

Trampas extracelulares de neutrófilos (NET), consecuencia de un suicidio celular

Juan Carlos Yam-Puc^{1,2}, Liliana García-Marín¹ y Luvia Enid Sánchez-Torres^{1*}

¹Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.; ²Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

Resumen

Recientemente se descubrió que los neutrófilos pueden generar fibras o redes extracelulares llamadas neutrophil extracellular traps (NET), las cuales están compuestas de un esqueleto de ADN sobre el que se encuentran diversos componentes citoplásmicos –entre ellos diversas enzimas– y nucleares. Las NET son una barrera física que en muchos casos evita la diseminación de los microorganismos e incluso facilita su muerte al favorecer una alta concentración local de moléculas antimicrobianas. Por otro lado, su estructura fibrosa limita el daño al tejido donde se generan, al restringir el radio de acción de las moléculas que son liberadas por el neutrófilo. En este trabajo se describe de manera general esta nueva forma de muerte celular de los neutrófilos y las implicaciones que puede tener en diferentes enfermedades.

PALABRAS CLAVE: Neutrófilos. Neutrophil extracellular traps. Muerte celular.

Abstract

Recently it was discovered that neutrophils can generate extracellular fibers called NET (neutrophil extracellular traps), which are composed of a skeleton of DNA "decorated" with many cytoplasmic –including enzymes– and nuclear components. The NET are a physical barrier that prevent the spread of microorganisms and facilitate the cell death by promoting a high local concentration of antimicrobial molecules. On the other hand, the fibrous structure limits the damage to the tissue where they are generated by restricting the range of molecules that are released by the neutrophil. This paper describes this new form of cell death and the implications this may have on different diseases.

KEY WORDS: Neutrophils. NET. Cell death.

Neutrófilos

Los neutrófilos son células fagocíticas con núcleo lobulado que forman parte de la primera línea de defensa del organismo. Se llaman neutrófilos porque no se tiñen con colorantes ácidos ni básicos. Los neutrófilos

se forman por hematopoyesis en la médula ósea, donde maduran y producen enzimas y proteínas antimicrobianas, las cuales son almacenadas en diferentes gránulos. Después de salir de la médula ósea, circulan por el torrente sanguíneo durante 7-10 h antes de migrar a los tejidos.

Morfológicamente, se caracterizan por presentar un núcleo con cromatina compacta y segmentada de 2-5 lóbulos. El núcleo de los neutrófilos inmaduros no está segmentado y se observa como una sola banda. Su citoplasma contiene abundantes gránulos finos de color púrpura (cuando se tiñen con colorante de Giemsa) que contienen abundantes enzimas líticas. Los neutrófilos normalmente se encuentran en la circulación sanguínea, pero cuando se produce un daño o

Correspondencia:

*Luvia Enid Sánchez-Torres
Laboratorio de Inmunología Celular
y de los Microorganismos
Departamento de Inmunología
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Instituto Politécnico Nacional
Prol. de Carpio y Plan de Ayala, s/n
Col. Santo Tomás, C.P. 11340 México, D.F.
E-mail: luviasanchez@hotmail.com

Fecha de recepción en versión modificada: 10-09-2011

Fecha de aceptación: 13-10-2011

una infección, migran al sitio de la inflamación dirigidos por señales químicas como la interleucina 8 (IL-8), en un proceso llamado quimiotaxis.

Al ser células fagocíticas profesionales, los neutrófilos tienen una gran variedad de receptores que les permiten reconocer microorganismos opsonizados y no opsonizados y facilitar su captación^{1,2}.

NET

Hasta hace algunos años, se consideraba que los neutrófilos empleaban básicamente dos mecanismos para destruir a los microorganismos: la fagocitosis, con la subsecuente eliminación intracelular de los mismos, y la liberación al medio extracelular de sus proteínas con actividad antimicrobiana; sin embargo, recientemente se han descrito otras funciones para estas células.

Intracelularmente, los neutrófilos destruyen a los microorganismos fagocitados mediante la acción de moléculas citotóxicas presentes en sus gránulos citoplásmicos y que son vertidas al fagosoma¹. La muerte de los microorganismos en las células fagocíticas ocurre por la acción tanto de los radicales libres del oxígeno (anión superóxido, radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno, producidos por el complejo enzimático NADPH oxidasa) o del nitrógeno (óxido nítrico) como de moléculas con actividad microbicida contenidas en los gránulos de los neutrófilos³. Algunas de estas últimas tienen un efecto microbicida directo sobre algunos microorganismos, mientras que otras, como la mieloperoxidasa, enzima que contiene hierro y que le da color verde al pus, utiliza el peróxido de hidrógeno como sustrato para, junto con haluros, producir compuestos altamente tóxicos⁴. Sin embargo, cabe señalar que este contenido también se puede liberar hacia el exterior, lo que permite la eliminación de microorganismos extracelulares, pero con la posibilidad de generar daño del tejido.

Nathan, en 2006, señala que los neutrófilos, a través de la liberación de sustancias hacia el medio externo, deciden el destino de los microorganismos mediante dos vías generales, lo que él denomina «quitando» y «dando». En la primera, el neutrófilo retiene los factores esenciales que los agentes microbianos requieren para su supervivencia, como el hierro; para esto, los neutrófilos secretan la lactoferrina, proteína que lo enlaza y almacena. En la segunda vía, los neutrófilos liberan de manera progresiva sustancias preformadas y sintetizadas *de novo* contenidas en sus gránulos, como lipocalina, lisozima, LL37 y diversas metaloproteinasas

(MP8, MMP9 y MMP25)². Estas últimas degradan laminina, colágena, proteoglicanos y fibronectina, por lo que son importantes para que los neutrófilos se abran paso hacia el sitio de la inflamación. También son liberados aquellos que contienen α -defensinas, catepsina G, elastasa y proteasa 3, entre otros^{5,6}.

Aunado a los mecanismos descritos anteriormente, Brinkmann, et al., en 2004, describieron uno nuevo desplegado por los neutrófilos para la contención de los microorganismos, que implica, además, la muerte del propio neutrófilo; en este fenómeno biológico, el núcleo de estas células pierde su forma lobulada característica, la eucromatina y la heterocromatina se homogenizan, hay ruptura de su membrana nuclear y disolución de los gránulos citoplásmicos, permitiendo que los componentes celulares y nucleares se mezclen para, finalmente, producir ruptura de la membrana celular y poder ser liberados al medio extracelular. A estos complejos o redes liberados se les llamó trampas extracelulares (*extracellular traps* [ET]) y, por ser liberados por los neutrófilos, se denominaron específicamente NET⁷. Debido a que se consideró que la consecuencia final de este proceso es la muerte del neutrófilo, varios autores hacen referencia a este mecanismo de muerte como «netosis»⁸.

Es importante señalar que las características morfológicas y los procesos bioquímicos que presentan las células que mueren por netosis son diferentes y distinguibles de aquellos presentados por células necróticas o apoptóticas. En la netosis no hay exposición de fosfatidilserina, activación de caspasas, ni fragmentación de ADN, como ocurre en la apoptosis, y, aunque sí hay ruptura de la envoltura nuclear, esta ocurre al inicio del proceso y no en etapas tardías, como se presenta en la necrosis^{8,9}. Interesantemente se ha descrito que cuando el inductor de la formación de las NET es *phorbol myristate acetate* (PMA), los neutrófilos inicialmente presentan autofagia, pero si esta es inhibida, también lo es la liberación de NET, y los neutrófilos mueren por apoptosis¹⁰, lo que sugiere que las vías de señalización de diferentes mecanismos de muerte están conectadas.

Recientemente se han descrito de manera más detallada las primeras etapas del proceso de formación de las NET (primeros 5-60 min), en particular en respuesta al estímulo con *Staphylococcus aureus*. Los autores señalan que lo primero que ocurre es la desintegración de la membrana nuclear, tanto la interna como la externa, y la formación de vesículas con membrana íntegra que contienen ADN, las cuales se encuentran inicialmente en el citoplasma. Posteriormente

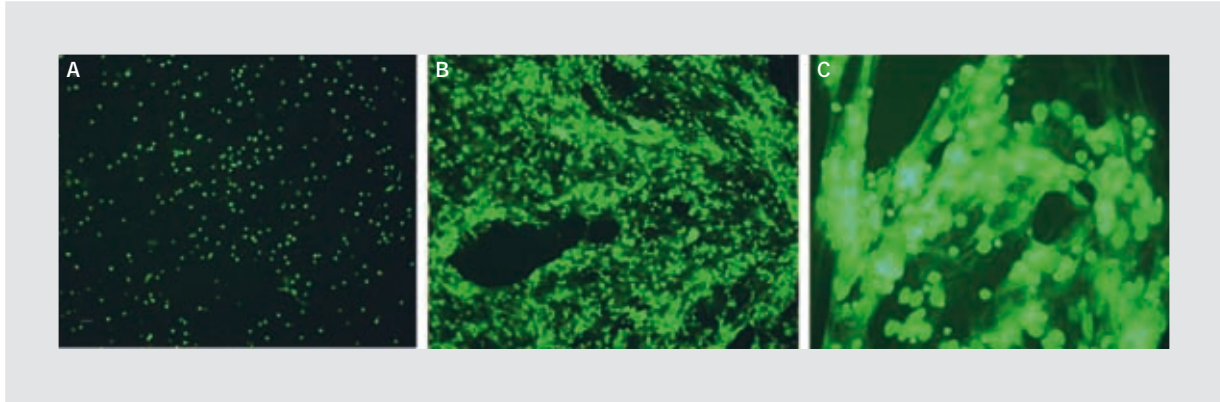


Figura 1. Inducción de NET en neutrófilos humanos. Neutrófilos humanos: cultivo en ausencia (A) o en presencia de PMA (1 µg/ml) (B y C) durante 4 h. Después de la incubación se fijaron con p-formaldehído, se tiñeron con SytoxGreen y se observaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon, Eclipse E800 [A y B, 10x y C, 40x]).

son liberadas al espacio extracelular y, una vez fuera, las vesículas se rompen y el ADN es liberado, lo que le permite atrapar a los microorganismos presentes en ese microambiente. En dicho trabajo se observó, además, que en las fases tempranas de este proceso no hay lisis ni ruptura de la membrana plasmática de los neutrófilos y que la liberación de dichas vesículas ocurre de manera independiente del estallido respiratorio¹¹.

Diversos estudios han mostrado que la formación de NET no es exclusiva de los humanos, ya que se ha encontrado evidencia de su formación en otros vertebrados como ratones, pollos, conejos, caballos, bovinos, gatos y peces^{7,12-18}.

NET

Las NET, como se ha mencionado, son una barrera física que estaría evitando tanto la diseminación de los microorganismos como el daño al tejido, ya que limita el radio de acción de las moléculas tóxicas, participando así en la regulación de diversas infecciones y del proceso inflamatorio. La estructura fibrosa de las NET es necesaria para ejercer el secuestro, y en algunos casos además la muerte de los microorganismos al favorecer una alta concentración local de moléculas antimicrobianas^{7,19}. El esqueleto de ADN da una superficie cargada negativamente en la cual están embebidas moléculas que estarían mediando la unión con los microorganismos, posiblemente por interacciones electrostáticas entre los componentes catiónicos de las NET y las superficies aniónicas de estos²⁰. En la figura 1 se muestran estas redes emitidas por los neutrófilos, pudiéndose observar la estructura fibrosa de las mismas.

Interesantemente las NET son abundantes en los sitios de inflamación; *in vivo* se han detectado en disentería experimental, apendicitis humana, malaria y mastitis bovina, entre otras; y, han sido implicadas, además, en enfermedades tan diversas como las autoinmunes (lupus), en infertilidad y en preclamsia, aunque en algunos casos no está claro el papel que tiene su inducción y formación^{7,14,15,21-24}.

Por otro lado, Yost, et al., en 2009, utilizando neutrófilos de neonatos estimulados 1 h con lipopolisacárido (LPS), factor activador de plaquetas, PMA o algunas bacterias, concluyeron que estos no eran capaces de generar NET y plantearon la posibilidad de que esto contribuya a la predisposición de los neonatos a cierto tipo de infecciones en etapas tempranas de la vida. Este grupo ubica esta incapacidad como una nueva deficiencia del sistema inmune de los neonatos, y han establecido que no se debe a una deficiencia en la activación de la NADPH oxidasa, como ocurre en los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica²⁵. Contrariamente a lo anterior, Marcos, et al., en 2010, describieron que los neutrófilos de los neonatos sí pueden generar NET y que, al igual que en adultos, tienen propiedades microbicidas, pero que, al menos cuando el estímulo es vía TLR2/TLR4, el tiempo en el que responden es mayor. Estos autores señalan que, mientras los adultos responden desde la primera hora de cultivo en presencia del inductor, los neutrófilos de neonatos inician la formación de redes a las 2 h e igualan la cantidad de NET formadas por los adultos a las 3 h aproximadamente²⁶. Lo que quedaría por establecer es si este retraso en la generación de NET tiene implicaciones en la respuesta temprana a infecciones en los neonatos.

Agentes inductores de las NET

Se ha evidenciado que la producción de NET *in vitro* puede presentarse entre 5 min y 4 h después del estímulo. *In vivo* se han detectado en diferentes sitios anatómicos, los cuales se han relacionado con distintas enfermedades; así, se han detectado en la circulación sanguínea, el riñón, los pulmones y la piel, entre otros sitios^{19,21,27,28}.

Dentro de los inductores de NET tenemos agentes químicos y biológicos. Entre los primeros están el PMA, la IL-8, el H₂O₂, el factor activador de plaquetas y el óxido nítrico, el cual, según se ha descrito claramente, *in vitro* media la generación de radicales libres en los neutrófilos induciendo así la liberación de NET; este efecto se inhibe si se adiciona N-acetilcisteína^{7,8,25,29}. Además, la adición de interferón α/γ (IFN- α/γ) y C5a o factor estimulante de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y C5a también es capaz de activar e inducir la producción de NET³⁰. Por otro lado, también se ha demostrado que la adición de partículas de látex puede inducir la generación de redes en los neutrófilos³¹.

Con respecto a los agentes biológicos, la lista de inductores de NET se incrementa rápidamente. A la fecha, se han descrito como inductores de NET las plaquetas activadas, diversas bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycobacterium tuberculosis*), hongos (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*), parásitos (*Plasmodium falciparum*, *Leishmania amazonensis*, *Eimeria bovis*) y recientemente virus (virus de la leucemia felina)^{16,19,21,28,31-37}.

En algunos casos y de manera muy interesante, ciertas moléculas purificadas de algunos microorganismos han probado inducir por sí solas, y de manera eficiente, la producción de NET, como el LPS de *Escherichia coli*, la LPG de *Leishmania amazonensis*, la proteína M1 de *Streptococcus pyogenes* y la leucotoxina de *Mannheimia Haemolytica*^{7,28,33,38}.

Como se mencionó anteriormente, estas ET son inducidas tras la activación de los neutrófilos, y se ha descrito ampliamente que depende en muchos casos de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que el uso de inhibidores de la NADPH oxidasa bloquea su formación³⁹. Además, los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, enfermedad caracterizada por la presencia de neutrófilos marcadamente deficientes en su capacidad para destruir

algunas especies bacterianas debido a la carencia de la NADPH oxidasa, no son capaces de formar NET⁴⁰. En 2009, Bianchi, et al. observaron que, al corregir la alteración con terapia génica de un paciente con enfermedad granulomatosa crónica, se logra restaurar su capacidad de producción de ROS y, por consiguiente, de generar NET⁴⁰. Adicionalmente, y como se ha mencionado previamente, al evaluar la capacidad de formación de NET, se ha encontrado que, aunque la producción de ROS es necesaria, no es suficiente para la inducción²⁵.

Por otro lado, en bovinos se ha señalado al β -hidroxibutirato como inhibidor de la formación de NET y su incremento, tanto en sangre como en la leche de vacas con mastitis, como posible responsable de la afectación que presentan los neutrófilos en su función en esta enfermedad¹⁵.

Componentes de las NET

Se ha analizado con gran detalle y se ha reportado que el componente mayoritario de las NET es el ADN, el cual forma las fibras sobre las cuales se encuentran «pegadas» diferentes moléculas contenidas en el citoplasma o en los gránulos de los neutrófilos, por lo que el uso de DNAsa las desintegra⁷. La mayoría de los reportes señalan que el ADN que se encuentra en las NET es de origen nuclear, pero Yousefi, et al., en 2009, mostraron que las NET producidas por los neutrófilos en respuesta al estímulo inicial con GM-CSF y posteriormente con el componente C5a del complemento o activándolos a través de TLR-4 pueden contener ADN mitocondrial y no nuclear, lo que no implica la muerte del neutrófilo; incluso han señalado que los neutrófilos que emiten este tipo de NET sobreviven más tiempo en comparación con los neutrófilos no activados⁴¹. Este reporte es similar a lo encontrado para eosinófilos, los cuales liberan ADN mitocondrial (liberación denominada «tipo catapulta») para combatir patógenos⁴². Lo anterior implica interesantemente que el origen del ADN liberado puede variar dependiendo del estímulo que se reciba.

En su descripción original, Brinkmann, et al. mencionan, además del ADN, la presencia de histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4), elastasa, catepsina G, mieloperoxidasa, lactoferrina y gelatinasa, y descartan la presencia de anexina I, actina, α -tubulina y citocromo C, entre otros⁷.

Urban, et al., en 2009, haciendo un estudio proteómico en las NET, identificaron 24 proteínas asociadas a estas ET. El análisis cuantitativo de estas proteínas

Tabla 1. Principales componentes de las NET

Componente	Localización celular	Referencia*
Elastasa	Gránulos	Brinkmann V, et al. ⁷
Mieloperoxidasa	Gránulos	Brinkmann V, et al. ⁷
Catepsina G	Gránulos	Brinkmann V, et al. ⁷
BPI	Gránulos	Brinkmann V, et al. ⁷
Lactoferrina	Gránulos	Brinkmann V, et al. ⁷
Gelatinasa	Gránulos	Brinkmann V, et al. ⁷
ADN	Núcleo	Brinkmann V, et al. ⁷
Histona H1	Núcleo	Brinkmann V, et al. ⁷
Histona H2A	Núcleo	Brinkmann V, et al. ⁷
Histona H2B	Núcleo	Brinkmann V, et al. ⁷
Histona H3	Núcleo	Brinkmann V, et al. ⁷
Histona H4	Núcleo	Brinkmann V, et al. ⁷
Actina	Citoesqueleto	Urban, et al. ³⁵
Miosina-9	Citoesqueleto	Urban, et al. ³⁵
Calprotectina	Citoplasma	Urban, et al. ³⁵
Lisozima C	Gránulos	Urban, et al. ³⁵
Azurocidina	Gránulos	Urban, et al. ³⁵
Catalasa	Peroxisoma	Urban, et al. ³⁵
ADN	Mitocondria	Yousefi, et al. ⁴¹
LL37	Gránulos	Papayannopoulos, et al. ⁴⁹

*Sólo se incluye la referencia en que se identificó por primera vez.

y el análisis por microscopía electrónica de alta resolución mostró que las NET son estructuras formadas por ADN, histonas modificadas y proteínas contenidas originalmente en gránulos o en el citoplasma de los neutrófilos³⁵. En la tabla 1 se enumeran, a manera de resumen, los principales componentes identificados en las NET; el análisis de sus componentes permite entender la capacidad microbicida de estas estructuras.

Cabe mencionar que las histonas H2A, H2B, H3 y H4 son las proteínas más abundantes en las NET, ya que representan el 70% del total de proteínas asociadas a estas estructuras, siendo la H2A y la H2B las que se encuentran en mayor proporción³⁵. Con respecto a sus efectos sobre los microorganismos, se sabe que las histonas, así como péptidos derivados de ellas, tienen actividades antimicrobianas⁴³⁻⁴⁵. Se ha

descrito que las histonas están en las NET de manera hipercitrulinada, producto de una modificación posttransduccional, catalizada por la enzima PAD4, en la que los residuos de arginina de las histonas pasan a citrulina, lo que favorece la descondensación de la cromatina del neutrófilo⁴⁶.

La elastasa del neutrófilo es la segunda proteína en abundancia presente en las NET, después de las histonas. Representa el 5.84% del total de proteínas presentes y tiene actividad proteolítica (es una serín proteasa). La elastasa de los neutrófilos es una molécula efectora clave de la respuesta inmune innata, ya que presenta una potente actividad antimicrobiana; sin embargo, puede participar en la remodelación del tejido y en la respuesta inflamatoria local. Entre sus principales funciones se encuentra la digestión del tejido conectivo, así como de componentes de la matriz

extracelular, incluyendo varios tipos de colágena, fibronectina, proteoglicanos y heparina, entre otros. Induce también la secreción de citocinas, glicosaminoglicanos y mucina, además de actuar como un modulador de la inflamación⁴⁷. La elastasa actúa además catalizando precursores de citocinas y receptores, involucrándose en el control de la bioactividad de éstas y en su biodisponibilidad⁴⁸. Papayannopoulos, et al., en 2010, describieron que durante la formación de las NET la elastasa escapa de sus gránulos y se transloca al núcleo, donde degrada histonas específicas, favoreciendo la descondensación de la cromatina, lo cual se ve favorecido en un evento posterior, gracias a la mieloperoxidasa⁴⁹. El mismo grupo de trabajo ha señalado la importancia de la mieloperoxidasa en la formación de las ET, ya que los neutrófilos de pacientes carentes de esta enzima no tienen la capacidad de hacer NET⁵⁰.

La catepsina G es una serín proteasa neutra que, al igual que la elastasa y la proteasa-3, hidroliza diferentes sustratos que también pueden ser procesados por la quimotripsina. La catepsina G presenta una actividad intralisosomal bactericida, participa en la activación de plaquetas y en la degradación de factores de coagulación, y actúa además catalizando precursores de citocinas y receptores, involucrándose en el control de la bioactividad y biodisponibilidad de estos, al igual que la elastasa^{5,48,51}.

La calprotectina es un heterodímero de proteínas que unen calcio perteneciente a la familia S100, la cual fue originalmente descubierta como una proteína antimicrobiana presente en el citoplasma de neutrófilos y, posteriormente, se describió como un biomarcador de inflamación⁵². La calprotectina presenta claras propiedades bacteriostáticas y fungicidas, y sus niveles plasmáticos se elevan 5-40 veces en presencia de procesos infecciosos y/o inflamatorios⁵³.

En resumen, las proteínas presentes en las NET y la conjunción de todas estas con las fibras de ADN limitan la diseminación de diversos microorganismos. Sin embargo, muchos de estos componentes son nocivos además para las células propias ubicadas en la periferia de estas estructuras, de ahí que la degradación de las NET sea muy importante para mantener la homeostasis tisular.

Destrucción de NET y enfermedad

Como se ha descrito previamente, la liberación de NET participa en la captura y muerte de varios patógenos en el espacio extracelular, pero el tiempo en

que deben removerse las NET es crucial para evitar la destrucción tisular y, en consecuencia, la presentación de autoantígenos. Actualmente se sabe que la encargada del desmantelamiento de estas estructuras es la endonucleasa sérica DNasa 1. Se ha visto que algunos pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) degradan pobremente a las NET, y se han contemplado dos mecanismos, uno que implica que hay una función deficiente de la DNasa 1 y otro que implica la presencia de inhibidores de la misma²².

La degradación de las NET también ha sido aprovechada por diversos microorganismos como un mecanismo de evasión que favorece el establecimiento de la infección. Varias bacterias patógenas, como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y *Streptococcus pyogenes*, expresan nucleasas y recientemente se ha encontrado que las DNasas localizadas en estas membranas bacterianas son capaces de degradar a las NET, *in vitro*. En estudios *in vivo*, se ha reportado que *Streptococcus pyogenes* deficiente en Sda1 (DNasa) es menos virulento que las respectivas cepas silvestres, ya que Sda1 incrementa la resistencia a la eliminación por neutrófilos humanos y de ratón en estas bacterias⁵⁴⁻⁵⁶. Al igual que con *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* ha mostrado una característica similar al escapar de las NET gracias a una DNasa que expresa en su superficie y que favorece una eliminación retardada en el tracto respiratorio, incrementando la mortalidad de los ratones infectados después del inóculo intranasal⁵⁷.

Consideraciones finales

Se pensaba que sabíamos todo acerca de los mecanismos microbicidas de los neutrófilos; sin embargo, la descripción de la formación de las NET ha hecho resurgir el interés por su estudio, entre otras cosas, debido a que la formación de estas redes ha sido asociada a diferentes enfermedades, como las infecciosas –incluida la sepsis grave– y las autoinmunes, entre otras. Hasta la fecha, la mayor parte de los estudios consideran que las NET pueden estar limitando la diseminación microbiana y el daño colateral que causa el contenido de sus gránulos, al no dejar que este difunda y concentrando ambas cosas: microorganismos y moléculas. Se ha llegado a plantear a las NET como un marcador predictivo en pacientes gravemente enfermos y, además, como responsables de la fisiopatología de algunas enfermedades^{58,59}.

Finalmente, cabe mencionar que los neutrófilos no son las únicas células que tienen la capacidad de

formar estas «redes o fibras». Se ha observado que tanto las células cebadas como los eosinófilos son capaces también de liberar ET^{42,60,61}. Con base en lo anterior, Wartha y Henriques-Normark han sugerido que, de manera general, se denomine como etosis a esta forma de muerte celular, aunque la mayoría de los autores mantienen el término netosis para referirse específicamente a la etosis presentada por los neutrófilos⁶².

Agradecimientos

Luvia Enid Sánchez-Torres es becaria EDI-IPN, COFAA-IPN y SNI-CONACYT; Liliána García-Marín es becaria PIFI-IPN (proyectos SIP-20090430 y 20100479), y Juan Carlos Yam-Puc es becario CONACYT (registro 49896).

Bibliografía

- Kennedy AD, DeLeo FR. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res.* 2009;43(1-3):25-61.
- Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(3):173-82.
- Quinn MT, Ammons MC, DeLeo FR. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. *Clin Sci (Lond).* 2006;111(1):1-20.
- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol.* 2005;77(5):598-625.
- Campanelli D, Detmers PA, Nathan CF, Gabay JE. Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils. Differential antimicrobial and proteolytic properties. *J Clin Invest.* 1990;85(3):904-15.
- Pereira HA, Shafer WM, Pohl J, Martin LE, Spitznagel JK. CAP37, a human neutrophil-derived chemotactic factor with monocyte specific activity. *J Clin Invest.* 1990;85(5):1468-76.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-5.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007;176(2):231-41.
- Sánchez-Torres L, Diosdado-Vargas F. Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Técnica Pecuaria en México.* 2003;41(1):49-62.
- Remijsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, et al. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* 2011;21(2):290-304.
- Pilszczek FH, Salina D, Poon KK, et al. A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 2010;185(12):7413-25.
- Ermert D, Urban CF, Laube B, Goosmann C, Zychlinsky A, Brinkmann V. Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *J Innate Immun.* 2009;1(3):181-93.
- Chuammitri P, Ostojic J, Andreasen CB, Redmond SB, Lamont SJ, Palić D. Chicken heterophil extracellular traps (HETs): novel defense mechanism of chicken heterophils. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;129(1-2):126-31.
- Alghamdi AS, Foster DN. Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. *Biol Reprod.* 2005;73(6):1174-81.
- Grinberg N, Elazar S, Rosenshine I, Shpigel NY. Beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2008;76(6):2802-7.
- Wardini AB, Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, et al. Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. *J Gen Virol.* 2010;91(Pt 1):259-64.
- Palić D, Andreasen CB, Ostojic J, Tell RM, Roth JA. Zebrafish (*Danio rerio*) whole kidney assays to measure neutrophil extracellular trap release and degranulation of primary granules. *J Immunol Methods.* 2007;319(1-2):87-97.
- Palić D, Ostojic J, Andreasen CB, Roth JA. Fish cast NETs: neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. *Dev Comp Immunol.* 2007;31(8):805-16.
- Bruns S, Kniemeyer O, Hasenberg M, et al. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS Pathog.* 2010;6(4):e1000873.
- Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(8):577-82.
- Baker VS, Imade GE, Molta NB, et al. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age. *Malar J.* 2008;7:41.
- Hakim A, Furrrohr BG, Amann K, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(21):9813-8.
- Brinkmann V, Laube B, Abu Abed U, Goosmann C, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *J Vis Exp.* 2010;(36).
- Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Gebhardt S, Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum Immunol.* 2005;66(11):1146-54.
- Yost CC, Cody MJ, Harris ES, et al. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood.* 2009;113(25):6419-27.
- Marcos V, Zhou Z, Yildirim AO, et al. CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nat Med.* 2010;16(9):1018-23.
- Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarker U, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med.* 2009;15(6):623-5.
- Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(16):6748-53.
- Patel S, Kumar S, Jyoti A, et al. Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation. *Nitric Oxide.* 2010;22(3):226-34.
- Martinelli S, Urošević M, Daryadel A, et al. Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation. *J Biol Chem.* 2004;279(42):44123-32.
- Dolgushin II, Andreeva IuS. [Neutrophil extracellular traps: method of detection and assessment of bacterial trapping efficacy]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2009;(2):65-7.
- Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* 2007;13(4):463-9.
- Aulik NA, Hellenbrand KM, Klos H, Czuprynski CJ. *Mannheimia haemolytica* and its leukotoxin cause neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils. *Infect Immun.* 2010;78(11):4454-66.
- Ramos-Kichik V, Mondragón-Flores R, Mondragón-Castelán M, et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb).* 2009;89(1):29-37.
- Urban CF, Ermert D, Schmid M, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):e1000639.
- Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.* 2006;8(4):668-76.
- Behrendt JH, Ruiz A, Zahner H, Taubert A, Hermsilla C. Neutrophil extracellular trap formation as innate immune reactions against the apicomplexan parasite *Eimeria bovis*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010;133(1):1-8.
- Lauth X, von Köckritz-Blickwede M, McNamara CW, et al. M1 protein allows Group A streptococcal survival in phagocyte extracellular traps through cathelicidin inhibition. *J Innate Immun.* 2009;1(3):202-14.
- Steinberg BE, Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci STKE.* 2007;2007(379):pe11.
- Bianchi M, Hakim A, Brinkmann V, et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood.* 2009;114(13):2619-22.
- Yousefi S, Mihalache C, Kozłowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2009;16(11):1438-44.
- Yousefi S, Gold JA, Andina N, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med.* 2008;14(9):949-53.
- HIRSCH JG. Bactericidal action of histone. *J Exp Med.* 1958;108(6):925-44.
- Lee DY, Huang CM, Nakatsuji T, et al. Histone H4 is a major component of the antimicrobial action of human sebocytes. *J Invest Dermatol.* 2009;129(10):2489-96.
- Rose FR, Bailey K, Keyte JW, Chan WC, Greenwood D, Mahida YR. Potential role of epithelial cell-derived histone H1 proteins in innate antimicrobial defense in the human gastrointestinal tract. *Infect Immun.* 1998;66(7):3255-63.

46. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol.* 2009;184(2):205-13.
47. Chua F, Laurent GJ. Neutrophil elastase: mediator of extracellular matrix destruction and accumulation. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(5):424-7.
48. Bank U, Ansorge S. More than destructive: neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control. *J Leukoc Biol.* 2001;69(2):197-206.
49. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010;191(3):677-91.
50. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood.* 2011;117(3):953-9.
51. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* 1997;89(10):3503-21.
52. Bunn SK, Bissett WM, Main MJ, Gray ES, Olson S, Golden BE. Fecal calprotectin: validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001;33(1):14-22.
53. Dale I, Fagerhol MK, Naesgaard I. Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen. *Eur J Biochem.* 1983;134(1):1-6.
54. Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, et al. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol.* 2006;16(4):396-400.
55. Medina E. Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host. *J Innate Immun.* 2009;1(3):176-80.
56. Urban CF, Lourido S, Zychlinsky A. How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol.* 2006;8(11):1687-96.
57. Berends ET, Horswill AR, Haste NM, Monestier M, Nizet V, von Kockritz-Blickwede M. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun.* 2010;2(6):576-86.
58. Lögters T, Margraf S, Altrichter J, et al. The clinical value of neutrophil extracellular traps. *Med Microbiol Immunol.* 2009;198(4):211-9.
59. Lögters T, Paunel-Görgülü A, Zilkens C, et al. Diagnostic accuracy of neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs) for septic arthritis. *J Orthop Res.* 2009;27(11):1401-7.
60. Von Kockritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood.* 2008;111(6):3070-80.
61. Von Kockritz-Blickwede M, Nizet V. Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. *J Mol Med.* 2009;87(8):775-83.
62. Wartha F, Henriques-Normark B. ETosis: a novel cell death pathway. *Sci Signal.* 2008;1(21):pe25.