

## **Universidad de Oviedo**

**Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias**

**Máster de Biomedicina y Oncología Molecular**

# **Efecto de los antioxidantes y la fagocitosis bacteriana sobre la apoptosis de los neutrófilos**

**Zuriñe Bonilla del Río**

**2013**

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
1.1. INMUNIDAD INNATA Y NEUTRÓFILOS	2
1.2. FAGOCITOSIS DEL NEUTRÓFILO	4
1.3. APOPTOSIS DEL NEUTRÓFILO	6
<b>1.3.1. Características generales</b>	<b>6</b>
<b>1.3.2. Regulación</b>	<b>7</b>
1.3.2.1. Cascada de caspasas	7
1.3.2.2. Vía de señalización de la mitocondria	7
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>13</b>
3.1. PURIFICACIÓN DE NEUTRÓFILOS	13
3.2. INCUBACIÓN DE NEUTRÓFILOS CON ANTIOXIDANTE	14
3.3. CULTIVO DE BACTERIAS	14
3.4. OPSONIZACIÓN DE BACTERIAS	14
3.5. CULTIVO DE NEUTRÓFILOS CON BACTERIAS	14
3.6. CITOMETRÍA	15
3.7. EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL	16
3.8. ANÁLISIS DEL RNA	16
3.9. SÍNTESIS DE cDNA A PARTIR DE RNA TOTAL	18
3.10. PCR CUANTITATIVA	19
3.11. PROGRAMAS ESTADÍSTICOS	19
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>20</b>
4.1. APOPTOSIS DE LOS NEUTRÓFILOS TRAS LA FAGOCITOSIS DE BACTERIAS Y EFECTO DEL DPI	20
4.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN NEUTRÓFILOS	
4.3. INDUCIDA POR BACTERIAS Y EFECTO DEL DPI	23

<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>27</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>32</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>33</b>

## RESUMEN

La fagocitosis bacteriana por los neutrófilos retrasa la apoptosis de los mismos cuando la relación bacteria/neutrófilo es baja, y la acelera cuando dicha relación es alta. Las bacterias también inducen en los neutrófilos la producción de sustancias reactivas de oxígeno que incrementarían su apoptosis, y de citoquinas que podrían retrasarla. El antioxidante DPI (difeniliodonio), inhibidor específico de la NADPH oxidasa de los neutrófilos, podría modificar la apoptosis de los neutrófilos y la secreción de citoquinas después de la fagocitosis. Neutrófilos de controles sanos se incubaron durante 18 h a 37°C en suero autólogo con *S. aureus* (SA), *E. coli* (EC) (bacteria/PMN, 1/1), con/sin antioxidante (DPI 10 µM) durante 1 h. La apoptosis se midió con doble tinción anexina V-FITC/yoduro de propidio y citometría de flujo, y la expresión de genes por microarrays. La incubación de los neutrófilos con SA o EC en una relación 1:1 retrasa la apoptosis de los neutrófilos. La expresión de los genes *Bcl-2*, *Mcl-1*, *IL-6*, *TNF-α* aumentó y la expresión de los genes *caspasa-8* y *caspasa-3* disminuyó en los PMNs después de la fagocitosis. El DPI causa la reversión de la respuesta a la fagocitosis.

## SUMMARY

Low ratio bacteria/neutrophil phagocytosis delay neutrophil (PMN) apoptosis “in vitro” while high ratios accelerate it. Bacteria also induce PMN production of reactive oxygen species (ROS), that increases their apoptosis, and cytokines secretion that could delay it. Antioxidant, blocking NADPH oxidase (diphenyleneiodonium chloride, DPI) might modify PMN apoptosis and cytokines secretion after phagocytosis. Healthy donors PMN ( $5 \times 10^6$ ) were incubated for 18h at 37°C in autologous serum with *S. aureus* (SA), *E. coli* (EC) (bacteria/PMN ratio 1/1), with/out antioxidant (DPI 10 µM) for 1 h. Apoptosis was measured by annexin V/propidium iodide double staining, and cytometry, gene expression by microarrays. Low ratio SA or EC /PMN incubation delay PMN apoptosis, which was reverted with DPI. Gene expression of *Bcl-2*, *Mcl-1*, *IL-6*, *TNF-α* was up regulated and gene expression of *caspasa-8* and *caspasa-3* was down regulated in PMN after bacterial incubation and was blocked by DPI.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. INMUNIDAD INNATA Y NEUTRÓFILOS

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa contra numerosos microorganismos comunes y es esencial para el control de las infecciones bacterianas. Los componentes de la inmunidad innata están siempre presentes y dispuestos para actuar inmediatamente sin requerir tiempo de latencia para el desencadenamiento de las acciones defensivas. Los mecanismos de defensa son activados rápidamente por los microorganismos, llevando a cabo respuestas estereotipadas. Aunque dicha inmunidad no es específica de antígeno, sí que es capaz de diferenciar patrones de estructuras microbianas conservadas o pertenecientes a grandes grupos de microorganismos, denominados PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*), activando así diferentes mecanismos de activación intracelular, que van a condicionar u orientar la respuesta inmunitaria adaptativa.

La inmunidad innata está constituida, entre otros, por lo siguientes componentes:

- Barreras epiteliales, que delimitan la superficie interna y externa del cuerpo.
- Inmunidad innata natural celular: fagocitos (monocitos-macrófagos y neutrófilos) y células agresoras naturales (células *Natural Killer* o *NK*), que son capaces de capturar e ingerir microorganismos e inducir las siguientes fases de la respuesta inmunitaria.
- Inmunidad innata humoral: lisozima, complemento e interferones.

Los neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares (PMN) son los componentes más abundantes del sistema inmune celular y juegan un papel fundamental contra los patógenos invasores en la inmunidad innata. Son reclutados rápidamente a los sitios de infección y participan en la iniciación y progresión de la respuesta inflamatoria. Los neutrófilos son células altamente especializadas que se generan en la médula ósea a partir de células hematopoyéticas pluripotenciales en una proporción de alrededor de 7 millones por minuto. Se caracterizan por tener un diámetro de 10-20  $\mu\text{m}$ , un núcleo segmentado con 2-5 lóbulos interconectados y un citoplasma granular con multitud de sustancias antimicrobianas. Los neutrófilos maduros son células terminalmente diferenciadas que, en circulación, tienen la vida media más corta entre

los leucocitos. Generalmente, se delimita entre 8 y 20 h, aunque los últimos datos de estudios *in vivo*, sugieren una vida media de 5,4 días bajo condiciones fisiológicas en humanos (Pillay y col., 2010; Tak y col., 2013).

Durante la respuesta inflamatoria, los leucocitos pueden interactuar con el endotelio vascular, debido a la inducción de moléculas de adhesión en las células endoteliales y los cambios inducidos en las moléculas de adhesión leucocitarias, lo que permite el reclutamiento de un número elevado de leucocitos, inicialmente neutrófilos y posteriormente macrófagos, que atraviesan el endotelio y van hacia el tejido infectado. Los neutrófilos son capaces de reconocer constituyentes microbianos: lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, lipoproteínas, DNA, glicolípidos, fragmentos de pared celular, que en conjunto reciben el nombre de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), y los receptores a los cuales se asocian se denominan receptores de reconocimiento de patrones (PRR), de los que forman parte los receptores Toll (TLR) (Medzhitov, 2007; Ishii y col., 2008). Se han descrito 10 de estos receptores los cuales se han especializado en el reconocimiento de diferentes PAMPs. En el neutrófilo se expresan tres de ellos; TLR-1 y TLR-2 que reconocen peptidoglicanos de bacterias Gram positivas, y TLR-4 específico para lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas. Una vez reconocidos los microorganismos por los neutrófilos, los internalizan mediante un proceso denominado fagocitosis. A continuación, se produce la destrucción de tales microorganismos a través de sustancias reactivas de oxígeno (ROS), proteasas y proteínas o péptidos antimicrobianos de los gránulos. Este proceso es muy rápido ya que los gránulos no son sintetizados *de novo* durante la infección, sino que el neutrófilo los sintetiza durante su diferenciación y se almacenan hasta ser usados. Los neutrófilos activados también pueden reclutar otras células como linfocitos T, macrófagos o más neutrófilos mediante la síntesis y liberación de citoquinas y quimiocinas (Theilgaard-Mönch y col., 2006).

Estos mecanismos de defensa que destruyen a los patógenos, también son capaces de causar daño en el tejido circundante prolongando la inflamación. El daño tisular producido a pequeña escala es beneficioso, pues produce el desensamblaje de las fibras de colágeno y permite un mejor contacto neutrófilo-bacteria.

Una vez que los patógenos se eliminan, los neutrófilos mueren por apoptosis constitutiva (o espontánea), proceso que evita la diseminación de los productos tóxicos al exterior. Este mecanismo es esencial para mantener el equilibrio de la homeostasis celular en condiciones fisiológicas. Cuando el daño producido por el neutrófilo es excesivo, éste tiene la capacidad de frenar su propia actividad (papel antiinflamatorio), ya que puede controlar que no lleguen más neutrófilos al foco inflamatorio, regular su propia muerte por apoptosis y su posterior fagocitosis por los macrófagos que van llegando al foco inflamatorio, controlando así la inflamación (Nathan, 2006). La apoptosis de los neutrófilos conduce a la expresión de las señales “eat-me”, mediante las cuales pueden ser reconocidos y eliminados por los macrófagos en el bazo y en la médula ósea y por las células Kupffer en el hígado (El Kebir y Filep, 2013). Un control preciso de la apoptosis del neutrófilo proporciona un equilibrio entre sus funciones de defensa y seguridad, mientras que una alteración en la regulación de la apoptosis puede contribuir a un amplio rango de patologías inflamatorias.

Por otra parte, la fagocitosis del neutrófilo llevada a cabo por el macrófago desencadena un proceso de regeneración tisular mediante la síntesis de lipoxinas y citoquinas reparadoras como el TGF- $\beta$  (Serhan y Savill, 2005).

## 1.2. FAGOCITOSIS DEL NEUTRÓFILO

La función predominante de los neutrófilos es la fagocitosis y la destrucción de los patógenos. Durante la respuesta inflamatoria, primeramente, se da un aumento rápido de la cantidad de neutrófilos (<1 h), además de cambios funcionales en ellos, tales como el montaje parcial de la NADPH oxidasa, la movilización de los gránulos intracelulares que contienen receptores preformados para la membrana plasmática, y los cambios en el nivel de expresión y/o afinidad de moléculas de adhesión como las integrinas (Segal, 2005). Una variedad de agentes, tales como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, GM-CSF e IL-8, puede inducir el aumento de neutrófilos *in vitro* y todos éstos inducen un fenotipo que resulta de estos reordenamientos moleculares a corto plazo.

Los neutrófilos se activan por estímulos inflamatorios para secretar especies reactivas de oxígeno (ROS), por el complejo NADH oxidasa, y proteasas, que pueden dañar el tejido del

huésped si se liberan inadecuadamente. Los principales productos ROS,  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , pueden reaccionar con otros iones para generar compuestos tóxicos y contribuir a la destrucción bacteriana por los PMN (Meley y col., 2005). Además, los neutrófilos conducen la inflamación a través de la secreción de las moléculas inflamatorias tales como citoquinas, quimiocinas y leucotrienos (Kobayashi y col., 2003). Productos de secreción de neutrófilos tales como la mieloperoxidasa, elastasa, gelatinasa, la interleuquina-8 y leucotrieno  $B_4$  se encuentran en altas concentraciones en los sitios de inflamación (Wright y col., 2013). Los neutrófilos, se ha demostrado que son críticos para el inicio y la progresión de la inflamación.

Los neutrófilos contienen un gran número de proteínas antibióticas que se almacenan en gránulos (Borregaard, 2010):

- Los gránulos primarios (azurófilos), son escasos en los estadios maduros. Son lisosomas que contienen hidrolasas ácidas, mieloperoxidasa y muramidasa (lisozima). También contienen las proteínas antibióticas: defensinas, seprocidinas, catelicidinas y proteína inductora de la permeabilidad bacteriana (BPI).
- Los gránulos secundarios (específicos de los neutrófilos), son los más numerosos en los neutrófilos maduros, contienen lactoferrina, lisozima, colagenasa, fosfatasa alcalina y proteínas enlazantes B12 y NGAL.

Los lisosomas (gránulos primarios) que contienen las proteínas antibióticas se fusionan con las vacuolas, que contienen los microbios ingeridos (llamadas fagosomas) para convertirse en fagolisosomas, en donde tiene lugar la destrucción.

Por lo tanto, los microbios fagocitados mueren por efecto de péptidos como catelicidinas y defensinas, así como por acción de proteasas (elastasa, catepsina G, Proteinasa 3) o por especies reactivas del oxígeno generadas durante la respiración oxidativa.

Sin embargo, en los últimos años se ha descrito un nuevo mecanismo antimicrobiano de los neutrófilos que después de activación, liberan DNA y una parte de su contenido granular formando NETs (neutrophil extracellular trap). Estas estructuras de cromatina extracelulares, que contienen histonas y proteínas de los gránulos de los neutrófilos pueden atrapar y matar un amplio espectro de microbios, incluyendo bacterias Gram positivas y negativas, así como



protozoos y virus. El análisis cuantitativo de la eficacia en muerte celular *in vitro* muestra que el mecanismo NET y la fagocitosis tienen eficacia bactericida similar. La fagocitosis es más rápida, pero depende de la viabilidad celular, mientras que las NETs prolongan las propiedades antimicrobianas de los neutrófilos más allá de su vida útil. Además, se ha visto que la función de la NADPH oxidasa es crucial para la formación de NETs (Kirchner y col., 2012).

### 1.3. APOPTOSIS DEL NEUTRÓFILO

#### 1.3.1. Características generales

Para una correcta respuesta inmune se debe mantener la homeostasis de la población de neutrófilos, que es considerada el balance entre la producción de neutrófilos y su muerte celular. Los neutrófilos circulantes tienen una vida media corta de 8 a 20 horas (aunque puede prolongarse o acortarse en presencia de factores infecciosos o inflamatorios). Una vez pasado este tiempo entran en un proceso de muerte celular programada (apoptosis). En un individuo adulto se producen aproximadamente alrededor de  $10^{11}$  neutrófilos cada día (Simon, 2003) y otros tantos se mueren por apoptosis espontánea, de manera que se mantiene el número de neutrófilos constante bajo condiciones fisiológicas. Los neutrófilos apoptóticos son retirados de la circulación por los macrófagos, evitándose el daño tisular por liberación del contenido citotóxico de los gránulos y las sustancias reactivas de oxígeno. El comienzo del proceso de muerte celular programada está asociado con algunas funciones importantes, tales como adhesión y fagocitosis, que eventualmente llevan a la resolución de la inflamación.

Durante la apoptosis, los neutrófilos pierden sus propiedades funcionales y muestran una serie de eventos secuenciales, que se evidencian bioquímicamente por la traslocación de las fosfatidilserinas desde la membrana interna a la externa de la bicapa lipídica que conforma la membrana celular, para el reconocimiento por parte de los macrófagos; condensación del DNA genómico, que posteriormente es fragmentado por acción de endonucleasas activadas formando lo que se conoce como cuerpos apoptóticos; activación de la cascada de las caspasas y la vías de señalización propias de la mitocondria, y por la pérdida de la capacidad de degranulación y de producción de sustancias oxidantes (Akgul y col., 2001;

Akgul y Edwards SW, 2003)

### **1.3.2. Regulación**

#### 1.3.2.1. Cascada de caspasas

Las caspasas están presentes en forma inactiva (procaspasas) en el citosol de la mayoría de las células y se activan por proteólisis. Unas caspasas pueden activar a otras en cascada. Las caspasas implicadas en la apoptosis se pueden clasificar en dos grupos: iniciadoras y efectoras.

1. Las caspasas iniciadoras, tales como la caspasa-8 o -9, se sintetizan como zimógenos de cadena única con grandes pro-dominios que, después de una señal apoptótica, se dirigen a proteínas de andamiaje (FADD/Mort1 específicas para la caspasa-8 y Apaf-1 para la caspasa-9), donde se produce su activación.
2. Las efectoras o ejecutoras, caspasas-3, -6 y -7, realizan casi toda la proteólisis celular y activan CAD (caspase-activated DNase), se sintetizan también como zimógenos de cadena única (pro-formas catalíticamente inactivas), en este caso, con pro-dominios cortos (Riedl y Salvesen, 2007; Strasser y col., 2011).

La disponibilidad de citocromo c en el citosol resulta fundamental para la activación de las caspasas efectoras mediante la formación del apoptosoma (complejo formado por proteínas de la familia Bcl-2, implicadas en la vía de señalización de la mitocondria) (Tait y Green, 2010).

#### 1.3.2.2. Vía de señalización de la mitocondria

Determinas proteínas asociadas a la mitocondria pueden regular el proceso apoptótico. La familia de proteínas Bcl-2 es la principal reguladora de este proceso, ya que integra diversas señales procedentes tanto del exterior como del interior celular (Adams y Cory, 2007; Chipuk y col., 2010)

Todos los miembros de esta familia se caracterizan por poseer de uno a cuatro motivos conservados (motivos de homología de Bcl-2: BH1, BH2, BH3 y BH4).

La familia se subdivide en dos clases:

1. Las proteínas pro-apoptóticas, divididas, a su vez, en dos subfamilias basándose en el número de dominios BH que contienen, así tenemos:
  - a. La subfamilia de Bax (posee los dominios BH1, BH2 y BH3), integrada por Bad, Bax y Bak.
  - b. La subfamilia “BH3 only” (posee, únicamente, el dominio de homología BH3), que engloba a Bid y Bim. Éstas son bastante estables y actúan a nivel de la mitocondria haciendo que se liberen factores apoptóticos.
2. Las proteínas anti-apoptóticas, que corresponden a la subfamilia Bcl-2, como Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1 o A1, ante determinados estímulos pueden aumentar su expresión retardando la apoptosis del neutrófilo, mediante la formación de dímeros con las proteínas de la subfamilia Bax e impidiendo su acción proapoptótica.

En condiciones normales en las que el neutrófilo va a desembocar en un proceso apoptótico, Bax, sólo o formando oligómeros con Bak, se inserta en la membrana externa mitocondrial, formando un megacanal que provoca la salida al exterior de citocromo c y la proteína Smac.

El citocromo c se une a una proteína adaptadora denominada Apaf-1, dándose un cambio estructural que conduce a la interacción de Apaf-1 con la procaspasa-9, que queda activada en forma de caspasa-9. El conjunto de las tres proteínas se denomina apoptosoma. Éste procesará la procaspasa-3 dando lugar a la caspasa-3 activa que será la efectora final del proceso apoptótico activando entre otras a la proteína Cad que producirá cortes en el DNA o a la gelsolina que rompe proteínas del citoesqueleto (Wolf y Green, 1999). La salida al citosol de la proteína Smac bloquea las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs).

La activación de Bax se debe a la interacción en la membrana mitocondrial con una forma activa y truncada de Bid, denominada tBid, procesada a su vez por la caspasa-8 y que colabora en la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c debido a su capacidad de unión a la cardiolipina de la membrana mitocondrial externa. En estas mismas condiciones, Bad y Bim se encuentran bloqueando a las proteínas antiapoptóticas Bcl-X<sub>L</sub>, A1 y Mcl-1.

Cuando el neutrófilo recibe alguna señal de supervivencia, se produce la fosforilación de Bad, catalizada por PI3-Kinasa, que deja de bloquear a las proteínas anti-apoptóticas, y se dimerizan con Bax y Bak, impidiendo su acción pro-ápoptótica. De la misma manera, Bax es fosforilado, también, por PI3-Kinasa, perdiendo su capacidad de insertarse en la mitocondria ya que permanece unido a las proteínas anti-apoptóticas. Por otro lado, A1 tiene la capacidad de unirse a tBid bloqueando su acción e impidiendo que a su vez active a Bax.

Además de estabilizar la membrana mitocondrial para impedir la liberación del citocromo c, Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> también actúa en el citoplasma inhibiendo la activación de la caspasa-9. Se ha visto que Bcl-w desarrolla un efecto anti-apoptótico secuestrando el factor activador de las proteasas pro-apoptóticas (Apaf-1), estabilizando la membrana mitocondrial u oponiéndose a la apertura del megacanal mitocondrial. La vía de la mitocondria, también, puede inducirse después de la activación de los receptores de muerte (Fas).

El enlace entre estas vías es la proteína Bid, que es inactiva en el citosol pero puede volverse activa por mediación de la caspasa-8.

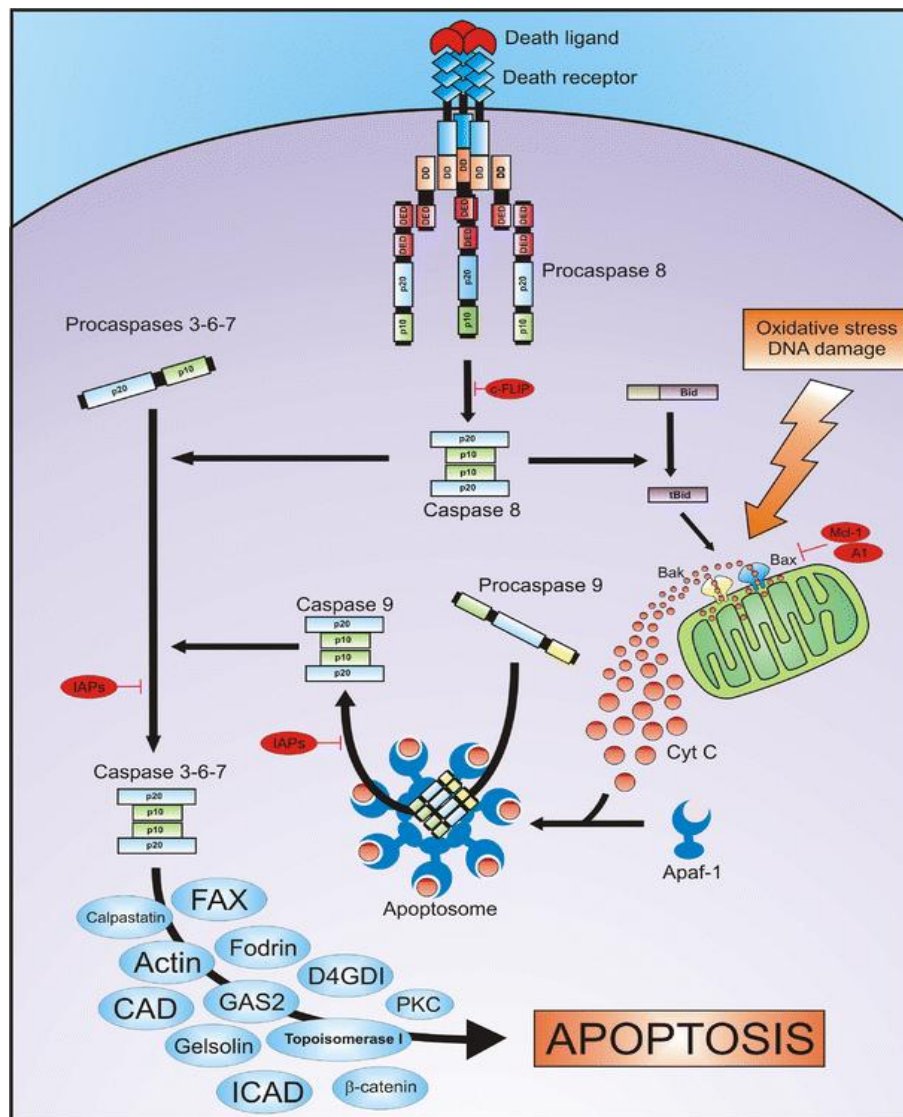


Figura 1. Esquema del proceso de apoptosis celular (Gabelloni y col., 2013).

En conclusión, después de fagocitar la bacteria puede ocurrir que el neutrófilo acabe con la bacteria, éste muera por apoptosis y sea retirado posteriormente de la circulación por los macrófagos, lo que resulta en la resolución de la inflamación y por tanto es beneficioso para el organismo. Aunque también se ha visto que algunas bacterias tienen la capacidad de retrasar la apoptosis del neutrófilo, sobreviviendo y multiplicándose en su interior, con lo cual aparte de la diseminación del patógeno y la infección, se produce una mayor inflamación como consecuencia de una liberación excesiva de los productos tóxicos del neutrófilo que dañan los tejidos del entorno. En determinadas circunstancias el neutrófilo infectado puede morir por necrosis con el consiguiente daño tisular (DeLeo, 2004).

Algunas enfermedades proinflamatorias están relacionadas con un retraso de la apoptosis de los neutrófilos como son el síndrome sistémico de respuesta inflamatoria (SIRS) (Jiménez y col., 1997), el síndrome de distress respiratorio agudo (SDRA) (Matute-Bello y col., 1997) o la lesión isquemia-reperfusión (Hernández y col., 1987). Además en la sepsis se puede usar el retraso de la apoptosis de los neutrófilos como marcador de la gravedad de la infección (Sayeed, 2004). Así pues, la apoptosis es un mecanismo esencial para la regulación de la homeostasis de los neutrófilos y la inflamación. La alteración de la apoptosis de los neutrófilos tendría un efecto profundo en la respuesta inflamatoria y en la resolución de la inflamación.

ROS tienen un efecto contradictorio sobre la apoptosis de los PMN inducida por la fagocitosis bacteriana. Puede ser acelerada o retardada y esta modificación en el efecto apoptótico podría depender del ratio PMN/bacteria y podría ser bloqueada por antioxidantes (Watson y col., 1996; Ocaña y col., 2008).

Sin embargo algunos autores sugieren que el efecto de la fagocitosis de *Staphylococcus aureus* en la apoptosis de los PMN es independiente de ROS porque se ha observado en pacientes con una enfermedad granulomatosa crónica y no fue modificada por antioxidantes (Yamamoto y col., 2002).

## 2. OBJETIVOS

El estudio de la implicación de ROS en el efecto que la fagocitosis bacteriana provoca en la apoptosis de los neutrófilos y en la secreción de citoquinas ha llevado a resultados contradictorios.

Los objetivos de este trabajo son:

1. Estudiar *in vitro* el papel de ROS en la apoptosis temprana de los PMN inducida por la fagocitosis de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Escherichia coli* (*E. coli*).
2. Analizar la expresión de los genes de PMN implicados en la ruta de apoptosis de los neutrófilos inducida por la fagocitosis de *S. aureus* y *E. coli*.
3. Analizar la expresión de los genes de citoquinas de PMN inducida por la fagocitosis de *S. aureus* y *E. coli*.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. PURIFICACIÓN DE NEUTRÓFILOS**

A partir de 10 mL de sangre periférica de personas sanas, extraída en tubos Vacutainer con EDTA K3 (Vacuette, Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Austria) para evitar su coagulación, se purificaron los neutrófilos de la siguiente manera:

a) Se mezcló la sangre con un volumen igual de dextrano (Sigma, St Louis, Mo, USA) al 3% en NaCl al 0,9% previamente filtrado a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Billerica, MA, USA).

Se dejó sedimentar por gravedad durante 20 minutos a temperatura ambiente en posición vertical hasta la aparición de dos fases diferenciadas. Se recogió la fase superior enriquecida en leucocitos y se desechó la fase inferior con mayoría de eritrocitos.

b) La fase enriquecida en leucocitos se centrifugó a 250 xg durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante (plasma) y el sedimento se resuspendió en un volumen de NaCl al 0,9% o RPMI (Sigma, St Louis, Mo, USA) igual al volumen de sangre inicial.

c) Se añadieron 2,5 mL de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep TM, Axis-Shield Poc AS, Oslo, Norway) para realizar una centrifugación en gradiente a 400 xg durante 40 minutos y parada sin freno. De esta manera se eliminaron monocitos y otros leucocitos en el sobrenadante, enriqueciéndose el sedimento en neutrófilos.

d) El sedimento conteniendo neutrófilos y eritrocitos contaminantes se resuspendió en 2,5 mL de medio hipotónico (NaCl al 0,2%) durante 30 segundos y se restituyó la isotonicidad añadiendo 2,5 mL de medio hipertónico (NaCl al 1,6%). Posteriormente se centrifugó 6 minutos a 250 xg y se eliminó el sobrenadante con los restos de las membranas de los eritrocitos lisados.

e) Finalmente, el sedimento enriquecido en neutrófilos se resuspendió en medio RPMI-20% Suero Humano Autólogo (AHS) y se midió la concentración de neutrófilos mediante la observación al microscopio óptico de una pequeña muestra sobre la cámara de Neubauer y con ayuda de Trypan Blue 0,4%, un colorante que permite una mejor visualización de las células para el conteo. Se cuantificaron aproximadamente  $6 \times 10^6$  PMN/mL.



### 3.2. INCUBACIÓN DE NEUTRÓFILOS CON ANTIOXIDANTE

El antioxidante empleado fue DPI (difenileniodonio) (DPI, Sigma, ST Louis, MO, USA) que es un inhibidor específico del enzima NADPH oxidasa de los neutrófilos.

12 x 10<sup>6</sup> neutrófilos resuspendidos en 2 mL del medio RPMI-20% Suero Autólogo Humano se incubaron con 4 µL de DPI 5 mM durante 1 hora a 37°C.

### 3.3. CULTIVO DE BACTERIAS

Se usaron las bacterias *S. aureus* y *E. coli* ambas procedentes de aislados clínicos. Se cultivaron en caldo de soja tripticasa (Tripticase soy broth, TSB, Difco Laboratories, Augsburg, Alemania) a 37°C durante 12 horas y se ajustaron a una concentración de 9×10<sup>8</sup> CFU/mL en medio TSB midiendo la absorbancia a 600nm en un biofotómetro (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

### 3.4. OPSONIZACIÓN DE BACTERIAS

Las bacterias se opsonizaron durante 30 minutos a 37°C en suero autólogo humano (AHS) al 5% en medio RPMI justo antes de ser añadidas a los neutrófilos. Para ello, se prepararon 3,6 mL de medio RPMI al 5% de AHS y se añadieron 440 µL de las bacterias ajustadas previamente a 9×10<sup>8</sup> bacterias/mL, con lo que quedó aproximadamente una concentración de 1×10<sup>8</sup> bacterias/mL.

### 3.5. CULTIVO DE NEUTRÓFILOS CON BACTERIAS

Unos 12 x 10<sup>6</sup> neutrófilos resuspendidos en 2 mL de RPMI-20% AHS ± DPI 10 µM se infectaron con *S.aureus* o *E. coli* previamente opsonizadas, en una proporción 1bacteria/1PMN y se dejaron incubando 30 minutos a 37°C para permitir la fagocitosis.

A continuación, se centrifugaron a 800 xg durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante con las bacterias no fagocitadas y se resuspendieron los neutrófilos de nuevo en 1000 µL de

RPMI-20% AHS, volviéndose a añadir DPI 10  $\mu\text{M}$  a las muestras correspondientes. Se continuó la incubación durante 18 horas a 37°C.

Posteriormente, las muestras se alicuotaron para el estudio de apoptosis por citometría y para la extracción del RNA. Las destinadas a la extracción del RNA fueron centrifugadas a 800 xg durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y la células se resuspendieron en 1 mL de PBS.

### 3.6. CITOMETRÍA

La determinación de la apoptosis de los neutrófilos se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Se realizó una tinción doble:

Tinción con yoduro de propidio (IP): el yoduro de propidio es un fluoróforo que se une a los ácidos nucleicos y que emite luz a 630 nm cuando se excita a 488 nm. El yoduro de propidio se utiliza como marcador de las fases tardías de apoptosis/necrosis porque es capaz de atravesar las membranas de las células en condiciones propias de esas etapas e interactuar con el DNA nuclear.

Tinción con anexinaV - FITC: la pérdida de asimetría de la membrana plasmática es uno de los primeros procesos que tiene lugar en las células que sufren apoptosis. La fosfatidilserina se transloca de la cara interna a la cara externa de la membrana. La anexina V en presencia de iones calcio tiene una alta afinidad por la fosfatidilserina, de manera que, conjugada con FITC (fluoróforo), se une a las células apoptóticas y con una excitación lumínica de 450 nm emite fluorescencia verde.

La tinción doble con anexinaV - FITC y yoduro de propidio permite diferenciar las células en una fase de apoptosis temprana, que fija anexina V y excluye el IP, y apoptosis tardía que capta tanto la anexina V como el IP.

Después de incubar los neutrófilos durante 18 horas a 37°C, se separaron  $1.2 \times 10^6$  PMN en 200  $\mu\text{L}$  de medio, se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 xg y se resuspendieron en tampón de unión (10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4; NaCl 140 mM,  $\text{CaCl}_2$  25 mM) al que se le añadieron 2  $\mu\text{L}$  de anexina V - FITC (Sigma, 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y 2.5 mL de yoduro de propidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). La suspensión se incubó 10 minutos en oscuridad y se analizó la fluorescencia de las

células individuales en un citómetro de flujo (Cytomics FC500, Beckman, Miami, FL, USA). La fluorescencia media se determinó para un mínimo de  $10^4$  células en una región correspondiente a neutrófilos no fragmentados empleando el software Cytomics RXP (Beckman, Miami, FL, USA).

### 3.7. EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL

Para la extracción del RNA a partir de neutrófilos humanos de sangre periférica, se utilizó el sistema de purificación en columna E.Z.N.A. Total RNA Kit (OMEGA bio-tek), obteniéndose un RNA libre de contaminación de DNA genómico.

- a)  $10^7$  células se lisaron con 700  $\mu$ L TRK Lysis Buffer conteniendo  $\beta$ -mercaptoetanol 0,28 M.
- b) Una vez homogeneizada la muestra se añadieron 700  $\mu$ L de Etanol al 70%.
- c) Se aplicó la muestra sobre la columna HiBind® RNA (una columna en cuya matriz se adhiere sobretodo RNA) y se centrifugó a 10000 xg durante 1 minuto. Se eliminó el eluido.
- d) Se añadieron 500  $\mu$ L Wash Buffer I y se centrifugó 1 minuto a 10000 xg, eliminándose el eluido.
- e) Se añadieron 500  $\mu$ L de Wash Buffer II y se centrifugó durante 3 minutos a la misma velocidad, eliminándose el eluido.
- f) Se transfirió la columna a un tubo eppendorf. Se añadieron 40  $\mu$ L de dietilpircarbonato (DEPC) 0,1% (inhibidor de RNasas) y se centrifugó 1 minuto a 10000 xg. El eluido rico en RNA fue conservado en el congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 3.8. ANÁLISIS DEL RNA

El RNA se analizó electroforéticamente en el bioanalizador Agilent 2100 que emplea la tecnología de microfluidos Lab-on-a-Chip. Los chips consisten en redes de finos canales y pequeñas celdas, construidas en bases de vidrio o polímero, a través de los cuales se mueven de forma estrictamente controlada volúmenes de pico litro por presión o por fuerzas electromagnéticas.

Se pueden analizar hasta doce muestras en 30 minutos, con un mínimo consumo de muestra (1µL de 25-500 ng/µL de RNA total). Permite estimar concentraciones de RNA total. Los reactivos y chips están libres de RNasa para prevenir la degradación durante el análisis. El kit utilizado en este caso es el Agilent RNA 6000 Nano kit y el software el 2100 Expert.

La combinación de los chips de RNA y el software permite determinar con gran fiabilidad tanto la cantidad como la integridad del RNA total. Dada la rapidez, sensibilidad y precisión de los resultados, el Bioanalizador 2100 de Agilent se ha convertido en requerimiento esencial para determinar la calidad de las muestras de RNA previamente al experimento de microarrays de expresión génica, dada su mayor fiabilidad frente a los geles de agarosa o poliacrilamida.

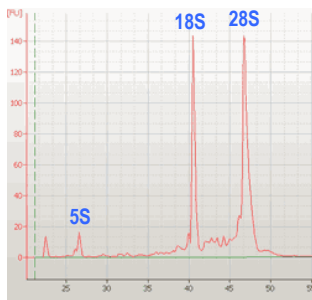


Figura 1: Electroferograma obtenido para una muestra de RNA total tras su migración en el Bioanalizador 2100 en combinación con un RNA 6000 Nano LabChip.

El software calcula la concentración del RNA, y dos parámetros numéricos que indican la integridad del RNA: la relación entre los RNA ribosómicos 28S y 18S (28S/18S), y el número RIN (RNA Integrity number). El parámetro RIN fue introducido por Agilent Technologies con el fin de estandarizar el proceso de interpretación de la integridad del RNA y eliminar el sesgo asociado a la interpretación individual. El algoritmo del RIN permite la clasificación de las muestras de RNA eucariótico total en base a un sistema numérico de 1 a 10, siendo 1 el valor para una muestra de RNA totalmente degradada y 10 el valor obtenido para un muestra intacta. Este sistema permite comparar cuantitativamente la integridad de todas las muestras de RNA del experimento, ya que para que los resultados de microarrays sean comparables todas las muestras deben tener una calidad similar. Por otro lado, permite analizar el grado de contaminación de DNA genómico de las muestras de RNA.

### 3.9. SÍNTESIS DE cDNA A PARTIR DE RNA TOTAL

Todas las muestras deben tener la misma concentración de RNA, para ello se centrifugaron con la centrífuga acoplada a vacío (“speed vac”) (Concentrator plus, eppendorf) a 45°C durante 30 minutos para eliminar el sobrenadante. A la muestra con menor concentración se la añadieron 10 µL de agua, puesto que son los requeridos para el paso a cDNA, y al resto de muestras se añadieron los µL de agua necesarios a cada una de ellas para obtener una misma concentración.

Para obtener el cDNA se utilizó el kit de síntesis de cDNA: High-capacity cDNA Reverse Transcription kit, de Applied Biosystems (Cat # 4368814).

Por cada muestra se añade:

- 2.0 µL 10x RT Buffer
- 0.8 µL 25x dNTP Mix (100 mM)
- 2.0 µL 10x RT Random Primers
- 1.0 µL MultiScribe Reverse Transcriptasa™
- 4.2 µL Nuclease-free H<sub>2</sub>O

En tubos de 0,5 mL, se pipetearon 10 µL de este máster mix y otros 10 µL de la muestra de RNA correspondiente y se procesaron en el termociclador (PCR Veriti, Applied Biosystems / Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems) según los pasos siguientes:

Tabla 1: Ciclo de PCR.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tiempo (min)	10	120	0,05	∞

### 3.10. PCR CUANTITATIVA

Para llevar a cabo la PCR se utilizó TaqMAN Gene Expression Master Mix. La placa de PCR constaba de 96 pocillos, en la que se medía la expresión de 16 genes por muestra (un total de 6 muestras). Los genes estudiados fueron: *Bad*, *Bak1*, *Bax*, *Bcl-2*, *Bcl-2L1*, *Bid*, *Casp3*, *Casp8*, *Casp9*, *IL6*, *Mcl-1*, *TNF- $\alpha$* , *HPRT1*, *GUSB*, *GAPDH* y *18S*.

En cada pocillo se añadieron 10  $\mu$ L del cDNA de la muestra correspondiente y 10  $\mu$ L de Mix 2x (TaqMAN Gene Expression Master Mix).

El equipo HT7900 Applied Biosystems se programó durante un total de 40 ciclos, con los siguientes pasos:

Tabla 2: Ciclo de PCR.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura ( $^{\circ}$ C)	50	95	95	60
Tiempo (min)	2	10	115	1

### 3.11. PROGRAMAS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico de los datos se realizó con el SPSS Software para Windows (versión 20, Chicago, IL, USA).

Se empleó el test de Student, considerando significativos los valores de  $p < 0,05$  y la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 APOPTOSIS DE LOS NEUTRÓFILOS TRAS LA FAGOCITOSIS DE BACTERIAS Y EFECTO DEL DPI

Los neutrófilos, normalmente, tienen una vida media muy corta (cuando se comparan con otras células blancas) muriendo por apoptosis, pero en ocasiones la apoptosis y por tanto la vida media leucocitaria se pueden alargar o acortar en determinadas condiciones. Las sustancias reactivas de oxígeno (ROS) son producidas por los neutrófilos ante determinados estímulos como puede ser la fagocitosis bacteriana y se conoce que tienen importancia en la regulación de los procesos apoptóticos. Por ello, en este pretendemos estudiar el efecto que produce la fagocitosis de bacterias (*S. aureus* y *E.coli*) con o sin inhibidor de NADPH oxidasa (DPI) en la muerte celular por apoptosis de los neutrófilos.

Inicialmente, se purificaron neutrófilos de sangre periférica de controles sanos y se sometieron a las condiciones específicas correspondientes. La tasa de apoptosis de los neutrófilos se midió por tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio y citometría de flujo, un método fácilmente cuantificable como se muestra en la Figura 3.

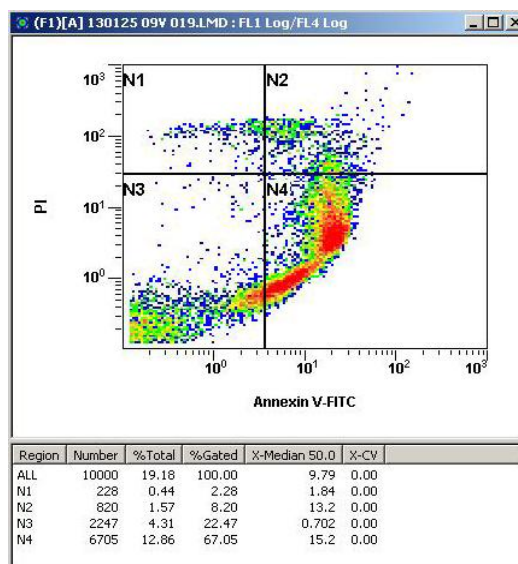


Figura 3. Diagrama de citometría de flujo de la población de neutrófilos purificados en muerte celular. En el cuadrante N3 se observan los PMN vivos, el cuadrante N4 refleja la apoptosis temprana (es la que nos interesa) que sufren los neutrófilos, el cuadrante N2 se corresponde con los neutrófilos que se encuentran en apoptosis tardía y el cuadrante N1 con los neutrófilos necróticos. El color rojo indica mayor concentración celular.

Dado que tanto *S. aureus* como *E. coli* son patógenos frecuentes en las infecciones, se incubaron neutrófilos en presencia de estos dos tipos de bacterias para estudiar el efecto de éstas sobre la apoptosis. Se observó que la incubación de neutrófilos, en medio RPMI-20% AHS, en presencia de *S. aureus* y *E. coli* con una proporción bacteria /PMN =1:1, producía una disminución de la población de células apoptóticas con respecto a los controles. Para probar si este efecto anti-apoptótico de las bacterias es dependiente de ROS se incubaron los neutrófilos simultáneamente con bacterias y DPI y se vio que tenía lugar la reversión del efecto antiapoptótico tras administrar este potente inhibidor de NADPH oxidasa (Figura 4).

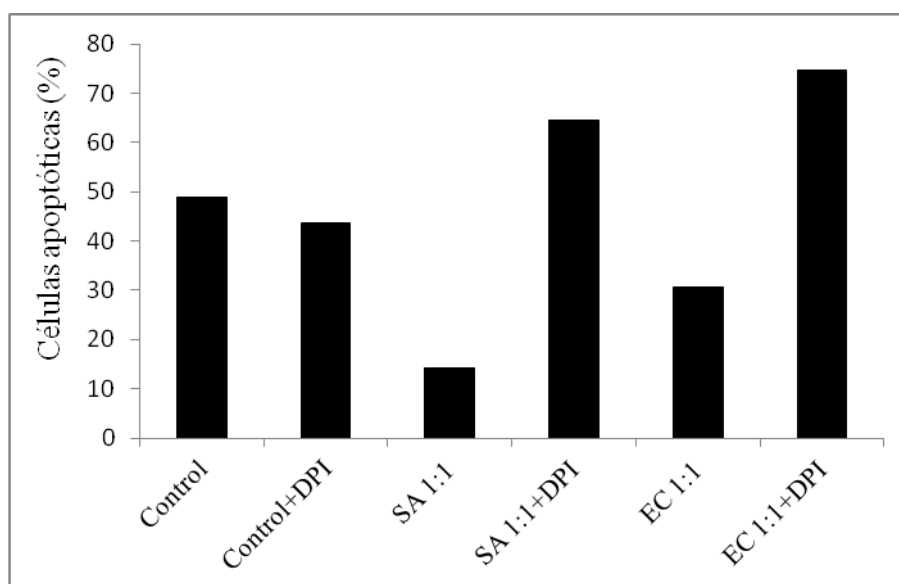


Figura 4. Apoptosis temprana de neutrófilos de un control sano, incubados con *S. aureus* (SA) y *E. coli* (EC) con una proporción bacteria/neutrófilo 1:1, así como con el antioxidante DPI, medida mediante tinción doble de anexina V- FITC y yoduro de propidio por citometría de flujo.



La media de los resultados de todos los experimentos realizados se resume en la Tabla 3, donde se puede apreciar detalladamente el porcentaje de células apoptóticas alcanzado en cada situación. La apoptosis de los neutrófilos incubados con *S. aureus* era significativamente menor que la de los controles ( $p=0.041$ ). Sin embargo el efecto antiapoptótico desaparecía al incubar los neutrófilos con *S.aureus* y simultáneamente con DPI ( $p=0.037$ ). Cuando se incubaron con *E. coli* o con *E. coli*+DPI se observaban tendencias similares (efecto antiapoptótico y supresión del mismo) pero no significativas, quizás debido al pequeño tamaño muestral.

Tabla 3: Valores de la apoptosis temprana de neutrófilos de controles sanos, incubados con *S. aureus* y *E. coli* en proporción bacteria/neutrófilo 1:1, así como con el antioxidante DPI, medida mediante tinción doble de anexina V- FITC y yoduro de propidio por citometría de flujo.

	n	x± SD	comparaciones	P valor
Control (A)	4	50.1± 13.5	A vs. C	0.041
DPI (B)	5	53.01± 17.3	A vs. B	0.780
<i>S.aureus</i> (C)	4	23.7 ± 15.2	C vs D	0.037
<i>S.aureus</i> + DPI (D)	5	53.03± 18.9		
<i>E.coli</i> (E)	5	32.4± 16.0	A vs. E	0.115
<i>E.coli</i> + DPI (F)	4	48.6±20.4	E vs. F	0.221

#### 4.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES PRO- Y ANTI-APOPTÓTICOS Y DE CITOQUINAS EN NEUTRÓFILOS INDUCIDA POR LA FAGOCITOSIS BACTERIANA Y EFECTO DEL DPI SOBRE LA MISMA.

Para ver qué genes estaban implicados en el retraso apoptótico de los neutrófilos tras su fagocitosis de bacterias se procedió al análisis de la expresión de genes que participan en la apoptosis y en la respuesta inmune mediante un ensayo de microarrays de DNA por PCR cuantitativa. Los genes analizados fueron: *Bad*, *Bak1*, *Bax*, *Bcl-2*, *Bcl-2L1*, *Bid*, *caspasa-3*, *caspasa-8*, *caspasa-9*, *IL6*, *Mcl-1*, *TNF- $\alpha$* , *HPRT1*, *GUSB*, *GAPDH* y *18S*. Entre los genes constitutivos *HPRT1*, *GUSB*, *GAPDH* y *18S*, se utilizó *GUSB*. Los neutrófilos se incubaron con *S. aureus*, o *E. coli* con/sin DPI.

La fagocitosis bacteriana producía un aumento en la expresión de los genes *Bcl-2* y *Mcl-1* (Figura 5) y *IL-6* y *TNF- $\alpha$*  (Figura 6), así como una disminución en la expresión de los genes *caspasa-8* y *caspasa-3* (Figura 7). En general, este efecto se revertía cuando se incubaban los neutrófilo con las bacterias en presencia de DPI.

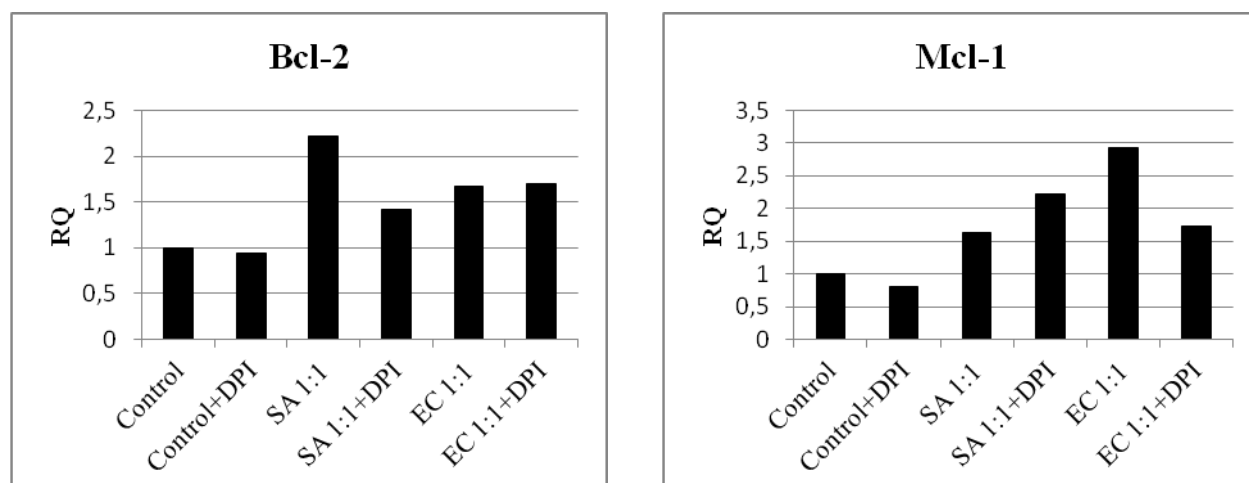


Figura 5: Expresión génica de genes anti-apoptóticos de la subfamilia Bcl-2 (*Bcl-2* y *Mcl-1*) tras incubar los neutrófilos con *S. aureus* (SA) y *E. coli* (EC), y tras bloqueo de las sustancias reactivas de oxígeno (ROS) con DPI.

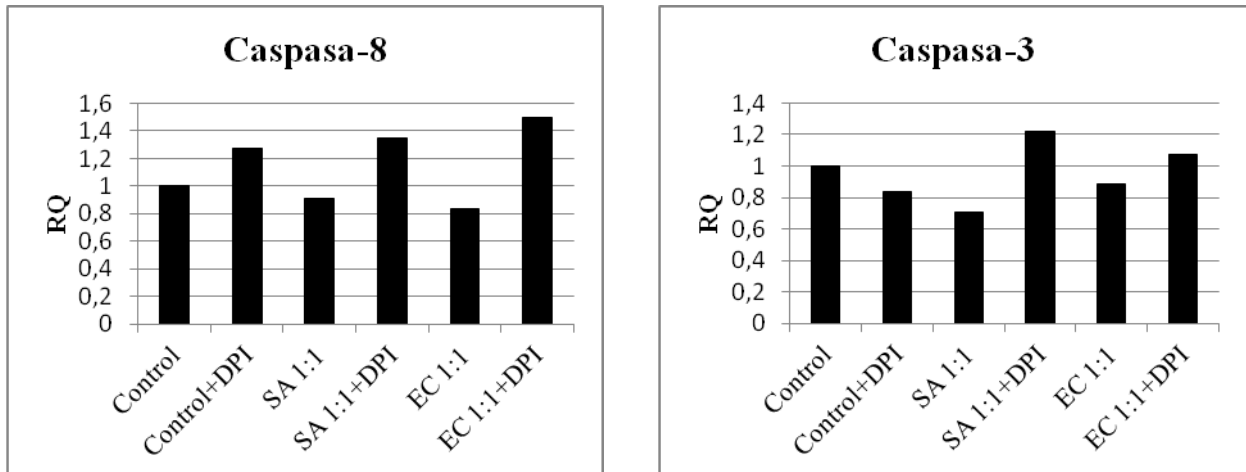


Figura 6: Expresión génica de genes apoptóticos (caspasa-8 y 3) tras incubar los neutrófilos con *S. aureus* (SA) y *E. coli* (EC), y tras bloqueo de las sustancias reactivas de oxígeno (ROS) con DPI.

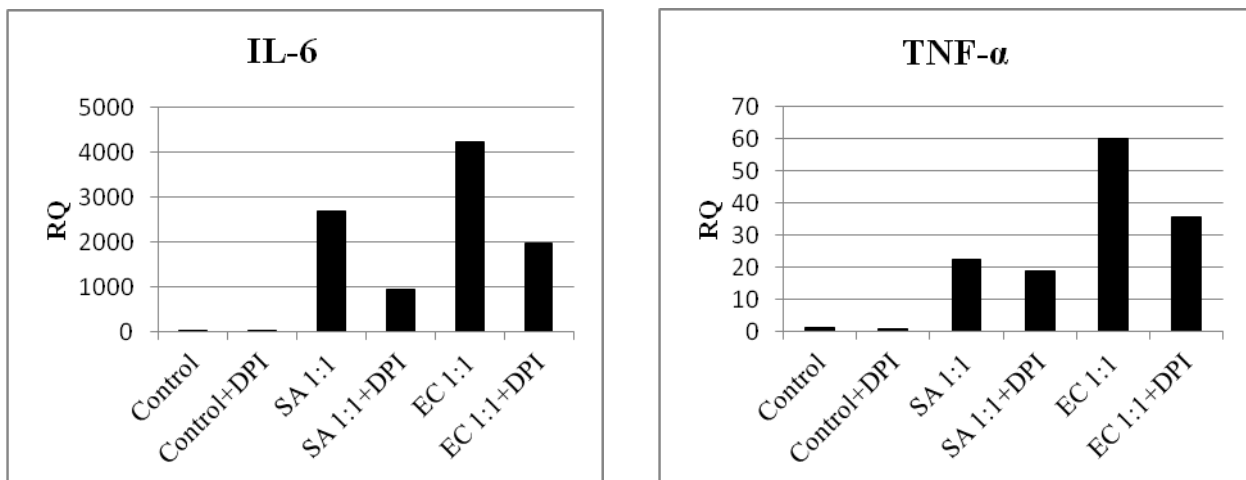


Figura 4: Expresión génica de las citoquinas IL-6 y TNF- $\alpha$  tras incubar los neutrófilos con *S. aureus* (SA) y *E. coli* (EC), y tras bloqueo de las sustancias reactivas de oxígeno (ROS) con DPI.

Los resultados representados en las gráficas (Figuras 5, 6 y 7) se resumen en la tabla 4 indicando las tendencias de expresión encontradas.

Tabla 4: Cambio de expresión génica tras la fagocitosis de bacterias (*S.aureus* y *E.coli*) por neutrófilos y respuesta a la incubación con DPI.

Gen	Fagocitosis de bacterias Expresión génica	Fagocitosis de bacterias + DPI Expresión génica
<i>Bcl-2</i>	↑	↓
<i>Mcl-1</i>	↑	= (No se modifica)
<i>Caspasa-8</i>	↓	↑
<i>Caspasa-3</i>	↓	↑
<i>IL-6</i>	↑	↓
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	↑	↓

↑ Sube la expresión, ↓ Baja la expresión

Se observaron diferencias significativas con respecto a los controles al incubar los neutrófilos con *S. aureus* en la la expresión de la caspasa-3 que descendía, y en la expresión de los genes anti-apoptóticos Mcl-1 y Bcl-2 que aumentaba ( $p=0.029$  para los 3), y al incubarlos con *E. coli* en el aumento de la expresión de los genes TNF- $\alpha$  y Mcl-1 ( $p=0.029$  para ambos). En el resto de los genes con/sin DPI continuaba observándose la misma tendencia aunque el pequeño tamaño muestral limitó la significación estadística , destacando el aumento de expresión del gen de la IL-6 (Tabla 5).

Tabla 5: Expresión génica de *Casp-3*, *Casp-8*, *IL-6*, *TNF-  $\alpha$* , *Mcl-1* y *Bcl-2* tras la fagocitosis de bacterias (*S.aureus* y *E.coli*) por PMN y respuesta a la incubación con DPI.

	<i>Casp3</i>	<i>Casp8</i>	<i>IL-6</i>	<i>TNF- <math>\alpha</math></i>	<i>Mcl-1</i>	<i>Bcl-2</i>
Control	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0
Control+ DPI	0.84 $\pm$ 0.36	1.27 $\pm$ 0.37	0.088 $\pm$ 0.132	0.81 $\pm$ 0.17	0.85 $\pm$ 0.65	0.93 $\pm$ 0.99
<i>S.aureus</i>	0.70 $\pm$ 0.0793 <sup>a</sup>	0.91 $\pm$ 0.28	2693.23 $\pm$ 2331.39	1.63 $\pm$ 1.08	22.32 $\pm$ 18.51 <sup>b</sup>	2.22 $\pm$ 0.78 <sup>c</sup>
<i>S.aureus</i> + DPI	1.23 $\pm$ 0.72	1.34 $\pm$ 0.62	925.78 $\pm$ 1157.21	2.23 $\pm$ 0.55	18.66 $\pm$ 23.53	1.42 $\pm$ 0.93
<i>E.coli</i>	0.84 $\pm$ 0.29	0.84 $\pm$ 0.35	4240.42 $\pm$ 6281.44	2.93 $\pm$ 3.18 <sup>d</sup>	59.92 $\pm$ 99.28 <sup>e</sup>	1.67 $\pm$ 0.59
<i>E.coli</i> + DPI	1.07 $\pm$ 0.71	1.5 $\pm$ 0.77	1961.84 $\pm$ 2959,71	1.73 $\pm$ 0.83	35.75 $\pm$ 55.39	1.71 $\pm$ 0.95

<sup>a</sup> control vs. *S.aureus* p=0.029 por las prueba no paramétrica de Mann-Whitney

<sup>b</sup> control vs. *S.aureus* p=0.029 por las prueba no paramétrica de Mann-Whitney

<sup>c</sup> control vs. *S.aureus* p=0.029 por las prueba no paramétrica de Mann-Whitney

<sup>d</sup> control vs. *E.coli* p=0.029 por las prueba no paramétrica de Mann-Whitney

<sup>e</sup> control vs. *E.coli* sp=0.029 por las prueba no paramétrica de Mann-Whitney

## 5. DISCUSIÓN

La fagocitosis de bacterias es un factor que modula la apoptosis de los neutrófilos. Se han hecho muchos estudios acerca de la fagocitosis de neutrófilos con diferentes tipos de bacterias con resultados diferentes y hasta contradictorios en cuanto a posibles cambios en su apoptosis, probablemente por las diferentes condiciones experimentales.

En este trabajo se analizó el efecto que tiene sobre la apoptosis temprana de los neutrófilos y sobre la respuesta inmune la fagocitosis de dos bacterias asociadas con infecciones frecuentes y potencialmente graves en el ser humano como *S. aureus* y *E. coli*. En algunos estudios anteriores se observó que *S. aureus* tenía capacidad para retrasar la apoptosis de los neutrófilos, si bien en la mayoría de los trabajos realizados con esta bacteria se produjo una inducción de la apoptosis neutrofílica. En cualquier caso ambos efectos de retraso o inducción de la apoptosis de los neutrófilos fueron independientes de la acción de las sustancias reactivas de oxígeno (ROS) (Baran y col., 1996, Yamamoto y col., 2002). En cuanto a *E. coli*, se han publicado muchos estudios acerca del efecto de su fagocitosis en la apoptosis de los neutrófilos y también hay muchas discrepancias. Algunos autores observaron un retraso de la apoptosis tras incubar los neutrófilos con *E.coli* (Baran y col., 1996), mientras que otros observaron una inducción de su apoptosis (Brest y col., 2004). Además en este caso parece que esta inducción apoptótica estaba medida por las sustancias reactivas de oxígeno (ROS) ya que fue inhibida por la adición de antioxidantes al medio (Watson y col., 1996). Una de las claves para explicar estas diferencias podría ser las diferentes proporciones de bacterias/neutrófilos usadas, ya que se ha publicado que con una baja proporción de bacterias/neutrófilos (0,1/1) se retrasa la apoptosis de los neutrófilos mientras que con proporciones más altas (10/1) se produce necrosis celular (Matsuda y col., 2001). Otros factores para explicar estas diferencias son el tiempo de incubación tras la fagocitosis, que oscila en las diferentes publicaciones entre 12 y 48 h, o la cepa bacteriana utilizada (Lundqvist-Gustafsson y col., 2001).

En este trabajo se observó que al incubar los neutrófilos durante 18 h tras la fagocitosis de ambas bacterias *S.aureus* y *E.coli* , realizada a una proporción de bacteria/neutrófilo de 1/1, se producía un descenso de la apoptosis de aproximadamente un 45% con respecto a los neutrófilos no incubados con bacterias y este efecto era revertido cuando se incubaban con DPI. En publicaciones anteriores se había visto que a proporciones de bacteria/neutrófilo más

altas (desde 10/1 a 100/1) se incrementaba la apoptosis de los neutrófilos hasta un 25% (Ocaña y col., 2008). Mediante análisis por microarrays de los 16 genes implicados en la apoptosis y en la respuesta inmune se observó que el retraso de la apoptosis en los neutrófilos, estaba mediado por una reducción en la expresión de los genes de las proteínas pro-apoptóticas caspasa-3 y caspasa-8 y por un aumento en la expresión de los genes de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Mcl-1 y de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$ , que publicaciones anteriores han demostrado que son también anti-apoptóticas (Ocaña y col. 2008).

La capacidad de las bacterias de modular la expresión de genes de la familia de Bcl-2 en neutrófilos había sido observada previamente con *Mycobacterium tuberculosis* que tiene la capacidad de inducir apoptosis aumentando la relación Bax/Bcl-X<sub>L</sub> (Perskvist y col., 2002) o con *Anaplasma phagocytophilum*, que produce un retraso de la apoptosis debido a que protege a la proteína Mcl-1 de la degradación favoreciendo su acción anti-apoptótica (Choi y col., 2005). Otros autores han analizado la capacidad global de las bacterias para inducir cambios en la expresión de los genes implicados en la apoptosis del neutrófilo empleando, también, la técnica de microarrays y han encontrado que durante la fagocitosis bacteriana se altera la expresión de 30 genes entre los que se encuentra Bax, Bcl-2, algunas caspasas, algunas kinasas como MAPK o Akt o factores de transcripción como NF- $\kappa$ B (Kobayashi y col., 2003). También se ha descrito que el retraso de la apoptosis inducida por *S. aureus* y *E. coli* implica un aumento en la relación Bcl-x<sub>L</sub>/Bax (Ocaña y col., 2008).

Las sustancias reactivas de oxígeno (ROS) podrían estar implicadas en el retraso apoptótico producido por *S. aureus* y *E. coli* ya que el efecto anti-apoptótico es inhibido al bloquear la actividad de la NADPH oxidasa mediante la adición del DPI. Pero, también existen discrepancias sobre el papel que juegan las ROS en la regulación de la apoptosis del neutrófilo. Algunos autores han descrito que las ROS no intervienen en la apoptosis inducida por la fagocitosis bacteriana (Yamamoto y col., 2002; Ottonelo y col., 2002). Sin embargo, la mayoría de los autores hablan de un efecto pro-apoptótico de las ROS tanto en la apoptosis espontánea (Gardai y col., 2004) como en la inducida por la fagocitosis de determinadas bacterias mediante la activación de la caspasa-3 y 8 (Zhang y col., 2003). Además, se ha publicado que las ROS son las responsables del retraso de la apoptosis de los neutrófilos cuando se exponen al grupo hemo de la hemoglobina como ocurre en las enfermedades

hemolíticas y que producen este efecto inhibiendo la inserción de Bax en la mitocondria y disminuyendo la relación Bad/Bcl-X<sub>L</sub> (Arruda y col., 2006). Asimismo, las ROS actúan como reguladoras de la expresión génica, ya que activan factores de transcripción como NF-κB, responsable de la activación transcripcional de genes de supervivencia de la familia Bcl-2, como Mcl-1, A1 (Francois y col., 2005) o Bcl-X<sub>L</sub> (Hu y Sayeed, 2005) y de algunas citoquinas como IL-6, IL-1 o IL-8, o c-fos, que es responsable de la síntesis de TNF-α (Fialkow y col., 2007). Esta regulación se produce de forma tanto autocrina como paracrina, ya que muchas de estas sustancias son liberadas al exterior celular. Todo esto podría explicar la inhibición en la síntesis de Bcl-2, IL-6 y TNF-α tras bloquear la síntesis de las ROS por DPI, y por tanto la inhibición del efecto anti-apoptótico producido por las bacterias. La IL-6 inhibe la apoptosis de los neutrófilos y prolonga su supervivencia mientras TNF-α podría tener un efecto dual en la apoptosis de los neutrófilos, acelerándola o retardándola. El TNF-α disminuye el efecto de la proteína anti-apoptótica Bcl-X<sub>L</sub> en neutrófilos humanos mientras que la IL-6 disminuye el efecto de la proteína pro-apoptótica Bax-α. A baja proporción bacteria/neutrófilo (1/1) las citoquinas anti-apoptóticas podrían superar el efecto pro-apoptótico del TNF-α y de las ROS en los neutrófilos. Los antioxidantes disminuyen la producción de ROS que podría inhibir la expresión génica de ambas citoquinas anti- y pro-apoptóticas. Un mecanismo dependiente de Bax (Ocaña y col., 2008), caspasa-8 y caspasa-3 podría contribuir a la apoptosis acelerada observada tras la terapia con antioxidantes.

Por otra parte, no todas las bacterias producen el mismo efecto en los neutrófilos. En presencia de *Mycobacterium abscessus*, que es una bacteria de crecimiento rápido, los neutrófilos tienen menos actividad NADPH oxidasa, una menor producción de quimiocinas y citoquinas proinflamatorias, menor fagocitosis que al incubarlos con *S. aureus*, y la apoptosis neutrofílica no está afectada. La respuesta de los neutrófilos en la infección por *M. abscessus* sugiere que esta micobacteria explota los entornos con abundantes neutrófilos para promover su supervivencia. La fagocitosis reducida por parte de los neutrófilos en comparación con *S. aureus* podría justificar la elevada virulencia de esta micobacteria (Malcolm y col., 2013).

Todos estos resultados ponen de manifiesto la importancia de los mecanismos apoptóticos desencadenados en el neutrófilo tras la infección bacteriana, que contribuyen a la propagación o eliminación de la infección. En los primeros momentos de la infección, cuando el número de bacterias es aún bajo, los neutrófilos alargan su período de vida mediante la síntesis de



factores de supervivencia para intentar controlar la infección. Sin embargo, si por algún motivo el número de bacterias sigue creciendo, la capacidad fagocítica del neutrófilo se satura y se produce la síntesis de factores pro-apoptóticos con lo que el neutrófilo entra en un proceso apoptótico y es fagocitado por los macrófagos.

El avance en el conocimiento de los mecanismos que regulan la apoptosis del neutrófilo y su regulación tras la fagocitosis de las bacterias, ayudaría a encontrar nuevos fármacos para controlar la inflamación y reducir el daño tisular originado por la excesiva liberación de productos tóxicos por parte del neutrófilo y por tanto se podría mejorar el tratamiento de enfermedades infecciosas e inflamatorias. La resistencia a la apoptosis, también, es un reto común en tumores malignos humanos que contribuyen tanto al progreso del cáncer como a la resistencia a tratamientos convencionales, por lo que requieren una gran atención los enfoques terapéuticos que apuntan específicamente a los mecanismos moleculares que intervienen en dicha resistencia.

Entre las proteínas implicadas en el proceso apoptótico hay que destacar Mcl-1 como posible diana terapéutica. Mcl-1 es una proteína pro-supervivencia altamente expresada en tumores malignos humanos y su expresión celular está estrechamente regulada a través de múltiples mecanismos. Mcl-1 difiere de otros miembros de la familia Bcl-2 en tener una vida media muy corta. Por lo tanto la inhibición de su expresión y/o neutralización de su función anti-apoptótica hace que las células dependientes de Mcl-1 sean más susceptibles a la apoptosis y proporciona una oportunidad para combatir varios tipos de cánceres (Akgul, 2009; Milot y Filep, 2011). La expresión de Mcl-1 está incrementada en los neutrófilos tanto cuando se trata con *S. aureus* como con *E. coli* en condiciones en que la apoptosis está retrasada. Otra posible diana terapéutica sería TRAIL que facilita la apoptosis de los neutrófilos a través de la inducción de la activación de la caspasa-8 (Renshaw y col., 2003; McGrath y col., 2011). Se vio también una inhibición en la expresión de las caspasas-3 y -8 por los neutrófilos tras la fagocitosis.

Estudios recientes identificaron varias clases de moléculas para la inducción terapéutica de la apoptosis de los neutrófilos y la resolución de la inflamación. Un tipo de moléculas son las lipoxinas, que impiden la señalización mieloperoxidasa (MPO) (que juega un papel fundamental en la defensa del huésped) al inhibir su liberación y la expresión de Mac-1

(receptor que integra señales que modulan la vida y la muerte y por lo tanto el resultado de la inflamación), bloquean las señales de supervivencia (Akt, ERK), la activación de NADPH oxidasa y del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, además de llevar a Mcl-1 a su degradación y a los neutrófilos apoptóticos a ser fagocitados por los macrófagos. También se identificó la Resolvina E1 como posible modulador terapéutico de la apoptosis del neutrófilo. Este compuesto a través de Mac-1 incrementa la producción de ROS por la NADPH oxidasa y la posterior activación de las caspasas 8 y 3, además de atenuar las señales mediadas por Akt y ERK inducidas por MPO y la disminución de la expresión de Mcl-1 reforzando el cambio hacia apoptosis (El Kebir y col., 2013).

Por otra parte, se ha descrito que el aumento de la apoptosis se correlaciona con el aumento de la expresión de p53 o de Bax y una disminución de la expresión de la proteína Bcl-2. La inyección sistémica de una forma permeable de I $\kappa$ B $\alpha$  (Tat-srI $\kappa$ B $\alpha$  quimera) redujo el tráfico leucocitario a la cavidad pleural e incrementó la actividad de la caspasa-3 y la apoptosis en células emigradas. Pero, sólo se producían reducciones en la migración de neutrófilos y en la apoptosis si se administraba localmente, lo que indica que la ruta y el calendario de administración pueden ser críticos para ejercer acciones beneficiosas (Blackwell y col., 2004).

La investigación realizada durante la última década ha puesto de manifiesto que la inflamación no termina espontáneamente, sino que la resolución de la misma es un proceso activo muy controlado. La acumulación de datos experimentales y clínicos sugiere una relación causal entre la apoptosis de neutrófilos y el resultado de la inflamación. La apoptosis de los neutrófilos emigrados tiene múltiples acciones a favor de la resolución de la inflamación, parando la producción y liberación de mediadores pro-inflamatorios. La fagocitosis de células apoptóticas induce la polarización de macrófagos de un fenotipo pro-inflamatorio a un fenotipo pro-resolución.

## 6. CONCLUSIONES

1. La fagocitosis bacteriana por los neutrófilos de sangre periférica de controles sanos en una proporción bacteria/neutrófilo = 1:1 retrasa su apoptosis medida mediante tinción de anexina V, yoduro de propidio y citometría de flujo.
2. Este efecto es más evidente para *Staphylococcus aureus* que para *Escherichia coli*.
3. La incubación simultánea de las bacterias con los neutrófilos y el potente inhibidor de NADPH oxidasa DPI inhibe el efecto anti-apoptótico de la fagocitosis bacteriana.
4. El efecto anti-apoptótico de la fagocitosis bacteriana es mediado por un aumento de la expresión de los genes anti-apoptóticos *Bcl-2* y *Mcl-1* medidos mediante microarrays de DNA por PCR cuantitativa.
5. El efecto anti-apoptótico de la fagocitosis bacteriana también es mediado por una disminución de la expresión de los genes pro-apoptóticos de las *caspasas -3* y *-8* medidos mediante microarrays de DNA por PCR cuantitativa.
6. El efecto anti-apoptótico de la fagocitosis bacteriana también es mediado por un aumento de la expresión de los genes de la *IL-6* y del *TNF- $\alpha$*  medidos mediante microarrays de DNA por PCR cuantitativa.
7. El efecto que este retraso de la apoptosis puede tener en la patogénesis y evolución de las infecciones bacterianas humanas debe ser estudiado en mayor profundidad.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol*, 2007; 19:488-496.
- Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett*, 2001; 487:318-322.
- Akgul C, Edwards SW. Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. *Cell Mol Life Sci*, 2003; 60:2402-2408.
- Akgul C. Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer. *Cell Mol Life Sci*, 2009; 66:1326-1336.
- Arruda MA, Barcellos-de-Souza P, Sampaio AL, Rossi AG, Graça-Souza AV, Barja-Fidalgo C. NADPH oxidase-derived ROS: key modulators of heme-induced mitochondrial stability in human neutrophils. *Exp Cell Res*, 2006; 312:3939-3948.
- Baran J, Guzik K, Hryniewicz W, Ernst M, Flad HD, Pryjma J. Apoptosis of monocytes and prolonged survival of granulocytes as a result of phagocytosis of bacteria. *Infect Immun*, 1996; 64:4242-4248.
- Blackwell NM, Sembi P, Newson JS, Lawrence T, Gilroy DW, Kabouridis PS. Reduced infiltration and increased apoptosis of leukocytes at sites of inflammation by systemic administration of a membrane-permeable IkappaBalpha repressor. *Arthritis Rheum*, 2004; 50:2675-2684.
- Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 2010; 33:657-670.
- Brest P, Bétis F, Cuburu N, Selva E, Herrant M, Servin A, Auburger P, Hofman P. Increased rate of apoptosis and diminished phagocytic ability of human neutrophils infected with Afa/Dr diffusely adhering Escherichia coli strains. *Infect Immun*, 2004; 72:5741-5749.
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell*, 2010; 37:299-310.
- Choi KS, Park JT, Dumler JS. Anaplasma phagocytophilum delay of neutrophil apoptosis through the p38 mitogen-activated protein kinase signal pathway. *Infect Immun*, 2005; 73:8209-8218.
- DeLeo FR. Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. *Apoptosis*, 2004. 9:399-413.

- El Kebir D, Filep JG. Modulation of Neutrophil Apoptosis and the Resolution of Inflammation through  $\beta 2$  Integrins. *Front Immunol*, 2013; 4:60.
- François S, El Benna J, Dang PM, Pedruzzi E, Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C. Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1, and phosphorylated Bad. *J Immunol*, 2005; 174:3633-3642.
- Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med*, 2007; 42:153-164.
- Gabelloni ML, Trevani AS, Sabatté J, Geffner J. Mechanisms regulating neutrophil survival and cell death. *Semin Immunopathol*, 2013; Doi 10.1007.
- Gardai SJ, Whitlock BB, Xiao YQ, Bratton DB, Henson PM. Oxidants inhibit ERK/MAPK and prevent its ability to delay neutrophil apoptosis downstream of mitochondrial changes and at the level of XIAP. *J Biol Chem*, 2004; 279:44695-44703.
- Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, Arfors KE, Harlan JM, Granger DN. Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol*, 1987; 253:H699-H703.
- Hu Z, Sayeed MM. Activation of PI3-kinase/PKB contributes to delay in neutrophil apoptosis after thermal injury. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005; 288:C1171-1178.
- Ishii KJ, Koyama S, Nakagawa A, Coban C, Akira S. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe*, 2008; 3:352-363.
- Jimenez MF, Watson RW, Parodo J, Evans D, Foster D, Steinberg M, Rotstein OD, Marshall JC. Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome. *Arch Surg*, 1997; 132:1263-1270.
- Kirchner T, Möller S, Klinger M, Solbach W, Laskay T, Behnen M. The impact of various reactive oxygen species on the formation of neutrophil extracellular traps. *Mediators Inflamm*, 2012; Doi: 10.1155.
- Kobayashi SD, Braughton KR, Whitney AR, Voyich JM, Schwan TG, Musser JM, DeLeo FR. Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *PNAS*, 2003; 100:10948-10953.
- Lundqvist-Gustafsson H, Norrman S, Nilsson J, Wilsson A. Involvement of p38-mitogen-activated protein kinase in Staphylococcus aureus-induced neutrophil apoptosis. *J Leukoc Biol*, 2001; 70:642-648.

- Malcolm KC, Nichols EM, Caceres SM, Kret JE, Martiniano SL, Sagel SD, Chan ED, Caverly L, Solomon GM, Reynolds P, Bratton DL, Taylor-Cousar JL, Nichols DP, Saavedra MT, Nick JA. Mycobacterium abscessus induces a limited pattern of neutrophil activation that promotes pathogen survival. *PLoS One*, 2013; Doi: 10.1371.
- Matsuda T, Saito H, Fukatsu K, Han I, Inoue T, Furukawa S, Ikeda S, Hidemura A. Cytokine-modulated inhibition of neutrophil apoptosis at local site augments exudative neutrophil functions and reflects inflammatory response after surgery. *Surgery*, 2001; 129:76-85.
- Matute-Bello G, Liles WC, Radella F 2nd, Steinberg KP, Ruzinski JT, Jonas M, Chi EY, Hudson LD, Martin TR. Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997; 156:1969-1977.
- McGrath EE, Marriott HM, Lawrie A, Francis SE, Sabroe I, Renshaw SA, Dockrell DH, Whyte MK. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) regulates inflammatory neutrophil apoptosis and enhances resolution of inflammation. *J Leukoc Biol*, 2011; 90:855-865.
- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 2007; 449:819-826.
- Meley DD, Evans TW, Quinlan GJ. Redox regulation of neutrophil apoptosis and the systemic inflammatory response syndrome. *Clin Sci*, 2005; 108: 413-424.
- Milot E, Filep JG. Regulation of neutrophil survival/apoptosis by Mcl-1. *Scientific World Journal*, 2011; 11:1948-1962.
- Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6:173-182.
- Ocaña MG, Asensi V, Montes AH, Meana A, Celada A, Valle-Garay E. Autoregulation mechanism of human neutrophil apoptosis during bacterial infection. *Mol Immunol*, 2008; 45:2087-2096.
- Ottonello L, Frumento G, Arduino N, Bertolotto M, Dapino P, Mancini M, Dallegri F. Differential regulation of spontaneous and immune complex-induced neutrophil apoptosis by proinflammatory cytokines. Role of oxidants, Bax and caspase-3. *J Leukoc Biol*, 2002; 72:125-132.
- Perskvist N, Long M, Stendahl O, Zheng L. Mycobacterium tuberculosis promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-xL via an oxygen-dependent pathway. *J Immunol*, 2002; 168:6358-6365.

- Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, Tesselaar K, Koenderman L. In vivo labeling with 2H<sub>2</sub>O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, 2010; 116:625-627.
- Renshaw SA, Parmar JS, Singleton V, Rowe SJ, Dockrell DH, Dower SK, Bingle CD, Chilvers ER, Whyte MK. Acceleration of human neutrophil apoptosis by TRAIL. *J Immunol*, 2003; 170:1027-1033.
- Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007; 8:405-413.
- Sayeed MM. Delay of neutrophil apoptosis can exacerbate inflammation in sepsis patients: cellular mechanisms. *Crit Care Med*, 2004; 32:1604-1606.
- Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immuno*, 2005; 23:197-223.
- Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*, 2005; 6:1191-1197.
- Simon HU. Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunol Rev*, 2003; 193:101-110.
- Strasser A, Cory S, Adams JM. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J*, 2011; 30:3667-3683.
- Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010; 11:621-632.
- Tak T, Tesselaar K, Pillay J, Borghans JA, Koenderman L. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J Leukoc Biol*, 2013. Doi: 10.1189.
- Theilgaard-Mönch K, Porse BT, Borregaard N. Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. *Curr Opin Immunol*, 2006; 18:54-60.
- Watson EWG, Redmond HP, Wang JH, Condrón C, Bouchier-Hayes D. Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of *Escherichia coli*. *J Immunol*, 1996; 156:3986-3992.
- Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem*, 1999; 274:20049-20052.
- Wright HL, Thomas HB, Moots RJ, Edwards SW. RNA-seq reveals activation of both common and cytokine-specific pathways following neutrophil priming. *PLoS One*, 2013; Doi: 10.1371.

- Yamamoto A, Taniuchi S, Tsuji S, Hasui M, Kobayashi Y. Role of reactive oxygen species in neutrophil apoptosis following ingestion of heat-killed *Staphylococcus aureus*. *Clin Exp Immunol*, 2002; 129:479-484.
- Zhang B, Hirahashi J, Cullere X, Mayadas TN. Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis: cross-talk between caspase 8, reactive oxygen species, and MAPK/ERK activation. *J Biol Chem*, 2003; 278:28443-28454.



