solución se prepara 30 min antes de su uso

	• Los reactivos deben estar a temperatura ambiente para su correcta preparación. • Recuerde que los sólidos desplazan volumen así que diluya primero el BSA en 7 ml de PBS 1 X y luego complete los 15 ml • Prepare el volumen que requiera, ya que, esta solución no puede almacenarse para usar luego. • Recuerde que en este buffer debe diluir los anticuerpos, debe incluirlo en los cálculos.
--	--

Procedimiento

1. Agregar 500 µL de solución de Tritón X-100 al 0.5% a los pocillos durante 5 minutos a temperatura ambiente (esto se hace con el fin de permeabilizar las células), después de los 5 minutos aspirar con una bomba de vacío.
2. Agregar 500 µL de buffer de bloqueo a cada pocillo e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente aspire el contenido con una bomba de vacío.

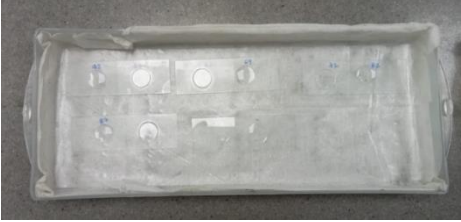
NOTA: En este espacio debe preparar el anticuerpo primario Anti-MPO la solución de tritón al 2%

Anti-MPO (Ref: Ab 9535)	
Material	Reactivos
• Tubo falcón de 15ml • Pipeta • Micropipeta • Puntas estériles	• Buffer de bloqueo (Previamente preparado) • Anti-MPO (Ref: Ab 9535)
Preparación para 220 µL *Tenga en cuenta que requiere de 50µL para cada cubreobjetos. 1. Se debe realizar una dilución 1:30 $I = 30$ $X = 220$ $= \frac{220 * I}{30} = 7,33\mu l + 212,67\mu L \text{ de buffer de bloqueo.}$	
NOTAS:	• Agregue el anticuerpo 5 minutos antes de usarlo. • Prepararé lo justo para el montaje, ya que, esta solución no se puede usar en otro montaje.

Tritón al 0.2%

Materiales y equipos	Reactivos
Recipiente de almacenamiento de 50 ml (Falcón)	- Triton X-100 (Ref: G5516, Sigma-Aldrich) - PBS 1X $-Ca^{+2} - Mg$ (previamente preparada)
Preparación para 50ml 1. Realizar los cálculos para concentrar el tritón al 0,2% $50ml = 100\%$ $X = 0.2\%$ $= \frac{0,2 \times 50}{100} = 0,1 * 1000 = 100\mu L \text{ de tritón}$ 2. En el recipiente de almacenamiento agregue 50 ml de PBS 1 X y agregue 100μL de tritón	
NOTAS:	- Prepare la cantidad que requiera para el montaje, no se debe almacenar. - Esta solución debe prepararse para un total de 3 lavados (3 lavados de 500 μL por pozo que constan de 3 lavados cada 1).

3. Preparar una cámara húmeda en una caja con tapa (observar imagen de referencia) y colocar sobre ella un portaobjetos de microscopio envuelto en parafilms.

Fotografía de cámara húmeda	Preparación de la cámara húmeda
	Esta cámara húmeda requiere de: - Un pañuelo húmedo - Parafilm - Reciente con tapa Aquí se marca sobre el Parafilm para ubicar cada portaobjetos.

4. Agregue 42μL del anticuerpo Anti-MPO (Previamente preparado), estos microlitros se ponen sobre el Parafilm y queda en forma de gota, posteriormente, ponga el cubreobjetos de manera que las células queden en contacto con la gota previamente agregada.

NOTA: Cuando agregue los 42μL del anticuerpo Anti-MPO, ASEGÚRESE de no dejar burbujas en la gota, ya que, eso altera los resultados.

Para realizar el transporte de los cubreobjetos debe usar unas pinzas desinfectadas, debe manipular el cubreobjetos con mucho cuidado, tome el cubreobjetos SOLO del borde para evitar dañar las células.

5. Después de terminar de poner todos los cubreobjetos con el anticuerpo en la cámara húmeda se deja incubando toda la noche a 4°C

NOTA: Asegúrese que la cámara húmeda quede bien cerrada, esto con la finalidad de que NO se sequen los cubreobjetos.

6. Realice 2 lavados, el primero con PBS 1X + Tritón al 0,2%, agregando 500µL por pozo deje esta solución durante 5 minutos, posteriormente aspire con la bomba de vacío y realice un segundo lavado con PBS 1 X dejando esta solución durante 5 minutos.

NOTA: NO retire la solución del último lavado para evitar que el cubreobjetos se seque.

Durante los lavados debe preparar el anticuerpo primario: Anti-DNA/Histona H1 (Ref: Mab 3864).

Anti-DNA/Histona H1 (Ref: Mab3864).	
Materiales	Reactivos
• Tubo falcón de 15ml • Pipeta • Micropipeta • Puntas estériles	• Buffer de bloqueo (Previamente preparado) • Anti-DNA/Histona H1 (Ref: Mab3864).
Preparación para 220 µL *Tenga en cuenta que requiere de 50µL para cada cubreobjetos. 1. Se debe realizar una dilución 1:100 $I = 100$ $X = 220\mu L$ $= \frac{220 * I}{100} = 2,2\mu l + 217,8\mu L \text{ de buffer de bloqueo.}$	
NOTAS:	• Agregue el anticuerpo 5 minutos antes de usarlo. • Prepararé lo justo para el montaje, ya que, esta solución no se puede usar en otro montaje.

7. Agregue 42µL del anticuerpo Anti DNA/Histona H1 (Previamente preparado), estos microlitros se ponen sobre el Parafilm y queda en forma de gota, posteriormente, ponga el cubreobjetos de manera que las células queden en contacto con la gota previamente agregada.

NOTA: Cuando agregue los 42µL del anticuerpo DNA/Histona H1, ASEGÚRESE de no dejar burbujas en la gota, ya que, eso altera los resultados.

Para realizar el transporte de los cubreobjetos debe usar unas pinzas desinfectadas, debe manipular el cubreobjetos con mucho cuidado, tome el cubreobjetos SOLO del borde para evitar dañar las células.

8. Incube la cámara húmeda por 1h y 45min a temperatura ambiente, cubra la placa con papel aluminio para mantenerla en oscuridad.

NOTA: Durante esta incubación debe preparar el mix de anticuerpos secundarios, lea ATENTAMENTE las notas.

Mix de anticuerpos secundarios	
Materiales	Reactivos
• Tubo falcón de 15ml • Pipeta • Micropipeta • Puntas estériles	• PBS 1 X + BSA 5% (Previamente preparado) • Alexa 488 (Ref: A11001, Invitrogen) (Anti Mouse IgG) • Alexa 546 (Ref: A11010, Invitrogen) (Anti Rabbit IgG)
Preparación 4 pozos $4 * 300 = 1.200 + 100 \text{ error de pipeteo} = 1.300\mu\text{l}$ *Tenga en cuenta que requiere de 300μL por pozo. 1. Se debe realizar una dilución 1:1000 $I = 1000$ $X = 1.300\mu\text{l}$ $= \frac{1.300 * I}{1000} = 1,3 \mu\text{L Ac secundario}$ 2. Entonces la preparación es: • 1,3 μL de Alexa 488 (Ref: A1101, Invitrogen) • 1,3 μL de Alexa 546 (Ref: A11001, Invitrogen) • 997,4 μL de PBS 1X + BSA 5%	
NOTAS:	• Agregue los anticuerpos 5 minutos antes de usarlo. • Preparare lo justo para el montaje, ya que, esta solución no se puede usar en otro montaje. • La preparación debe hacerse en la oscuridad.

9. Realice 2 lavados, el primero con PBS 1X + Tritón al 0,2%, agregando 500μL por pozo deje esta solución durante 5 minutos, posteriormente aspire con la bomba de vacío y realice un segundo lavado con PBS 1 X dejando esta solución durante 5 minutos.

10. Agregue 300μL el Mix de anticuerpos secundarios por pozo e incube 1 hora a temperatura ambiente, cubra con papel aluminio (los anticuerpos secundarios son sensibles a la luz) y póngalo en shaker a 5

NOTA: Durante esta incubación prepare el Hoechst y cámaras húmedas para preservar los portaobjetos, Lea ATENTAMENTE las notas.

Hoechst 33342 (Ref: h3570, life technologies)	
Materiales	Reactivos
• Tubo falcón de 15ml • Pipeta • Micropipeta • Puntas estériles	• PBS 1 X (Previamente preparado) • Hoechst 33342 (Ref: h3570, life technologies)
Preparación 4 pozos $4 * 300 = 1.200 + 100 \text{ error de pipeteo} = 1.300\mu\text{l}$ *Tenga en cuenta que requiere de 300µL por pozo. 1. Se debe realizar una dilución 1:1000 (Hoechst: PBS1X). $I = 1000$ $X = 1.300\mu\text{l}$ $= \frac{1.300 * I}{1000} = 1,3 \mu\text{L Ac secundario}$ 2. Entonces la preparación es: • 1,3 µL de Hoechst (Ref:) • 1.298,7 µL de PBS 1X	
NOTAS:	• Prepararé lo justo para el montaje, ya que, esta solución no se puede usar en otro montaje. • La preparación debe hacerse en la oscuridad.

Fotografía de cámara húmeda	Preparación de la cámara húmeda
	Esta cámara húmeda requiere de: • Un pañuelo húmedo • Parafilm • Reciente con tapa • Láminas portaobjetos Marque las láminas con el número de muestra del cubreobjetos.
NOTAS	• Las láminas portaobjetos deben ser nuevas y desengrasadas para obtener resultados óptimos.

11. Realice 2 lavados, el primero con PBS 1X + Tritón al 0,2%, agregando 500µL por pozo deje esta solución durante 5 minutos, posteriormente aspire con la bomba de vacío y realice un segundo lavado con PBS 1 X dejando esta solución durante 5 minutos.
12. Agregue 300 µL del Hoechst (previamente preparado) a cada pozo y se incuba durante 10 minutos.
13. Posteriormente realice un lavado con 500µL de PBS 1 X y deje en reposo 5 minutos.

NOTA: NO retire el PBS 1 X y puede dejarlo en Shaker a 5

14. Colocar 12 µl de solución de glicerol 70 % (Ref: G5516, Sigma-Aldrich) en lámina de vidrio y colocar cuidadosamente un cubreobjetos boca abajo sobre el medio, procurando evitar la formación de burbujas.

NOTAS: Ordene las láminas en la cámara húmeda para transportarlas y preservarlas hasta su lectura, cubra con papel aluminio para evitar que se degrade la fluorescencia.

15. Usando un objetivo de 10x y 40× en un microscopio de fluorescencia, adquirir imágenes de diferentes áreas de cada portaobjetos para representar con precisión el efecto del estímulo.

11.6 Características sociodemográficas y clínicas de los pacientes.

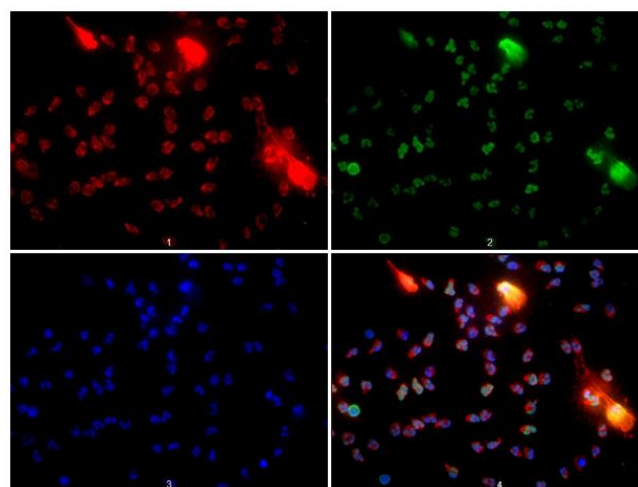
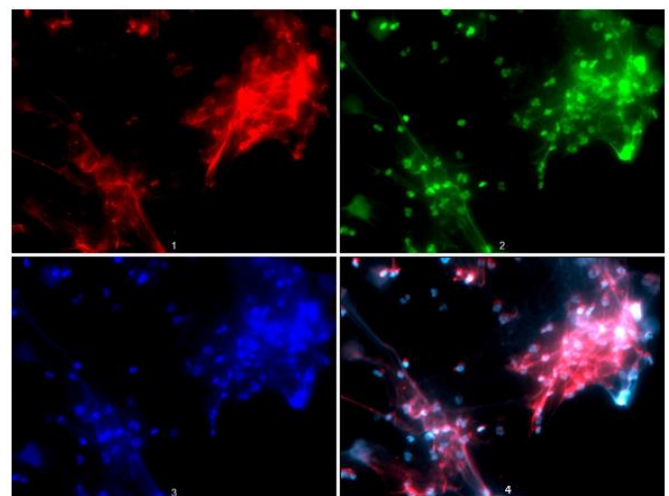
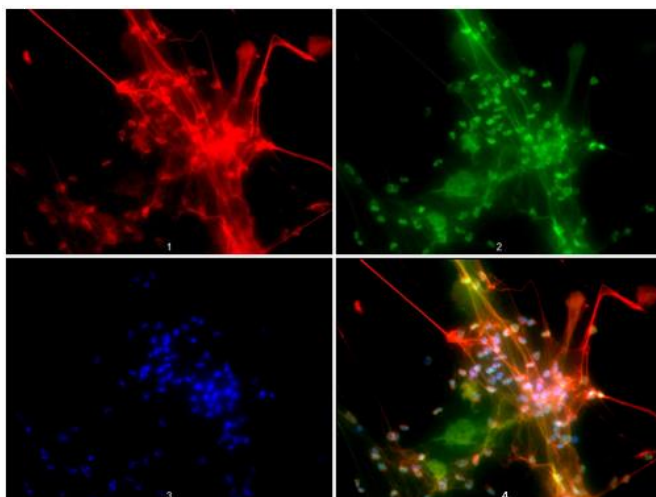
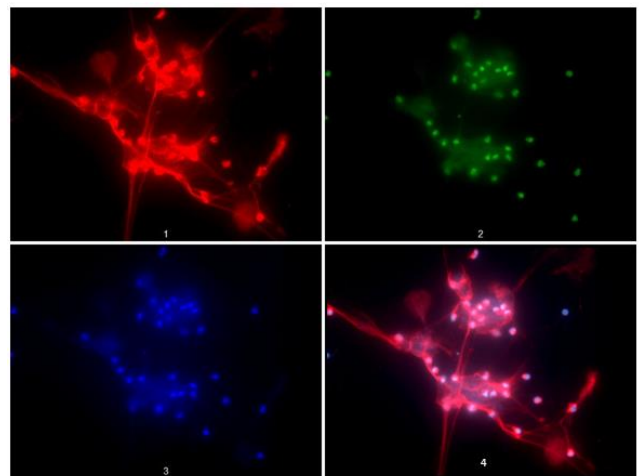
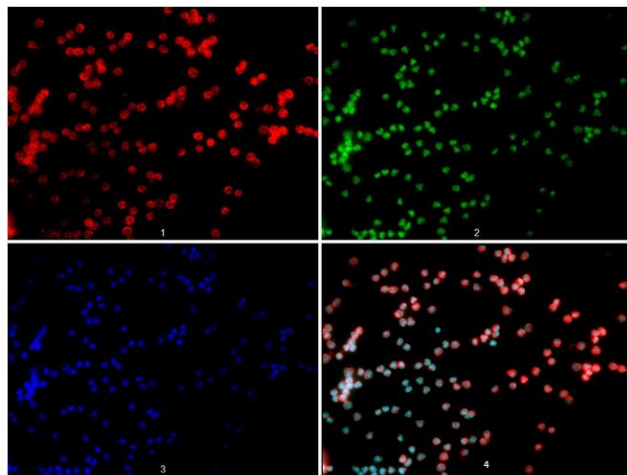
Variable	Pacientes COVID-19 Agudo / SPC(n=35)
Género	
Hembra	13 (37.1%)
Masculino	22 (62.9%)
Edad (mediana – IQR)	50 (41 - 56)
IMC (mediana – IQR)	29.05 (26.71 - 30.86)
Síntomas al ingreso (%)	
Fiebre	31 (88.6%)
Hemoptisis	3 (8.6%)
Tos seca	32 (91.4%)
Espujo para la tos	16 (45.7%)
Dolor de garganta	15 (42.9%)
Anosmia	20 (57.1%)
Disgeusia	22 (62.9%)
Rinorrea	19 (54.3%)
Sibilancia	11 (31.4%)
Dolor en el pecho	21 (60.0%)
Disnea	30 (85.7%)
Dibujo de la pared torácica inferior	1 (2.9%)
Mialgia	29 (82.9%)
Artralgias	29 (82.9%)
Fatiga y malestar general	33 (94.3%)
Incapacidad para caminar	8 (22.9%)
Jaqueca	27 (77.1%)
Dolor abdominal	8 (22.9%)

Náuseas/vómitos	19 (54.3%)
Diarrea	19 (54.3%)
Conjuntivitis	1 (2.9%)
Comorbilidades (%)	
Hipertensión	5 (14.3%)
Dislipidemia	12 (34.3%)
Asma	2 (5.7%)
Golpe	1 (2.9%)
Enfermedad péptica ácida	14 (40.0%)
Diabetes	3 (8.8%)
Obesidad	12 (34.3%)
Hipotiroidismo	4 (11.4%)
Desnutrición	2 (5.7%)
Fumador actual	1 (2.9%)
Ex fumador	15 (42.9%)
Días desde el inicio de los síntomas hasta la inclusión (Media - DE)	8.94 (2.85)
Hospitalización (%)	35 (100.0%)
Total de días de hospitalización (Media - DE)	9.86 (7.07)
Ingreso en UCI (%)	5 (17.20%)
4C Puntuación de mortalidad (Media - DE)	5.98 (2.08)
SOFA sobre la inclusión (Mediana - IQR)	2 (2–2)
PaO2-FiO2 en la inclusión (mediana - RIC)	239 (214.55 – 287.70)
Tratamiento farmacológico (%)	
Corticosteroides	28 (80.0%)
Antibióticos	35 (100.0%)
Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina	1 (2.9%)

Heparina	32 (91.4%)
ARB II	3 (8.6%)
Tiempo post-COVID (días, mediana – IQR)	217 (186 – 238)
Puntuación de Zung (mediana -IQR)	32 (28.5 – 38.5)
Puntuación COMPASS 31 (Mediana -IQR)	9 (4.5 – 14.5)
Síntomas constitucionales	10 (28.6%)
Anorexia	4 (11.4%)
Escalofríos	7 (20.0%)
Pérdida de peso	6 (17.1%)
Síntomas dermatológicos	14 (40.0%)
Exantema	11 (31.4%)
Ampollas	3 (8.6%)
Sensibilidad de la piel	4 (11.4%)
Síntomas musculoesqueléticos	26 (74.3%)
Sarcopenia	10 (28.6%)
Debilidad	14 (40.0%)
Mialgia	12 (34.3%)
Dolor de espalda	20 (57.1%)
Pesadez de brazos/piernas	19 (54.3%)
Incapacidad para caminar	5 (14.3%)
Dolor corporal	13 (37.1%)
Artralgia	26 (74.3%)
Síntomas cardíacos	14 (40.0%)
Palpitaciones	9 (25.7%)
Opresión en el pecho	12 (34.3%)
Taquicardia	9 (25.7%)
Edema	5 (14.3%)
Síntomas pulmonares	16 (45.7%)

Dolor en el pecho	9 (25.7%)
Disnea	9 (25.7%)
Tos húmeda	3 (8.6%)
Tos seca	7 (20.0%)
Pleuresía	5 (14.3%)
Rinorrea	9 (25.7%)
Síntomas gastrointestinales	11 (31.4%)
Enfermedad	7 (20.0%)
Dolor abdominal	9 (25.7%)
Síntomas neurológicos	19 (54.3%)
Parestesia	12 (34.3%)
Trastornos de atención	8 (22.9%)
Trastornos de la memoria	9 (25.7%)
Jaqueca/Cefalea	14 (40.0%)
Mareos	10 (28.6%)
Síntomas sensoriales y glandulares	15 (42.9%)
Xeroftalmia	9 (25.7%)
Xerostomía	8 (22.9%)
Pérdida de dientes	1 (2.9%)
Anosmia	7 (20.0%)
Ageusia	2 (5.7%)
Trastornos de la visión	7 (20.0%)
Dolor ocular	13 (37.1%)
Faringitis	8 (22.9%)

11.7 Fotografías de Inmunofluorescencia indirecta



11.8 Comité de ética en investigación de la universidad del Rosario.