

Tesis Doctoral

# Rol de la proteína A en la activación y regulación de la sobrevivencia de neutrófilos durante las infecciones por *Staphylococcus aureus*

Garófalo, Ailin Natalia

2016-11-24

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Garófalo, Ailin Natalia. (2016-11-24). Rol de la proteína A en la activación y regulación de la sobrevivencia de neutrófilos durante las infecciones por *Staphylococcus aureus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Garófalo, Ailin Natalia. "Rol de la proteína A en la activación y regulación de la sobrevivencia de neutrófilos durante las infecciones por *Staphylococcus aureus*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-11-24.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**“Rol de la proteína A en la activación y regulación de la sobrevivencia de neutrófilos durante las infecciones por *Staphylococcus aureus*”**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el  
área **CIENCIAS BIOLÓGICAS.**

**Lic. Ailin Natalia Garófalo.**

Director de tesis: Dra. Marisa Inés Gómez.

Consejero de Estudios: Dr. Norberto Iusem.

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica.  
(IMPam)-UBA-CONICET. Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología.  
Facultad de Medicina- Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2016

## **“Rol de la proteína A en la activación y regulación de la sobrevivencia de neutrófilos durante las infecciones por *Staphylococcus aureus*”**

*Staphylococcus aureus* es un patógeno oportunista el cual posee múltiples mecanismos que le permiten evadir la respuesta inmune del huésped y una variedad de factores de virulencia que contribuyen al desarrollo de infección en diversos sitios. Las infecciones por *S. aureus* se caracterizan por una fuerte respuesta inflamatoria mediada por la presencia de neutrófilos que son reclutados al sitio de la infección. Se ha demostrado el rol crítico de la proteína A (SpA) en el desarrollo de neumonía mediante la inducción de las cascadas de señalización de TNF- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , las cuales conducen a la producción de mediadores inflamatorios y al reclutamiento de neutrófilos. Asimismo SpA induce cascadas de señalización pro-inflamatorias en células mieloides y en células no inmunes.

El objetivo general del presente trabajo fue determinar el rol de la proteína A de *S. aureus* en la activación y secreción de mediadores pro-inflamatorios en neutrófilos humanos así como su capacidad de regular la sobrevivencia de los mismos. Se demostró que *S. aureus* y la proteína A contribuyen a modular el perfil inflamatorio de los neutrófilos en forma temprana mediante la inducción de citoquinas inflamatorias y quimioquinas. *S. aureus* indujo la activación de MAPKs contribuyendo a la producción de IL-8 y TNF- $\alpha$  por los neutrófilos. El estímulo con *S. aureus* provocó además la expresión sostenida de señales pro-inflamatorias hasta las 22 horas luego de la estimulación. La exposición prolongada de los neutrófilos a *S. aureus* indujo un aumento en los niveles de mortalidad y cambios en la proporción de neutrófilos apoptóticos/necróticos con un incremento de la proporción de necrosis. No obstante, la expresión de SpA resultó crítica para prevenir parcialmente la necrosis masiva de los neutrófilos favoreciendo la muerte por apoptosis. Nuestros resultados sugieren que la proteína A de *S. aureus* desempeñaría un rol pro-inflamatorio durante el encuentro inicial con los neutrófilos lo cual contribuiría a la inducción de un microambiente pro-inflamatorio incrementando la sobrevivencia de los neutrófilos. En estadios posteriores, la expresión de proteína A desempeñaría un rol anti-inflamatorio ya que contribuiría a prevenir la necrosis masiva y disminuir los efectos deletéreos que la inflamación exacerbada podría tener sobre la bacteria.

**Palabras claves:** *Staphylococcus aureus*, Proteína A, Neutrófilos, Inflamación, Mortalidad.

## **"Role of protein A in the activation and regulation of neutrophil survival during *Staphylococcus aureus* infections"**

*Staphylococcus aureus* is an opportunistic pathogen with multiple mechanisms to evade the host immune response and a variety of virulence factors that contribute to the development of infection at different host niches. *S. aureus* infections are characterized by a strong inflammatory response that leads to the recruitment of neutrophils to the site of infection. The critical role of protein A (SpA) in the development of pneumonia mediated by TNF- $\alpha$  and IFN- $\beta$  signaling cascades, which lead to the production of inflammatory mediators and neutrophil recruitment, has been previously demonstrated. SpA also induces pro-inflammatory signaling cascades in myeloid cells and non-immune cells.

The aim of this study was to determine the role of *S. aureus* protein A in the activation and secretion of pro-inflammatory mediators by human neutrophils as well as its capability to regulate neutrophil survival. We demonstrated that *S. aureus* and protein A contributed to modulate the early inflammatory response of neutrophils by inducing inflammatory cytokines and chemokines. *S. aureus* induced MAPKs activation which contributed to the production of IL-8 and TNF- $\alpha$  by neutrophils. *S. aureus* induced sustained production of pro-inflammatory signals up to 22 hours after stimulation. Prolonged exposure of neutrophils to *S. aureus* caused an increase in mortality levels and induced changes in the ratio of apoptotic/necrotic neutrophils with an increased proportion of necrosis. Nonetheless, the expression of SpA was critical to partially prevent massive neutrophil necrosis promoting death through apoptosis. These results suggest that *S. aureus* protein A may play a pro-inflammatory role during the initial encounter with neutrophils which contribute to the induction of a pro-inflammatory microenvironment increasing of survival neutrophils. At later stages, protein A expression may play an anti-inflammatory role would contribute to prevent massive necrosis of neutrophils and ameliorate the deleterious effects of inflammation in bacterial survival.

**Key words: *Staphylococcus aureus*, Protein A, Neutrophils, Inflammation, Mortality.**

## **Agradecimientos**

*Agradezco a la Dra. Marisa Gómez por recibirme en su laboratorio y darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y bajo su dirección poder llevar a cabo mi Tesis. Agradezco a “las chicas del grupo”: Coty, Cin, Andre y Cami, sin su ayuda muchos de estos experimentos no se podrían haber llevado a cabo, gracias por todos los momentos compartidos, por las discusiones sobre ciencia y de la vida, hermosas personas y excelentes profesionales.*

*Agradezco a toda la gente del IMPAM a los que ya no están y aquellos nuevos y no tan nuevos integrantes que siempre están a disposición y por la buena onda de siempre.*

*Agradezco al Dto. De Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires y al nuevo Instituto de Microbiología y Parasitología Médicas (IMPAM) por haber sido el lugar en el que desarrollé mis actividades científico académicas y sus directores durante el transcurso de esta Tesis, la Dra. Cerquetti, el Dr. Oubiña y al Dr. Sordelli. A la Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología y el CONICET Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas otorgadas. Además, a los subsidios otorgados por la UBA, la Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología y el CONICET que permitieron la realización de este trabajo.*

*Agradezco a la Dra. Analía Trevani junto a todo su grupo de trabajo: Laura Gabelloni, Florencia Sabbione, Leonardo Iula e Irene Keitelman en la Academia Nacional de Medicina-IMEX, sin su entera y desinteresada colaboración esta Tesis no hubiera podido llevarse a cabo. Gracias por recibirme en su laboratorio y enseñarme todo lo que se de los neutrófilos y por todos los momentos compartidos, hermosas personas y excelentes profesionales.*

*Agradezco a la Dra. Daniela Ureta, profesional encargada del citómetro de flujo del IDHEU por la predisposición y tiempo dedicado.*

*Agradezco a los jurados por la buena predisposición al aceptar ser Jurados y por el tiempo dedicado a este manuscrito.*

*Por último, hay un grupo de personas que, sin saberlo y sin estar físicamente en el laboratorio o en los cursos o en los ámbitos académicos que frecuenté durante la tesis, estuvieron presentes haciéndome el aguante.*

*Quizás no dimensiona lo que significan para mí sus charlas, su paciencia, sus preguntas, su aliento o simplemente sus abrazos contenedores. Sin lugar a dudas todos ellos fueron combustible para seguir adelante en esta etapa: Leandro mi amor y compañero siempre al pie del cañón apuntando o retando cuando hace falta, a mi madre, mi padre, mis hermanos, "el cuña" y a mi familia de la vida siempre presentes e incondicionales. A mis amigos incondicionales desde hace tantos años: Nadia; Cons; Eve; Juli; Marie; Romi; Manu; Leo y Fran.*

*Por último quiero agradecerle a alguien que definitivamente no entiende nada de todo esto, pero que me bancó absolutamente todos los rayes, ausencias y "los ahora no puedo, jugamos en un ratito"... GRACIAS A VOS, MAITE, HIJITA, SOS LO MAS IMPORTANTE EN ESTA VIDA...¡¡TE QUIERO TANTO TANTO!!*

*A mi familia,  
A Leandro y Maite,  
lo más hermoso que la vida me dio.*

## ÍNDICE

Carátula	
Resumen.....	I
Abstract.....	II
Agradecimientos.....	III
Dedicatoria.....	V
Índice.....	VI
Trabajos realizados durante el periodo de Tesis: Congreso y Publicaciones.....	IX
Abreviaturas.....	XI
<b>1. INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> : UN PATÓGENO OPORTUNISTA.....	2
1.2. <i>S. aureus</i> COMO PATÓGENO NOSOCOMIAL Y DE LA COMUNIDAD.....	2
1.3. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE <i>S. aureus</i> .....	3
1.3.1. ADHESIÓN, INVASIÓN Y DAÑO DE LOS TEJIDOS.....	3
1.3.2. INDUCCIÓN DE RESPUESTA INFLAMATORIA.....	5
1.3.2.1. Estructuras de <i>S. aureus</i> reconocidas por TLRs y NOD.....	5
1.3.2.2. TNFR1 y EGFR.....	6
1.3.3. EVASIÓN DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA DEL HUÉSPED.....	7
1.4. PROTEÍNA A DE <i>S. aureus</i> .....	8
1.4.1. Caracterización estructural.....	8
1.4.2. FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA PROTEÍNA A Y SU ROL EN VIRULENCIA.....	9
1.4.2.1. Funciones biológicas ejercidas por la región amino terminal.....	9
i. Inhibición de la fagocitosis.....	9
ii. Apoptosis de linfocitos B.....	9
iii. Activación de plaquetas.....	10
iv. Inducción de respuesta inflamatoria y regulación de la Inflamación.....	10
1.4.2.2. Funciones biológicas ejercidas por la región carboxi-terminal.....	12
1.5. LOS NEUTRÓFILOS Y SU ROL EN LAS INFECCIONES BACTERIANAS.....	12
1.5.1. Mecanismos de fagocitosis y mecanismos microbicidas de los neutrófilos.....	13
1.5.2. Inducción de respuesta inflamatoria.....	14
1.5.3. Producción de citoquinas y quimioquinas por los neutrófilos.....	15
1.6. MECANISMOS REGULATORIOS DE LA SOBREVIVENCIA DE LOS NEUTRÓFILOS.....	16
1.6.1. Apoptosis.....	17
1.6.1.1. Vía Intrínseca.....	18
1.6.1.2. Vía Extrínseca.....	18

1.6.2. Necrosis.....	19
1.7. Subversión de los mecanismos de muerte de <i>S. aureus</i> mediados por los neutrófilos.....	20
1.8. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	22
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
2.1. SOLUCIONES Y REACTIVOS.....	25
2.2. CEPAS BACTERIANAS Y MEDIOS DE CULTIVO.....	25
2.3. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	26
2.3.1. Expresión de proteínas recombinantes.....	26
2.3.2. Purificación de proteínas de fusión a GST.....	27
2.3.3. Determinación del grado de pureza e integridad de las proteínas purificadas.....	27
2.3.4. Cuantificación de las proteínas aisladas.....	28
2.4. CÉLULAS Y MEDIOS DE CULTIVO CELULAR.....	28
2.4.1. Obtención de neutrófilos.....	28
2.4.2. Estimulación de los neutrófilos.....	29
2.5. DETECCIÓN DE ARNm PARA CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS.....	30
2.5.1. Extracción y cuantificación de ARN total.....	30
2.5.2. Extracción y cuantificación de ADN genómico total.....	31
2.5.3. Preparación de ADNc a partir del ARN total.....	32
2.5.4. PCR de tiempo real.....	33
2.6. ELISA.....	35
2.7. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS POR WESTERN BLOT.....	36
2.7.1. Obtención de lisados proteicos.....	36
2.7.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida y transferencia.....	36
2.7.3. Detección inmunológica de las proteínas fosforiladas.....	36
2.8. MARCACIÓN DE ANTÍGENOS DE SUPERFICIE POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	37
2.9. CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD, APOPTOSIS Y NECROSIS DE LOS NEUTRÓFILOS.....	37
2.10. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA.....	38
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
3.1. INDUCCIÓN DE RESPUESTA INFLAMATORIA EN NEUTRÓFILOS POR LA PROTEÍNA A DE <i>S. aureus</i> .....	40
3.1.1. La proteína A induce la expresión y producción de citoquinas inflamatorias.....	40
3.1.2. La proteína A induce la expresión y producción de quimioquinas inflamatorias.....	43
3.1.3. Conclusiones Parciales.....	48

3.2. INDUCCIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS EN NEUTRÓFILOS POR <i>S. aureus</i> : CONTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA A.....	48
3.2.1. Inducción de citoquinas inflamatorias por <i>S. aureus</i> en neutrófilos.....	48
3.2.2. Inducción de quimioquinas por <i>S. aureus</i> en neutrófilos.....	50
3.2.3. Conclusiones Parciales.....	53
3.3. ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE MAPKs EN NEUTRÓFILOS POR <i>S. aureus</i> y LA PROTEÍNA A.....	54
3.3.1 Conclusiones parciales.....	56
3.4. IMPACTO DE LA ESTIMULACIÓN CON <i>S. aureus</i> EN LA SOBREVIDA DE LOS NEUTRÓFILOS: CONTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA A.....	57
3.4.1. Inducción sostenida de citoquinas y quimioquinas en respuesta al estímulo con <i>S. aureus</i> .....	57
3.4.2. Modulación de la supervivencia de los neutrófilos.....	59
3.4.3. Conclusiones parciales.....	64
<b>4. DISCUSION.....</b>	<b>66</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>78</b>
5.1. CONCLUSIONES.....	79
5.2. CONCLUSION GENERAL.....	79
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>80</b>

**Los resultados del presente trabajo han sido presentados en las siguientes reuniones científicas y forman parte de un manuscrito en preparación:**

LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología que se realizará en el Hotel Intersur “13 de julio” de la ciudad de Mar del Plata del 19 al 22 de noviembre de 2014 en forma conjunta con la Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC).

Presentación en sesión de posters. ***Staphylococcus aureus* protein A induces inflammatory cytokines and chemokines in human neutrophils and regulates their survival.** Garofalo, Ailin; Gai, Constanza; González, Cintia; Ledo, Camila; Sabbione, Florencia; Trevani, Analia; Gómez, Marisa.

LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología SAI 2011, 19 al 21 de octubre 2011. Presentación en sesión de posters. P066. **La proteína A de *S. aureus* induce la activación de neutrófilos con perfil de tipo I y II.** Garofalo Ailin; Gai Constanza; Gabelloni María Laura; Sabbione Florencia; Trevani Analia; Gómez Marisa.

**Participación en publicaciones no relacionadas con el tema de tesis durante el doctorado:**

1: Gai C, Gonzalez CD, Sabbione F, **Garofalo A**, Ojeda D, Sordelli DO, Trevani AS, Gómez MI. ***Staphylococcus aureus* Induces Shedding of IL-1RII in Monocytes and Neutrophils.** J Innate Immun. 2016; 8 (3):284-98. doi: 10.1159/000443663. Epub 2016 Mar 12. PubMed PMID: 26967533.

2: Gonzalez CD, Ledo C, Gai C, **Garófalo A**, Gómez MI. **The Sbi Protein Contributes to *Staphylococcus aureus* Inflammatory Response during Systemic Infection.** PLoS One. 2015 Jun 30; 10 (6):e0131879. doi: 10.1371/journal.pone.0131879. eCollection 2015. PubMed PMID: 26126119; PubMed Central PMCID: PMC4488394.

3: Gai C, Gonzalez C, Ledo C, **Garofalo A**, Di Genaro MS, Sordelli DO, Gómez MI. **Shedding of tumor necrosis factor receptor 1 induced by protein A decreases tumor necrosis factor alpha availability and inflammation during systemic *Staphylococcus aureus* infection.** Infect Immun. 2013 Nov; 81 (11):4200-7. doi: 10.1128/IAI.00593-13. Epub 2013 Sep 3. PubMed PMID: 24002060; PubMed Central PMCID: PMC3811831.

4: **Garofalo A**, Gai C, Lattar S, Gardella N, Mollerach M, Kahl BC, Becker K, Prince AS, Sordelli DO, Gómez MI. **The length of the *Staphylococcus aureus* protein A polymorphic region regulates inflammation: impact on acute and chronic infection.** J Infect Dis. 2012 Jul 1; 206 (1):81-90. doi: 10.1093/infdis/jis311. Epub 2012 Apr 25. PubMed PMID: 22535996.

## Abreviaturas

Abs: absorbancia  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
ARN: ácido ribonucleico  
ARNm: ácido ribonucleico mensajero  
BSA: albúmina sérica bovina  
CHIPS: del inglés: “chemotaxis inhibitory protein of *S. aureus*”  
ClfA: del inglés: “clumping factor A”  
CXC: quimioquina  
Da: Dalton  
DAPMs: del inglés: “danger-associated molecular patterns”  
DO: densidad óptica  
EDTA: ácido etilendiamino tetracético  
Efb: del inglés: “Extracellular fibrinogen binding protein”  
Ecb: del inglés: “extracellular complement-binding protein”  
EGFR: del inglés: “Epidermal growth factor receptor”  
g: fuerza de gravedad  
gr: gramo  
GRO- $\alpha$ : del inglés “chemokine growth-regulated protein alpha”(o CXCL1)  
GST: Glutathion S transferasa  
HAS: albúmina sérica humana  
IFN- $\beta$ : interferon beta  
IFN- $\gamma$ : interferon gamma  
Ig: inmunoglobulina  
IL: interleuquina  
IL-1 $\beta$ : interleuquina 1 beta  
IL-1RII: del inglés: “interleukin 1 receptor type II”  
IL-8: interleuquina 8 (o CXCL8)  
IP-10: del inglés: “IFN-gamma-inducible protein 10” (o CXCL10)  
IPTG: Isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactosido  
kDa: kilodalton  
LPS: lipopolisacárido  
LTA: del inglés: “lipoteichoic acid”  
 $\mu$ g: microgramo  
 $\mu$ l: microlitro  
M: molar  
 $\mu$ M: micromolar  
mA: miliamper  
MAPKs: del inglés: “Mitogen-activated protein kinases”  
MCP-1: del inglés: “Monocyte chemotactic protein-1” (o CCL2)  
min: minutos  
MIP-1 $\alpha$ : del inglés “Macrophage Inflammatory Protein-1” (o CCL3)  
ml: mililitro  
mM: milimolar  
MOI: multiplicidad de infección  
MSCRAMMs: del inglés: “microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules”  
NF $\kappa$ B: del inglés: “nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”  
ng: nanogramo  
nM: nanomolar  
nm: nanometro  
NOD: del inglés: “nucleotide-binding oligomerization domain proteins”  
ON: del inglés: “over night”  
PAMPs: del inglés: “pathogen-associated molecular patterns”  
Pb: Pares de bases  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
pg: picogramo  
PICD: del inglés: “phagocytosis-induced cell death”

PMA: del inglés: “forbol-12-miristato 13-acetato”  
rpm: revoluciones por minuto  
PRRs: del inglés: “pathogen recognition receptors”  
RT: retrotranscripción o retrotranscriptasa  
PSM: del inglés: “phenol-soluble modulins”  
PVL: del inglés: “Panton-Valentine Leukocidin”  
Sbi: del inglés: “Staphylococcal immunoglobulin-binding protein”  
SCV: del inglés: “small-colony variant”  
SCIN: del inglés: “staphylococcal complement inhibitor”  
SFB: suero fetal bovino  
SDS: Dodesil Sulfato de Sodio  
Seg: segundos  
SpA: Proteína A  
SSL: del inglés: “staphylococcal superantigen-like protein”  
SSR: Secuencias cortas repetitivas, del inglés “Short Sequence Repeats”  
TACE: del inglés: “TNF- $\alpha$  converting enzyme”  
TCR: del inglés: “T cell receptor”  
TLRs: del inglés: “Toll- like receptors”  
Tm: temperatura de disociación  
TMB: tretametilbencidina  
TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa  
TNFR1: del inglés: “tumor necrosis factor receptor 1”  
UFC: Unidades Formadoras de Colonias  
V: voltios  
vWF: Factor von Willebrand

# ***INTRODUCCION***

### **1.1. *Staphylococcus aureus*: UN PATÓGENO OPORTUNISTA.**

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia Micrococcaceae. Las bacterias que integran el género se caracterizan por ser cocos gram positivos y anaerobios facultativos, los cuales al dividirse quedan parcialmente adheridos por lo que presentan una agrupación característica en racimos irregulares. Los estafilococos son inmóviles, catalasa-positivos, oxidasa-negativos y no forman esporas. Entre las especies pertenecientes a este género, *Staphylococcus aureus* posee gran importancia médica. Se caracteriza por producir coagulasa (Willett *et al.*, 1986) y la pigmentación dorada de sus colonias permite distinguirla de otras especies de *Staphylococcus* (Lowy *et al.*, 1998).

*S. aureus* es parte de la microflora humana normal. Asimismo, las personas sanas pueden estar colonizadas de manera persistente (20%) o transitoria (60%), mientras que existe una porción de la población que no se encuentra colonizada (Fournier *et al.*, 2005). La tasa de colonización es más elevada en diabéticos insulino-dependientes, individuos infectados con VIH, pacientes sometidos a hemodiálisis y personas con lesiones cutáneas (Lowy *et al.*, 1998). La parte anterior de las fosas nasales es el sitio más frecuente de colonización, aunque también coloniza piel y orofaringe. Estos sitios de colonización sirven de reservorio para la bacteria y ante la falla de alguno de los mecanismos de defensa innatos pueden replicar y iniciar el proceso infeccioso por lo cual las personas colonizadas con *S. aureus* corren un riesgo de infección subsiguiente mayor que los individuos no colonizados (Lowy *et al.*, 1998 y Wertheim *et al.*, 2005).

### **1.2. *S. aureus* COMO PATÓGENO NOSOCOMIAL Y DE LA COMUNIDAD.**

*S. aureus* es un patógeno de gran importancia en infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad, ya que es causal de infecciones de piel y partes blandas, las cuales pueden diseminarse y causar infecciones invasivas tales como abscesos en órganos, neumonía, osteomielitis, endocarditis y sepsis (Lowy *et al.*, 2007 y Fournier *et al.*, 2005) siendo la mortalidad debida a complicaciones serias de dichas infecciones alta. Esta bacteria suele complicar infecciones virales y es la principal causa de neumonía asociada con asistencia respiratoria mecánica, lo cual la convierte en un problema frecuente en las unidades de cuidado intensivo (Lowy *et al.*, 1998 y Kaplan *et al.*, 2006). Es uno de los patógenos de mayor importancia en infecciones óseas, siendo el responsable de entre el 50% y el 70% de las osteomielitis en individuos adultos, asociado frecuentemente al implante de prótesis óseas (Que *et al.*, 2010 y Wright *et al.*, 2010). Asimismo, es causal frecuente de endocarditis en pacientes con catéteres intravenosos, prótesis valvulares o que reciben drogas por vía endovenosa (Lowy *et al.*, 1998).

*S. aureus* ha re-emergido como uno de los principales patógenos del ser humano y las infecciones invasivas por esta bacteria constituyen un gran problema para la salud pública dado el

incremento en la incidencia de cepas resistentes tanto a la meticilina como a la vancomicina, aún en individuos de la comunidad (Noskin *et al.*, 2007; Klevens *et al.*, 2007; Tokumoto *et al.*, 2007; Fridkin *et al.*, 2003; Tenover *et al.*, 2006 y Weigel *et al.*, 2003). Durante el brote del año 2005 las cepas resistentes a meticilina pertenecientes al clon ST8-IVc-PVL+, muchas de las cuales fueron adquiridas en la comunidad por hospedadores sanos, causaron más de 18.000 muertes en los Estados Unidos (Klevens *et al.*, 2007). En Argentina el principal clon recuperado de infecciones invasivas causadas por cepas metilino resistentes adquiridas de la comunidad ha sido por mucho tiempo el ST5-IV-PVL+, *spa* tipo 311. Sin embargo, el mismo está siendo reemplazado por el clon ST30-IVc-PVL+, *spa* tipo 019 (Fernández *et al.*, 2013).

### **1.3. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE *S. aureus*.**

La patogenicidad de *S. aureus* se debe a la acción coordinada de las múltiples toxinas, exoenzimas, adhesinas y proteínas inmunomoduladoras que es capaz de producir. Con excepción de las enfermedades causadas por una toxina específica, como es el caso de la enterotoxina, la toxina exfoliativa o la toxina del síndrome de shock tóxico, no existe un único factor responsable de las infecciones estafilocócicas. La acción coordinada de varios factores de virulencia, los cuales están anclados covalentemente a la pared celular o son secretados al medio extracelular, resulta en la habilidad del patógeno de adherirse a las células o tejidos, invadir y causar daño, así como también evadir el sistema inmune (Fournier *et al.*, 2005; Foster *et al.*, 2014 y Thammavongsa *et al.*, 2015). Asimismo, la expresión de los genes que constituyen factores de virulencia se encuentra rigurosamente controlada por numerosos sistemas regulatorios (Voyich *et al.*, 2009; Montgomery *et al.*, 2010; Watkins *et al.*, 2013; Flack *et al.*, 2014 y Hall *et al.*, 2015).

#### **1.3.1. ADHESIÓN, INVASIÓN Y DAÑO DE LOS TEJIDOS.**

*S. aureus* es un patógeno primariamente extracelular y puede adherirse a componentes de la matriz extracelular del hospedador para iniciar la colonización (Foster *et al.*, 1998). La adherencia a los tejidos del hospedador se encuentra mediada por proteínas denominadas adhesinas pertenecientes a la familia MSCRAMMs (del inglés: “microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules”) las cuales en la mayoría de los casos están covalentemente ancladas al peptidoglicano de la pared celular (Foster *et al.*, 1998). Estas no funcionan únicamente como inertes adhesinas, ya que a menudo son capaces de activar las defensas del hospedador (Foster *et al.*, 2014).

Entre los múltiples factores de virulencia involucrados en la etapa de invasión y daño a los tejidos se encuentran numerosas exoenzimas y exotoxinas, sumado a la capacidad de invadir y

replicar en diferentes tipos de células no-fagocíticas (Garzoni *et al.*, 2009; Fraunholz *et al.*, 2012 y Löffler *et al.*, 2014) y fagocíticas (Kubica *et al.*, 2008; Koziel *et al.*, 2009 y Thwaites *et al.*, 2011).

*S. aureus* produce una gran variedad de exotoxinas y exoenzimas las cuales pueden clasificarse en tres grandes grupos. El primer grupo comprende las toxinas citolíticas, las cuales se caracterizan por producir daños en la membrana, el segundo grupo está formado por las enterotoxinas y el tercero está constituido por las exoenzimas. Entre las toxinas citolíticas se encuentran la  $\alpha$ -toxina y las leucocidinas de dos componentes como PVL (del inglés: "Panton-Valentine Leukocidin"), LukAB (o LukGH), LukDE y la toxina gamma (Hlg AB, Hlg CB), las cuales se caracterizan además por ser reconocidas por un receptor en el huésped. Otras toxinas que actúan en forma independiente de un receptor son las modulinas solubles en fenol (PSM, del inglés: "phenol-soluble modulins") (Otto, 2014).

La  $\alpha$ -toxina, es una toxina tipo  $\beta$ -barril, produce la lisis de glóbulos rojos, células epiteliales, fibroblastos y algunos leucocitos, pero no de neutrófilos. A altas concentraciones, la formación del poro sería independiente del receptor, aunque a bajas concentraciones se requiere de la interacción con el receptor ADAM10 (Inoshima *et al.*, 2011). Asimismo, de manera independientemente del receptor, esta toxina causa apoptosis en monocitos y linfocitos T y B (Nygaard *et al.*, 2012).

La toxina PVL está constituida por las proteínas LukS y LukF, que forman el poro con una estructura de  $\beta$ -barril. Los receptores asociados a esta toxina son C5aR y C5L2 y actualmente se encuentra asociada con cepas de estafilococos que causan infecciones en piel y severas neumonías necrotizantes (Alonzo *et al.*, 2014). Asimismo, su actividad citotóxica difiere dramáticamente entre especies (Löffler *et al.*, 2010).

La leucocidina LukDE interacciona con los receptores CCR5, CXCR1 y CXCR2 y la leucocidina LukAB (o LukGH) interacciona con el receptor CD11b (Alonzo *et al.*, 2013 y Spaan *et al.*, 2013). La toxina PVL y leucocidina LukAB (o LukG) comparten su capacidad de inducir la lisis de monocitos, macrófagos y neutrófilos, la leucocidina LukAB (o LukG) también posee actividad citolítica sobre células dendríticas (Alonzo *et al.*, 2014).

Las PSM son pequeños péptidos anfipáticos que poseen una fuerte actividad citolítica no específica sobre células endoteliales, epiteliales y osteoblastos. Además de ser fuertes inductores de respuesta inflamatoria contribuyen al desarrollo de biopelículas (Otto, 2014 y Cheung *et al.*, 2014). La PSM $\alpha$  contribuye a la lisis de los neutrófilos luego de la fagocitosis (Surewaard *et al.*, 2013) así como también la producción inmediata y continua de las PSM maximiza la capacidad de *S. aureus* de iniciar el escape del fagosoma de los neutrófilos con la subsecuente lisis celular (Cheung *et al.*, 2014).

Las enterotoxinas son toxinas que interfieren con la señalización celular pero no dañan la membrana. Las enterotoxinas interfieren con la función intestinal y poseen la capacidad de actuar como superantígenos, formando un puente entre las proteínas del complejo mayor de

histocompatibilidad y el receptor de células T (TCR) en la superficie de los linfocitos T helper (Otto, 2014). *S. aureus* puede producir más de 20 enterotoxinas y cada tipo de enterotoxina reconoce un subset específico de la cadena variable V $\beta$  del TCR, generando anergia e inmunosupresión, debido a la falla en la inducción de una respuesta apropiada de anticuerpos (Grumann *et al.*, 2014 y Otto, 2014).

Entre las exoenzimas se encuentran la aureolisina (capaz de clivar e inactivar al LL-37, un péptido bactericida humano producido por los neutrófilos), la estafiloquinasa (capaz de unirse a las  $\alpha$ -defensinas secretadas por los neutrófilos inhibiendo su efecto bactericida), proteasas, hialuronidasa, lipasa, coagulasa y nucleasa que favorecen la diseminación de *S. aureus* en los tejidos ya que degradan moléculas del hospedador o interfieren con cascadas de señalización (Otto, 2014).

### **1.3.2. INDUCCIÓN DE RESPUESTA INFLAMATORIA.**

Las infecciones por *S. aureus* se caracterizan por la inducción de una importante respuesta inflamatoria. Luego del ingreso de la bacteria, la misma es rápidamente reconocida por las células del hospedador mediante receptores específicos denominados PRRs (del inglés: “pathogen recognition receptors”) que reconocen diferentes motivos moleculares conservados de patógeno llamados PAMPs (del inglés: “pathogen-associated molecular patterns”). Los PRRs se expresan tanto en la superficie celular como en compartimentos intracelulares (Li *et al.*, 2010 y Thomas *et al.*, 2013) e inician las cascadas de señalización que conducen a la producción de citoquinas y quimioquinas inflamatorias y el subsecuente reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección. En el caso del reconocimiento de *S. aureus* por PRRs, se destacan los receptores de tipo Toll (TLRs, del inglés: “Toll-like receptors”) TLR2, TLR9 y los receptores NOD (del inglés: “nucleotide-binding oligomerization domain proteins”) (Fournier *et al.*, 2005 y Sethi *et al.*, 2011). Otros receptores celulares que no son PRRs pueden reconocer moléculas de *S. aureus* como es el caso del TNFR1 (del inglés: “tumor necrosis factor receptor 1”) y EGFR (del inglés: “Epidermal growth factor receptor”) (Gómez *et al.*, 2004 y Gómez *et al.*, 2007).

#### **1.3.2.1. Estructuras de *S. aureus* reconocidas por TLRs y NOD.**

El TLR2 reconoce ligandos con diversas estructuras tales como lipoproteínas/lipopéptidos, peptidoglicano y ácidos lipoteicoicos (LTA, del inglés: “lipoteichoic acid”) presentes en la pared de los estafilococos. El amplio rango de ligandos de este receptor es en parte debido a su capacidad de heterodimerizar con diferentes co-receptores tales como TLR1, TLR6 y CD36 (Fournier., 2012 y Sethi *et al.*, 2011). El LTA de *S. aureus* contribuye a la inducción de inflamación ya que es capaz de provocar la secreción de citoquinas y quimioattractantes tales como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12, IL-8,

leucotrieno B<sub>4</sub>, C<sub>5a</sub>, MCP-1 y MIP-1 $\alpha$  (von Aulock *et al.*, 2003). Paralelamente, se ha demostrado el rol de TLR9 en sensar el ADN de *S. aureus* el cual induce la producción de IFN tipo I en células dendríticas (Parker *et al.*, 2012).

NOD2 se encuentra mayoritariamente expresado en monocitos/macrófagos y es capaz de detectar motivos comunes de peptidoglicano presentes en bacterias tanto gram negativas como gram positivas (Fournier *et al.*, 2005 y Sethi *et al.*, 2011). El reconocimiento de *S. aureus* y el muramil dipéptido presente en la membrana por NOD2 se encuentra facilitado por la acción de la hemolisina  $\alpha$ , la cual promueve el acceso de peptidoglicano al citoplasma mediante la formación de poros (Hruz *et al.*, 2009). La estimulación de NOD2 activa el factor de transcripción NF- $\kappa$ B (del inglés: “nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”), promoviéndose la liberación de IL-1 $\beta$ , la cual amplifica la vía de señalización que determina un aumento en la producción de IL-6 y la liberación de especies reactivas del oxígeno en los neutrófilos lo cual constituye un mecanismo crítico para eliminar la bacteria (Hruz *et al.*, 2009).

#### **1.3.2.2. TNFR1 y EGFR.**

La proteína A (SpA, del inglés: “Staphylococcal protein A”), que se expresa en la superficie de casi todas las cepas de *S. aureus* aisladas, tiene la capacidad de interactuar con TNFR1 y con EGFR en diversos tipos celulares y activar los mecanismos de transducción de señales normalmente inducidos por dichos receptores (Gómez *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2007; Soong *et al.*, 2011; Classen *et al.*, 2011; Claro *et al.*, 2013 y Ahn *et al.*, 2014). La interacción de la proteína A con TNFR1 en células epiteliales de las vías aéreas y su capacidad de mimificar al ligando natural TNF- $\alpha$  contribuyen de manera significativa al desarrollo de neumonía (Gómez *et al.*, 2004). La proteína A, como consecuencia de la activación de TNFR1 y EFGR, estimula la cascada RhoA/ROCK/MLC, resultando en modificaciones del citoesqueleto que conducen a la invasión a través de las uniones paracelulares del epitelio (Soong *et al.*, 2011). Asimismo, la proteína A induce la producción de IL-16 y señalización mediada por Ca<sup>+2</sup>/calpaína contribuyendo a la activación de linfocitos T y a la excesiva inflamación durante la neumonía por *S. aureus* (Ahn *et al.*, 2014). En queratinocitos humanos, la proteína A interacciona con TNFR1, activando MAPKs (del inglés: “Mitogen-activated protein kinases”), con posterior traslocación de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B y AP-1 al núcleo e induciendo la producción de IL-8 y COX-2 (Classen *et al.*, 2011). La interacción de la proteína A con TNFR1 en osteoblastos conduce a la activación de NF- $\kappa$ B con la subsecuente liberación de IL-6 promoviendo la activación de osteoclastos (Claro *et al.*, 2103) así como también resulta en la inhibición de la proliferación, mineralización y apoptosis de osteoblastos contribuyendo al remodelamiento anormal del hueso (Claro *et al.*, 2011). Dada la importancia de la proteína A y su interacción con TNFR1 en este trabajo, más adelante se describe en detalle su mecanismo de

acción y los resultados obtenidos por el grupo de investigación en relación a las funciones biológicas de dicha proteína (sección 1.4.).

### 1.3.3. EVASIÓN DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA DEL HUÉSPED.

Además de su gran repertorio de factores de virulencia, *S. aureus* presenta múltiples mecanismos para evadir la respuesta inmune del huésped lo cual le permite causar infección en diversos sitios, así como infecciones recurrentes asociadas a una respuesta adaptativa ineficaz (Foster *et al.*, 2005; Foster *et al.*, 2014 y Thammavongsa *et al.*, 2015). *S. aureus* puede interferir con la extravasación y quimiotaxis de los neutrófilos a través de la secreción de SSL (del inglés: “staphylococcal superantigen-like protein”), PSM y CHIPS (del inglés: “chemotaxis inhibitory protein”). Otros mecanismos de evasión involucran la capacidad de sobrevivir dentro del fagosoma mediante la resistencia a la degradación por la lisozima o por moléculas capaces de eliminar especies reactivas de oxígeno y del nitrógeno y sus derivados como la staphyloxantina, la enzima superóxido dismutasa y la enzima catalasa (Foster *et al.*, 2014 y Thammavongsa *et al.*, 2015). Sumado a su capacidad de evadir la muerte intracelular, *S. aureus* cuenta con diversas toxinas que le permiten eliminar diversos tipos celulares como se describió en la sección 1.3.1.

Por otra parte, *S. aureus* cuenta con un arsenal de factores de virulencia que interfieren con la correcta activación de la vía clásica, la vía de lectinas y/o la vía alternativa del complemento. La proteína A interacciona con el extremo Fc de la IgG provocando la cobertura de la superficie bacteriana con moléculas de anticuerpo en la orientación incorrecta para ser reconocidas por el receptor Fc presente en la superficie de los neutrófilos. Este mecanismo explica el efecto antifagocítico de SpA y en parte su rol en la patogénesis de las infecciones por *S. aureus*. Más aún, las IgGs unidas a la proteína A son incapaces de activar el complemento por la vía clásica al igual que ocurre con algunos tipos de SSL (Foster *et al.*, 2014 y Thammavongsa *et al.*, 2015). La proteína Sbi (del inglés: “Staphylococcal immunoglobulin-binding protein”) puede encontrarse asociada a la pared o ser secretada y posee 4 dominios globulares: I, II, III y IV. Los dominios I y II presentan alta homología con los cinco dominios conservados de unión a IgG de SpA (Moks *et al.*, 1986; Jansson *et al.*, 1998 y Atkins *et al.*, 2008) que le confieren la capacidad de unirse a inmunoglobulinas con función antifagocítica al igual que la proteína A impidiendo la activación de la vía clásica del complemento. La proteína Sbi además interfiere con la activación de la vía alterna del complemento mediante la unión de los dominios III-IV al componente C3, molécula central de las tres vías del complemento y a ciertos productos de la escisión de C3 (Burman *et al.*, 2008; Haupt *et al.*, 2008; Upadhyay *et al.*, 2008 y Isenman *et al.*, 2010). *S. aureus* secreta otras proteínas que interfieren con la convertasa C3 tales como SCIN (del inglés: “staphylococcal complement inhibitor), la Efb (del

inglés: “extracellular fibrinogen binding protein”) y la Ecb (del inglés: “extracellular complement-binding protein”) (Foster *et al.*, 2014 y Thammavongsa *et al.*, 2015).

Las cepas de *S. aureus* pueden expresar uno de los dos tipos de cápsula polisacárida, denominadas tipo 5 o tipo 8, la cual previene la fagocitosis en presencia de opsoninas e interfiere con la deposición del componente C3b, impidiendo la activación del complemento por la vía alterna (Foster *et al.*, 2014 y Thammavongsa *et al.*, 2015).

*S. aureus* posee, asimismo, la capacidad de invadir tanto células fagocíticas profesionales (Thwaites *et al.*, 2011) como no profesionales (Löffler *et al.*, 2014) contribuyendo a la persistencia y diseminación de la infección (Foster *et al.*, 2014 y Thammavongsa *et al.*, 2015). Un mecanismo que contribuye a la persistencia de *S. aureus*, involucra la aparición de variantes intracelulares conocidas como SCV (del inglés: “small colony variants”), las cuales son no hemolíticas con fenotipos no pigmentados. Las SCV se caracterizan por ser semi-inactivas metabólicamente por lo cual crecen lentamente y poseen una pared más delgada y es por ello que son intrínsecamente más resistente a la terapia de antibióticos (Fraunholz *et al.*, 2012 y Löffler *et al.*, 2014).

#### **1.4. PROTEÍNA A DE *S. aureus*.**

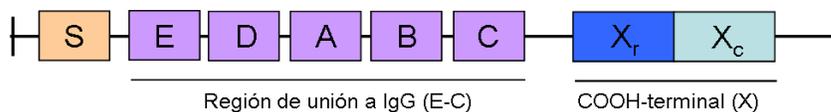
La proteína A es una proteína de superficie de 42 kDa presente en casi todos los aislamientos de *S. aureus* (Uhlen *et al.*, 1984 y Baum *et al.*, 2009) anclada covalentemente a la pared celular a través de su extremo C-terminal. Asimismo, una fracción de SpA puede ser liberada al medio extracelular por un mecanismo parcialmente dependiente de la endopetidasa LytM antes de ser procesada por la sortasa A (Becker *et al.*, 2014 y O'Halloran *et al.*, 2015).

##### **1.4.1. Caracterización estructural.**

La región amino-terminal de la proteína A consiste de cinco dominios conservados (E, D, A, B, C) (Figura 1) de entre 56-61 aminoácidos (Silverman *et al.*, 2006), cada uno de los cuales se une con alta afinidad a la región Fc $\gamma$  (región constante) de la inmunoglobulina G (Moks *et al.*, 1986) y a la región Fab de la inmunoglobulina M subclase VH3 (Sasso *et al.*, 1989). Los dominios de SpA adoptan una conformación de triple hélice (Graille *et al.*, 2000). Una de las caras contiene residuos de la hélice I y II que interacciona con la región Fc de las IgG, mientras que residuos de las hélices II y III, en la otra cara, unen las IgM. Los residuos de la hélice II que unen al Fc son diferentes de los aminoácidos de unión al Fab a excepción de una sola Glutamina (Glutamina 32, dominio D) (Deisenhofer *et al.*, 1981 y Graille *et al.*, 2000).

A continuación de los cinco dominios conservados e inmediatamente antes del sitio de anclado a la pared celular (Xc), la proteína A posee una región polimórfica llamada Xr (Figura 1) que consiste de un número variable, entre 1 y 25, de secuencias cortas repetitivas (SSR del inglés:

“Short Sequence Repeats”) de 24 pares de bases. La variabilidad en número y secuencia de estas regiones repetitivas es generada por deleción, duplicación y también por mutaciones puntuales en la secuencia de ADN de cada SSR y se utiliza como base para el sistema de tipificación de *spa* en cepas resistentes a meticilina (Shopsin *et al.*, 1999).



**Figura 1. Estructura de la Proteína A.** (S): Secuencia señal, (E-C): Región de unión a inmunoglobulina G, (X): COOH terminal, (X<sub>r</sub>): SSR, (X<sub>c</sub>): secuencia de anclaje a la pared celular.

#### 1.4.2. FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA PROTEÍNA A Y SU ROL EN VIRULENCIA.

La proteína A es un factor de patogenicidad que presenta múltiples funciones biológicas a través de la interacción de sus extremos amino y carboxi-terminal con moléculas del hospedador. El rol de SpA como factor de virulencia *in vivo* depende, al igual que otros factores de patogenicidad, del tipo de infección investigada. Mutantes que carecen de la expresión de la proteína A han resultado atenuadas en modelos de neumonía (Gómez *et al.*, 2004) y artritis séptica (Palmqvist *et al.*, 2002). En infecciones cutáneas se ha demostrado, por el contrario, que las mutantes de SpA resultaron ser más virulentas con ausencia de dermonecrosis (Cheng *et al.*, 2009 y Kwiecinski *et al.*, 2014).

##### 1.4.2.1. Funciones biológicas ejercidas por la región amino terminal.

###### i. Inhibición de la fagocitosis.

SpA posee en su región amino-terminal cinco dominios de unión a inmunoglobulinas que reconocen la porción Fc $\gamma$  de la IgG, ejerciendo así un rol antifagocítico (Foster *et al.*, 2005) e inhibiendo la activación del complemento por la vía clásica, como se describió en la sección 1.3.3.

###### ii. Apoptosis de linfocitos B.

Cada uno de los cinco dominios del extremo amino-terminal posee sitios de unión al Fab de la inmunoglobulina M (Sasso *et al.*, 1989 y Silverman *et al.*, 2006). Estos sitios de reconocimiento para Fab, son generados por dos  $\alpha$ -hélices, que le dan la capacidad de actuar como superantígeno (inducir activación celular y posterior apoptosis) sobre linfocitos B que expresen anticuerpos IgM pertenecientes a la subclase VH3 (Silverman *et al.*, 2006) y sobre plasmoblastos subclase VH3 (Pauli *et al.*, 2014).

Debido a la eliminación de una porción del repertorio de linfocitos B (30-50 % de los linfocitos B circulantes) (Silverman *et al.*, 2006) y de los plasmoblastos (Pauli *et al.*, 2014) es que la expresión de SpA suprime la producción de anticuerpos contra diferentes antígenos de la bacteria y provee atributos antifagocíticos, promoviendo la supervivencia de *S. aureus* en sangre (Falugi *et al.*, 2013). Es por ello que ambos mecanismos descritos explican al menos parcialmente porque el ser humano no es capaz de generar anticuerpos protectivos contra *S. aureus*.

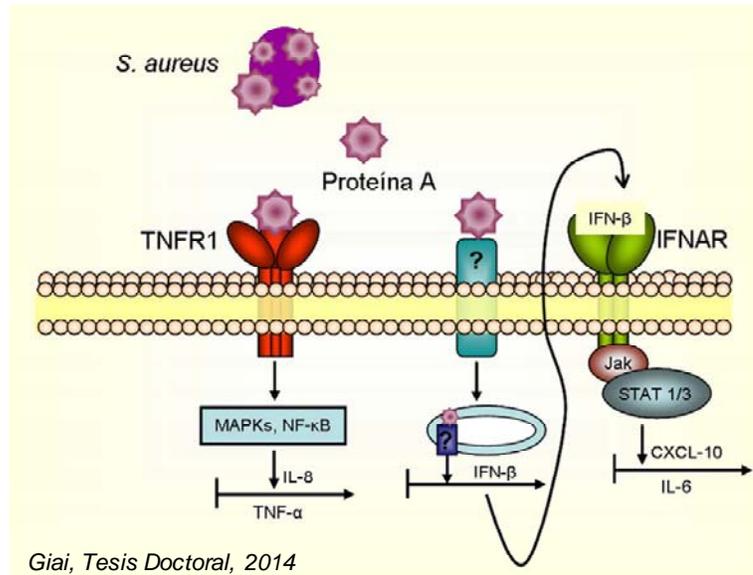
La importancia de la ausencia de la generación de anticuerpos protectivos se ha estudiado mediante el diseñado de una SpA no-tóxica, denominada SpAKKAA, que presenta sustituciones en aminoácidos que son esenciales para la interacción de SpA con el Fab y Fc, la cual es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes contra SpA cuando es inyectada en animales (Kim *et al.*, 2010). Los anticuerpos monoclonales obtenidos contra SpAKKAA favorecieron la opsonofagocitosis de *S. aureus* en sangre humana y murina. Dichos anticuerpos proveen protección contra la formación de abscesos y estimulan la respuesta inmune específica en modelos murinos de infección (Kim *et al.*, 2012a y Kim *et al.*, 2012b) y promueven la producción de anticuerpos neutralizantes desarrollando inmunidad protectora en cerdos de Guinea (Kim *et al.*, 2015).

### **iii. Activación de plaquetas.**

Cada uno de los cinco dominios del extremo amino-terminal de la proteína A interacciona con los dominios A1 y D'-D3 del factor von Willebrand (vWF). Esta interacción ocurre a través de los aminoácidos de unión al Fc de la IgG, pero no del Fab (O'Seaghdha *et al.*, 2006) y conduce a la adherencia y activación de plaquetas en el sitio de injuria vascular (Hartleib *et al.*, 2000). La capacidad de *S. aureus* de interactuar con vWF (soluble o inmobilizado) a través de SpA sugiere un rol potencial en la patogénesis de enfermedades invasivas como la infecciones endovasculares (Hartleib *et al.*, 2000).

### **iv. Inducción de respuesta inflamatoria y regulación de la Inflamación.**

Como se mencionó anteriormente, cada uno de los cinco dominios conservados de SpA que unen a IgG tiene la capacidad de unirse a TNFR1 y los aminoácidos involucrados son los mismos que interaccionan con la región Fc de IgG (Gómez *et al.*, 2006). La activación de TNFR1 por la proteína A induce la producción de IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-6 a través de la activación de NF- $\kappa$ B y MAPKs y subsecuente reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección (Gómez *et al.*, 2004 y Gómez *et al.*, 2007) (Figura 2).



**Figura 2. Cascadas de señalización inducidas por la proteína A que conducen al reclutamiento de células inflamatorias.** La región amino terminal de la proteína A interactúa con TNFR1 de las células epiteliales de las vías aéreas y monocitos/macrófagos induciendo la liberación de IL-8 y TNF- $\alpha$ , mientras que la región carboxi terminal induce la producción de IFN- $\beta$  y la consiguiente liberación de IP-10 e IL-6. La activación de estas cascadas de señalización por parte de las diferentes regiones de la proteína A conduce al reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección.

TNF- $\alpha$  es una citoquina pro-inflamatoria que contribuye fuertemente a la inducción de la respuesta inflamatoria durante las infecciones pulmonares causando daño en los tejidos y subsecuente falla respiratoria (Smith *et al.*, 1998 y Strieter *et al.*, 2002). La capacidad de la proteína A de mimetizar las respuestas inducidas por TNF- $\alpha$  mediante la interacción con su receptor, TNFR1, desempeña un rol fundamental durante la infección pulmonar por *S. aureus* y es esencial para el desarrollo de neumonía por esta bacteria. Esto ha sido demostrado en un modelo de neumonía neonatal en ratones mediante el uso de cepas mutantes de *S. aureus* que no expresan proteína A o ratones deficientes en la expresión de TNFR1 (*tnfr1<sup>-/-</sup>*). En ambos casos, la ausencia de proteína A o de su receptor impidió el desarrollo de infección pulmonar y bacteriemia así como previno el reclutamiento de neutrófilos en cantidades que resultan deletéreas para la función pulmonar (Gómez *et al.*, 2004).

Los mecanismos de señalización intracelular inducidos a través de la ligación de TNFR1 se encuentran regulados por la disponibilidad del receptor en la superficie celular. Esto depende de la actividad de TACE (del inglés: "TNF- $\alpha$  converting enzyme"), la enzima encargada del clivaje del dominio extracelular de TNFR1 mediante un proceso denominado "shedding" (Mezyk *et al.*, 2003). El shedding de TNFR1 disminuye la cantidad de receptor disponible para responder al ligando y finaliza la señalización a través de TNFR1. Se ha demostrado que la proteína A, además de inducir respuestas pro-inflamatorias mediante la ligación de TNFR1, regula estas respuestas induciendo la

activación TACE (Gómez *et al.*, 2007) en células epiteliales de las vías aéreas (Gómez *et al.*, 2007) y monocitos/macrófagos (Giai *et al.*, 2013).

Más recientemente, nuestro grupo de investigación demostró que SpA utiliza el mismo mecanismo para inducir el shedding temprano de IL-1RII (del inglés: “interleukin 1 receptor type II”) en células inmunes, regulando así la disponibilidad de dicho receptor en la superficie celular y de su forma soluble en el medio extracelular (Giai *et al.*, 2016). Se demostró además que la liberación de las formas solubles de TNFR1 e IL-1RII en respuesta a SpA conduce a disminuir la biodisponibilidad de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  interfiriendo así con la respuesta inflamatoria. Por lo tanto SpA sería un factor de virulencia capaz de actuar como molécula pro-inflamatoria así como también anti-inflamatoria (Giai *et al.*, 2013 y Giai *et al.*, 2016).

#### **1.4.2.2. Funciones biológicas ejercidas por la región carboxi-terminal.**

Existe una gran variabilidad en el número de SSRs que comprenden la región Xr en aislamientos clínicos de *S. aureus*. La región Xr induce la secreción de dos importantes citoquinas inflamatorias en células epiteliales de las vías aéreas: IFN- $\beta$  e IL-6 (Figura 2) (Martin *et al.*, 2009). Utilizando un modelo murino de infección intranasal y ratones deficientes en el receptor de IFN- $\beta$ , se estableció que la cascada de señalización inducida por la región Xr contribuye a la inducción de citoquinas inflamatorias *in vivo* y al reclutamiento de neutrófilos a las vías aéreas superiores participando de la deletérea respuesta inflamatoria inducida por *S. aureus* en el pulmón (Martin *et al.*, 2009). Asimismo, nuestro grupo de investigación ha demostrado el rol de la región Xr en la inducción de IFN- $\beta$  y IP-10 en macrófagos estableciéndose que existe un efecto dosis-respuesta, dependiente del número de SSRs, en la activación de la señalización de IFN- $\beta$  tanto en células epiteliales de las vías aéreas como en células inmunes lo cual conduce al reclutamiento diferencial de neutrófilos (Garofalo *et al.*, 2012). Interesantemente, hemos demostrado además que una proporción significativa de aislamientos de pacientes con infecciones crónicas como osteomielitis y fibrosis quística portaban un menor número de SSRs que aquellos aislamientos provenientes de pacientes con infecciones agudas o de portadores sanos. Se observó así una correlación inversa entre el número de SSRs y el tiempo transcurrido desde el inicio de la enfermedad sugiriendo que la pérdida de SSRs podría representar un nuevo mecanismo de adaptación y persistencia en el hospedador (Garofalo *et al.*, 2012).

### **1.5. LOS NEUTRÓFILOS Y SU ROL EN LAS INFECCIONES BACTERIANAS.**

Los neutrófilos son células fagocíticas profesionales que forman parte del sistema inmune innato. No sólo proveen la primera línea de defensa del hospedador, sino que además, modulan el

inicio de la respuesta adaptativa y determinan la naturaleza de la respuesta efectora a desencadenarse (Mantovani *et al.*, 2011). En humanos adultos, estas células constituyen más de la mitad de los leucocitos circulantes y median la fase temprana de la respuesta inflamatoria. Los neutrófilos son esenciales en la defensa frente a infecciones pero su activación exacerbada puede ocasionar un extenso daño en los tejidos (Witko-Sarsat *et al.*, 2000 y Mantovani *et al.*, 2011).

El ciclo de vida de los neutrófilos y sus progenitores se lleva a cabo en tres compartimentos: la médula ósea, la sangre y los tejidos periféricos, e involucra diferentes grupos de células vinculados dinámicamente. En médula ósea existen tres grupos celulares bien definidos: el progenitor, el proliferativo y el no proliferativo. El grupo progenitor contiene células madre y diferentes progenitores relacionados con la producción de neutrófilos y otros tipos celulares. El grupo proliferativo está integrado por mieloblastos, promielocitos y mielocitos. El grupo no proliferativo está constituido por los neutrófilos maduros y sus precursores inmediatos: los metamielocitos y los neutrófilos en banda constituyendo un grupo de maduración y reserva en médula ósea (Berliner *et al.*, 1998 y Summers *et al.*, 2010).

Los neutrófilos son liberados desde el grupo de reserva de la médula ósea a la circulación a razón de  $1-4 \times 10^9$ /kg peso/día, donde poseen una vida media corta (6-8 horas). El período requerido para la diferenciación de mielocito a neutrófilo maduro circulante es de 5-7 días, pero este período puede reducirse a tan sólo 2 días ante la presencia de procesos infecciosos (Summers *et al.*, 2010 y Sadik *et al.*, 2011). Los neutrófilos en sangre se presentan integrando dos grupos de tamaño similar: el circulante (49%) y el marginal adherido al endotelio vascular (51%). Los neutrófilos circulantes pueden abandonar el lecho vascular accediendo a los tejidos periféricos como consecuencia de infecciones o por injuria tisular, este proceso ocurre debido a modificaciones en el patrón de expresión de moléculas de adhesión y este cambio constituye una señal que desencadena la adhesión de los neutrófilos al endotelio, los cuales posteriormente se extravasan en respuesta a sustancias quimiotácticas. Este proceso provoca a un aumento en el tiempo de vida media de los neutrófilos reclutados asegurando la presencia de neutrófilos primados en el sitio de inflamación (Summers *et al.*, 2010; Sadik *et al.*, 2011 y Kolaczowska *et al.*, 2013).

### **1.5.1. Mecanismos de fagocitosis y mecanismos microbicidas de los neutrófilos.**

Los neutrófilos reconocen a los organismos invasores a través de receptores de reconocimiento de patrones (descritos en la Sección 1.3.2.), de receptores para componentes del complemento activado o para el Fc de la IgG (cuando el patógeno se encuentra opsonizado) y de receptores tipo Lectina-C. Una de las principales funciones que ejercen estos receptores luego de ser activados es desencadenar la fagocitosis de patógenos (Fournier *et al.*, 2012 y Mayadas *et al.*, 2014), la cual permite mediar su destrucción intracelular.

La bacteria puede ser reconocida cuando está opsonizada por C3b y/o sus productos de escisión proteolítica C3bi, C3d y C3dg mediante los receptores C1qR, CD11b/CD18 y CD11c/CD18 presentes en los neutrófilos. Alternativamente, la bacteria puede ser opsonizada por anticuerpos (IgM, IgG1, IgG2 e IgG3) los cuales son reconocidos por receptores para la región Fc (CD64, CD32, CD16, CD89 y CD32) presentes en los neutrófilos (Nordenfelt *et al.*, 2011 y van Kessel *et al.*, 2014). Los receptores tipo Lectina-C reconocen arreglos espaciales de hidratos de carbono presentes en la superficie de los microorganismos. Al reconocer a sus ligandos, puede mediar la internalización de los microorganismos que los expresan (Nordenfelt *et al.*, 2011 y van Kessel *et al.*, 2014).

La fagocitosis, es un proceso activo que no sólo depende de la opsonización del microorganismo sino que incluye la formación y maduración del fagosoma el cual provee a los neutrófilos un compartimiento aislado donde los microorganismos pueden ser sometidos a dos tipos de sistemas microbicidas. El primero es un sistema dependiente de la producción de intermediarios reactivos del oxígeno, los cuales son generados durante el proceso denominado estallido respiratorio que se inicia con la activación del complejo enzimático NADPH oxidasa. Por otra parte, existen mecanismos independientes del oxígeno, donde los microorganismos son sometidos a la acción de enzimas y péptidos microbicidas que están empaquetados en los diferentes gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos (Mantovani *et al.*, 2011; Nordenfelt *et al.*, 2011 y van Kessel *et al.*, 2014). El proceso de fagocitosis también desencadena la síntesis de diferentes factores inmunomoduladores y adicionalmente acelera el proceso de muerte celular conocido como PICD (del inglés: “phagocytosis-induced cell death”) (Nordenfelt *et al.*, 2011 y van Kessel *et al.*, 2014).

### **1.5.2. Inducción de respuesta inflamatoria.**

El reconocimiento de los patógenos por los PRRs presentes en los neutrófilos conduce a la producción de mediadores pro-inflamatorios cuya función consiste en modular la respuesta innata y contener la infección así como en condicionar la ulterior respuesta adaptativa. Los neutrófilos, a pesar de poseer entre 10 y 20 veces menos cantidad de ARN respecto de otros leucocitos, constituyen una fuente relevante de citoquinas y quimioquinas debido a su masivo reclutamiento a los focos de infección. Las citoquinas y quimioquinas producidas por ellos regulan la continuidad de su reclutamiento así como el de otras poblaciones celulares (Cassatella *et al.*, 1999; Scapini *et al.*, 2000 y Tecchio *et al.*, 2014).

Los neutrófilos humanos expresan todos los TLR descritos a excepción del TLR3 y TLR7 (Thomas *et al.*, 2013). Asimismo el TLR4 señala únicamente por la vía dependiente de MyD88 (Tamassia *et al.*, 2007 y Thomas *et al.*, 2013). Los neutrófilos humanos además expresan constitutivamente RIG-I y MDA5 (receptores de ácidos nucleicos citoplasmáticos) que le permiten activar el eje TBK1/IRF3 con la subsecuente transcripción de genes dependientes de IFN de tipo I (Tamassia *et al.*, 2013).

### 1.5.3. Producción de citoquinas y quimioquinas por los neutrófilos.

Los neutrófilos activados son capaces de producir grandes cantidades de IL-8 en respuesta a lipopolisacárido bacteriano (LPS), a citoquinas y factores de crecimiento tales como: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y GM-CSF, o en respuesta a diversos microorganismos tanto gram positivos como negativos (Cassatella *et al.*, 1999; Scapini *et al.*, 2000 y Tecchio *et al.*, 2014).

La IL-8 constituye una de las quimioquinas de mayor relevancia en los procesos inflamatorios desencadenados por infecciones bacterianas y en particular en infecciones por *S. aureus* (Rigby *et al.*, 2012). Esta molécula tiene la capacidad de modular positivamente el reclutamiento de neutrófilos al foco de infección, permitiendo además, que los mismos alcancen un mayor estado de activación y la perpetuación del proceso inflamatorio para la erradicación de la bacteria (Cassatella *et al.*, 1999; Scapini *et al.*, 2000 y Tecchio *et al.*, 2014).

GRO- $\alpha$  es una quimioquina producida por los neutrófilos en respuesta a LPS, citoquinas y algunos microorganismos (Cassatella *et al.*, 1999; Scapini *et al.*, 2000 y Tecchio *et al.*, 2014). Posee características funcionales redundantes con la IL-8 (Cassatella *et al.*, 1999 y Scapini *et al.*, 2000).

Los neutrófilos secretan IP-10 en respuesta a IFN- $\gamma$  y otros estímulos tales como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , LPS o IFN- $\beta$  en presencia de IFN- $\gamma$  (Cassatella *et al.*, 1999; Scapini *et al.*, 2000; Tamassia *et al.*, 2007 y Tecchio *et al.*, 2014). Los neutrófilos producen además IP-10 en respuesta al ADN de diferentes patógenos intracelulares mediante receptores citosólicos (Tamassia *et al.*, 2012). IP-10 es una quimioquina que induce la quimiotaxis de linfocitos T (Th1), monocitos y células NK así como apoptosis de linfocitos T vía p38 MAPK (Sidahmed *et al.*, 2012).

MIP-1 $\alpha$  es una quimioquina secretada por varios tipos celulares además de los neutrófilos. Los neutrófilos la secretan en presencia de estímulos como: LPS, TNF- $\alpha$  y diversos microorganismos tanto gram positivos como negativos (Cassatella *et al.*, 1999; Scapini *et al.*, 2000 y Tecchio *et al.*, 2014). Posee potentes propiedades quimiotácticas y activadoras de monocitos, macrófagos, células NK, células dendrítica inmaduras y subpoblaciones de linfocitos T (Th1, pero no Th2) y B. Asimismo, MIP-1 $\alpha$  activa numerosas funciones efectoras sobre macrófagos y neutrófilos como la generación de peróxido de hidrógeno y secreción de TNF- $\alpha$ , la cual modula positivamente la expresión y producción de MIP-1 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-6 (Gasperini *et al.* 1995; Cassatella *et al.*, 1999 y Scapini *et al.*, 2000).

MCP-1 es producida principalmente por monocitos, pero puede ser producida también por los neutrófilos a tiempo tardíos, en respuesta a GM-CSF (Yamashiro *et al.*, 1999), LPS (Arndt *et al.*, 2004 y Zemans *et al.*, 2009) e IFN- $\gamma$  o a diferentes estímulos combinados con IFN- $\gamma$  tales como LPS, ligandos de TLR2 y TNF- $\alpha$  (Yoshimura *et al.*, 2007). MCP-1 exhibe actividad quimiotáctica principalmente hacia monocitos, basófilos/eosinófilos y linfocitos, pero no hacia los neutrófilos (Cassatella *et al.*, 1999; Scapini *et al.*, 2000 y Tecchio *et al.*, 2014) y modula positivamente la

producción de citoquinas en monocitos (Cassatella *et al.*, 1999) desempeñando un rol crítico en el desarrollo de la respuesta adaptativa de tipo Th1 (Rand *et al.*, 1996 y Yoshimura *et al.*, 2007).

IFN- $\beta$  es una citoquina potente y en neutrófilos humanos su producción se encuentra altamente regulada (Muzio *et al.*, 2000; Tamassia *et al.*, 2007 y Tecchio *et al.*, 2014). Los neutrófilos humanos producen IFN- $\beta$  en respuesta a ácidos nucleicos de diferentes patógenos intracelulares, mediante la activación de diferentes receptores citosólicos (Tamassia *et al.*, 2012 y Tamassia *et al.*, 2013) y de TLRs endosomales (Tecchio *et al.*, 2014).

TNF- $\alpha$  es una potente citoquina pro-inflamatoria y los neutrófilos humanos la producen en el orden de picogramos/10<sup>6</sup> células, en respuesta a diferentes estímulos tales como LPS y diversos microorganismos tanto gram positivos como negativos (Casatella *et al.*, 1999). La cascada de señalización de su receptor, TNFR1, en respuesta a su ligando natural TNF- $\alpha$  es crítica para la eliminación bacteriana en diversos modelos experimentales (Nakane *et al.*, 1995 y Abraham *et al.*, 1998). Posee un amplio rango de células blanco que incluye a monocitos, macrófagos, linfocitos y neutrófilos entre otros tipos celulares (Casatella *et al.*, 1999 y Sethi *et al.*, 2011). Entre sus numerosas funciones es capaz de incrementar la adherencia de los neutrófilos al endotelio vascular y la fagocitosis así como iniciar la degranulación y la liberación de metabolitos reactivos del oxígeno (Tecchio *et al.*, 2014).

IL-1 $\beta$  es una citoquina potente producida por los neutrófilos en respuesta a diversos microorganismos, productos bacterianos y mediadores inflamatorios endógenos (Cassatella *et al.*, 2000 y Dinarello *et al.*, 2002). Asimismo juega un rol crucial en la erradicación de *S. aureus* (Sethi *et al.*, 2011; Rigby *et al.*, 2012 y Gai *et al.*, 2016). Dichos estímulos inducen la síntesis de una proforma biológicamente inactiva de la IL-1 $\beta$ , esta permanece en el citosol hasta que un segundo estímulo gatilla su procesamiento por el inflamasoma y se libera la forma activa. Por otro lado la pro-IL-1 $\beta$  puede ser liberada de la célula y clivada en extracelularmente por proteinasa 3, elastasa y catepsina G (Cassatella *et al.*, 2000 y Dinarello *et al.*, 2002). Entre sus numerosas funciones la IL-1 $\beta$  liberada incrementa los niveles de la NO sintasa inducible y mantiene la producción de NO. Asimismo, incrementa la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, promueve la extravasación de leucocitos y promueve la expresión de genes asociados a inflamación (Cassatella *et al.*, 2000 y Dinarello *et al.*, 2002).

## **1.6. MECANISMOS REGULATORIOS DE LA SOBREVIDA DE LOS NEUTRÓFILOS.**

El control preciso de la supervivencia y muerte programada de los neutrófilos provee un fino balance entre su función de defensa y remoción segura, mientras que la desregulación de estos mecanismos conduce a un amplio rango de patologías inflamatorias. Los neutrófilos son células terminalmente diferenciadas y con una vida media relativamente corta. En base a estudios de supervivencia en cultivo *ex vivo* o a estudios de transferencia adoptiva, se ha estimado que estas

células sobreviven en circulación entre 8-12 horas y en los tejidos entre 1-2 días dependiendo de la respuesta inflamatoria local (Mayadas *et al.*, 2014). Estudios más recientes utilizando marcaciones con deuterio *in vivo* sugieren, sin embargo, que bajo condiciones de homeostasia, los neutrófilos circulantes humanos poseen una vida media de al menos 5 días (Kolaczowska *et al.*, 2013 y Mayadas *et al.*, 2014).

### 1.6.1. Apoptosis.

A fin de mantener la homeostasia, los neutrófilos experimentan lo que se denomina apoptosis constitutiva o espontánea. En condiciones de equilibrio los neutrófilos que no han sido activados son reclutados al bazo, hígado o médula ósea, donde mueren por apoptosis y luego son fagocitados por los macrófagos. Este mecanismo facilita la remoción de los neutrófilos senescentes en forma eficiente, no inflamatoria y no patológica (Kennedy *et al.*, 2009; Bratton *et al.*, 2011 y Kolaczowska *et al.*, 2013).

La apoptosis posee características morfológicas bien definidas; es un proceso activo, donde la acción proteolítica de las caspasas conduce al redondeo celular, retracción de pseudópodos, reducción del volumen celular, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de vesículas de la membrana plasmática, es decir, ocurre el desmantelamiento de la célula hasta la formación de cuerpos apoptóticos, proceso por el cual se previene la liberación del contenido intracelular (Fink *et al.*, 2005 y Kennedy *et al.*, 2009).

En el foco inflamatorio, los diferentes mediadores producidos (citoquinas, quimioquinas) en respuesta a los patógenos, ya sea a través de la ligación de PAMPs o de DAPMs (del inglés: "danger-associated molecular patterns") con sus correspondientes receptores, son capaces de modular la vida media de los neutrófilos, ya sea incrementándola o disminuyéndola. El incremento en la sobrevivencia de los neutrófilos es deseable en la fase temprana del proceso inflamatorio ya que promovería un eficiente reconocimiento y posterior remoción del patógeno. En este contexto la fagocitosis del patógeno y ulterior activación de los neutrófilos aceleran su apoptosis, mediante el proceso denominado PICD (Kobayashi *et al.*, 2003 y Rigby *et al.*, 2012). Por lo tanto, la muerte de los neutrófilos por PICD y la subsecuente remoción por los macrófagos mediante el proceso denominado esferocitosis, contribuye a la resolución de la inflamación aguda. De este modo se previene la necrosis secundaria de los neutrófilos apoptóticos y la posterior liberación del contenido intracelular (Witko-Sarsat *et al.*, 2011 y Gabelloni *et al.*, 2013).

Existen dos vías de señalización responsables de la inducción de apoptosis; la vía intrínseca, regulada por la estabilidad de la membrana mitocondrial y la vía extrínseca, que involucra activación de receptores de muerte. Ambas vías de señalización convergen en la activación de caspasas efectoras (Fox *et al.*, 2010).

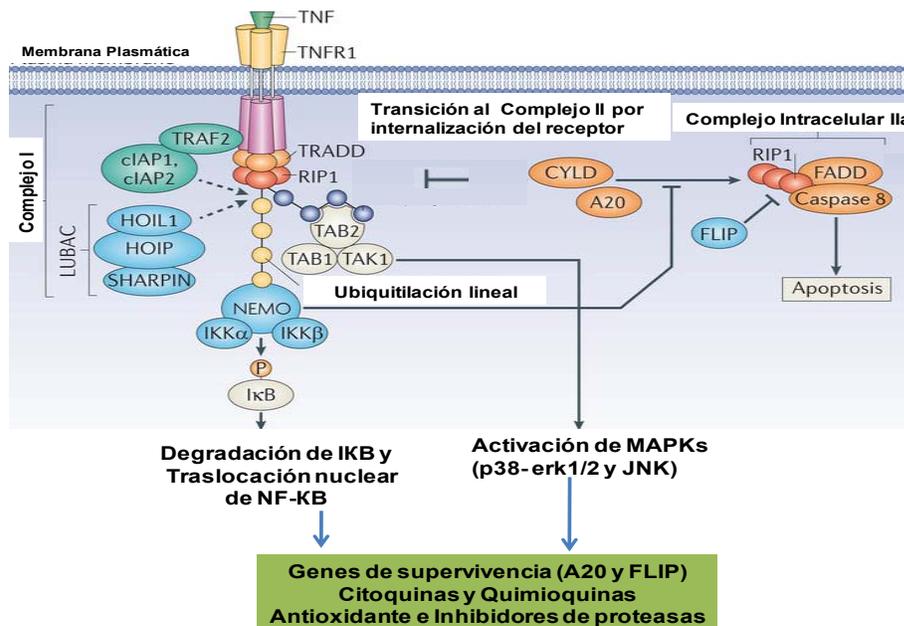
### **1.6.1.1. Vía Intrínseca.**

La vía intrínseca es inducida por estímulos tales como el daño en el ADN, la privación de factores de crecimiento o el estrés oxidativo. La apoptosis espontánea de los neutrófilos ocurre por esta vía, como consecuencia de la ausencia de primado y activación, contribuyendo a mantener su homeostasia (Kennedy *et al.*, 2009). Al activarse la vía intrínseca, se produce la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria y la posterior liberación de diferentes factores mitocondriales pro-apoptóticos al citoplasma (Kennedy *et al.*, 2009; Witko-Sarsat *et al.*, 2011 y Gabelloni *et al.*, 2013). La activación de la vía intrínseca involucra la activación de la caspasa-9 (iniciadora) mediada por el apoptosoma conduciendo a la activación de las caspasas efectoras 3, 6 y 7. Las proteínas de la familia Bcl-2 son las responsables de regular la vía intrínseca ya que controlan la integridad de la membrana mitocondrial e incluyen miembros pro y anti apoptóticos.

### **1.6.1.2. Vía Extrínseca.**

La vía extrínseca es iniciada por señales extracelulares como TNF- $\alpha$ , FasL y TRAIL que son producidas en respuesta a citoquinas, PAMPs o DAMPs. Estas señales son sensedas mediante un subconjunto de receptores de membrana de la superfamilia del TNF denominados receptores de muerte, caracterizados por la presencia de un dominio citoplasmático de muerte (DDs), a través del cual señalizan (Maggini *et al.*, 2009; Witko-Sarsat *et al.*, 2011 y Gabelloni *et al.*, 2013). Los receptores de muerte mejor caracterizados en la actualidad son: Fas, TRAIL1/2 y TNFR1 (Maggini *et al.*, 2009 y Park *et al.*, 2007). Entre ellos el TNFR1 es un regulador maestro de la inflamación y la muerte celular. Al interactuar con su ligando TNF- $\alpha$ , se induce el ensamblado del complejo I unido a membrana que gatilla la activación de NF- $\kappa$ B y la inducción de genes pro-inflamatorios (Figura 3). La activación de NF- $\kappa$ B controla positivamente a proteínas involucradas en la inhibición de la apoptosis como cFLIPs y cIAPs y negativamente la formación del complejo II. En el siguiente estadio, el receptor es internalizado y ocurre el ensamblaje de un complejo citosólico, para ello primero ocurre la disociación de TRADD y de esta manera el complejo (TNFR1-RIPK1) se asocia con FADD y caspasa-8, formando el complejo II, que induce muerte por apoptosis (Naudé *et al.*, 2011; Wajant *et al.*, 2011 y Vanden Berghe *et al.*, 2015).

En el caso de Fas y TRAIL ocurre la situación opuesta, donde el complejo primario en membrana inicia apoptosis y el complejo secundario citosólico induce la activación génica (Kennedy *et al.*, 2009; Gabelloni *et al.*, 2013 y Vanden Berghe *et al.*, 2015).



Adaptado de Ofengeim y Yuan. 2013. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*

**Figura 3. Señalización por TNFR1.** Luego de la estimulación con TNF- $\alpha$ , TNFR1 recluta TRADD y TRAF2, RIPK1, cIAP1/2 y LUBAC, constituyendo el complejo I. Posteriormente RIP1 es poliubiquitinado, lo cual permite el anclaje del complejo TAK1-TAB1/2 y del complejo IKK. El ensamblaje de IKK activa la vía de NF-KB. Alternativamente TAK1 puede fosforilar y activar MAPKs. Subsecuentemente, ocurre la internalización de TNFR1 y las enzimas CYLD y A20 desensamblan el complejo I; de esta manera RIP1 se disocia del receptor e interacciona con FADD y caspasa-8 formando el complejo IIa que permite la activación de las caspasas ejecutoras 3 y 7 resultando en la apoptosis celular.

### 1.6.2. Necrosis.

La necrosis ha sido descrita clásicamente como un tipo de muerte no controlada o accidental que se produce como consecuencia de condiciones extremas de stress fisicoquímico como calor o shock osmótico entre otros factores (Kaczmarek *et al.*, 2013 y Vanden Berghe *et al.*, 2015). Posteriormente se definió la necrosis secundaria o pasiva como la ocurrida cuando los neutrófilos apoptóticos por PICD no son removidos eficientemente por los macrófagos culminado con la liberación del contenido intracelular, la inflamación y el daño de los tejidos circundantes (Kaczmarek *et al.*, 2013 y Vanden Berghe *et al.*, 2015). Actualmente se han caracterizado diferentes tipos de necrosis regulada en diferentes tipos celulares y en particular en los neutrófilos. La necrosis regulada manifiesta similares características a la necrosis pasiva o secundaria, pero la muerte es ejecutada de manera autónoma a través de distintos procesos bioquímicos que conducen al redondeo, seguido del incremento del volumen celular (oncosis) y granulación citoplásmica, culminando con la ruptura de la membrana plasmática. La pérdida de la integridad de membrana provoca una respuesta inflamatoria por exposición del contenido intracelular al sistema inmune (Kaczmarek *et al.*, 2013 y Vanden Berghe *et al.*, 2015).

### **1.7. Subversión de los mecanismos de muerte de *S. aureus* mediados por los neutrófilos.**

*S. aureus* posee la capacidad de evadir y resistir a diferentes mecanismos de muerte mediados por los neutrófilos (Greenlee-Wacker *et al.*, 2015). Tal como se mencionó en la sección **1.3.1.** *S. aureus* cuenta con un arsenal de exotoxinas que lo protegen de la muerte mediada por los neutrófilos, entre otras células del sistema inmune, tanto antes como luego de la fagocitosis (Spaan *et al.*, 2013 y Greenlee-Wacker *et al.*, 2015).

Se ha reportado que la leucocidina LukAB (o LukGH) es capaz de formar poros en la membrana plasmática causando daño extensivo al punto de resultar en la lisis de los neutrófilos antes de que la bacteria sea fagocitada (DuMont *et al.*, 2013). Asimismo, se ha descrito la capacidad de *S. aureus* de escapar del fagosoma de los neutrófilos y luego replicar en el citoplasma favoreciendo la supervivencia del patógeno (Gresham *et al.*, 2000). Más recientemente se determinó que luego de la fagocitosis por los neutrófilos, la bacteria produce LukAB (o LukGH) dentro del fagosoma promoviendo su propio escape a través de la formación de poros en la membrana fagosomal y ulterior lisis de los neutrófilos (Ventura *et al.*, 2010 y DuMont *et al.*, 2013). Más aun, dentro del fagosoma *S. aureus* aumenta la producción de PSM- $\alpha$  contribuyendo a la lisis de los neutrófilos y a la supervivencia de la bacteria (Geiger *et al.*, 2012; Surewaard *et al.*, 2013 y Grosz *et al.*, 2014).

El sistema regulatorio SaeR/S de *S. aureus*, es esencial para la supervivencia de la bacteria dentro de los neutrófilos luego de la fagocitosis. Se ha demostrado que los genes regulados por SaeR/S están implicados en acelerar la muerte de los neutrófilos y suprimir la activación de NF- $\kappa$ B induciendo bajos niveles de IL-8 (Zurek *et al.*, 2015).

Se ha observado que las cepas meticilino resistentes de la comunidad (las cuales presentan fenotipos más virulentos que las meticilino sensibles por factores que se encuentran aún en estudio) luego de ser fagocitadas por los neutrófilos, inducen en ellos las características clásicas de apoptosis y aceleran el proceso de PICD hasta el punto de lisis secundaria (Kobayashi *et al.*, 2010). Sin embargo luego de dicho proceso, las membranas del fagosoma permanecen intactas indicando que la lisis no sería al menos directamente por la acción de exotoxinas ni por el escape de *S. aureus* del fagosoma (Voyich *et al.*, 2005; Voyich *et al.*, 2006 y Kobayashi *et al.*, 2010). Por lo tanto este fenómeno termina potenciando la liberación indeseada del contenido intracelular de los neutrófilos y favoreciendo la supervivencia de *S. aureus* (Kobayashi *et al.*, 2010).

Por otra parte, *S. aureus* es capaz de modular la interacción neutrófilo/macrófago. Mediante este mecanismo los neutrófilos cargados con *S. aureus* modulan positivamente el factor de supervivencia PCNA que conduce a la falla en la activación de las caspasas 2, 3, 8 y 9, con un incremento en la superficie del marcador CD47, el cual es clave para el proceso de esferocitosis mediada por los macrófagos. Posteriormente los neutrófilos conteniendo *S. aureus* viables mueren por necroptosis (Greenlee-Wacker *et al.*, 2014).

En las infecciones de piel, en las cuales los neutrófilos utilizan el mecanismo de netosis a fin de contener a la bacteria en los abscesos, *S. aureus* es capaz de degradar las NETs mediante la secreción las enzimas nucleasa y adenosina favoreciendo la supervivencia de la bacteria en este nicho (Thammavongsa *et al.*, 2013).

## 1.8. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.

La proteína A de *S. aureus* es un factor de virulencia crítico para la inducción de cascadas de señalización pro-inflamatorias en células mieloides y en células no inmunes que participan de la respuesta innata conduciendo al reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección. Dada la capacidad de la proteína A de interactuar en forma directa con el receptor de TNF (TNFR1) en células mieloides y en células no inmunes y el rol central que el mismo juega en la inducción de las señales inflamatorias así como también en la regulación del tipo de programa de muerte, es posible hipotetizar que la proteína A podría desempeñar un rol clave en la activación y regulación de la sobrevivencia de los neutrófilos exacerbando el proceso inflamatorio y contribuyendo así a la patogénesis de las infecciones por *S. aureus*.

A fin de demostrar la hipótesis expuesta, el objetivo general de este trabajo de investigación fue evaluar el rol de la proteína A de *S. aureus* en la activación y secreción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias así como también su capacidad de regular la sobrevivencia de los neutrófilos.

Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos:

### **Objetivo 1. Determinar la capacidad de la proteína A de *S. aureus* de inducir señales pro-inflamatorias en neutrófilos.**

- a. Evaluar la capacidad de la proteína A de inducir la activación de los neutrófilos.
- b. Evaluar la capacidad de la proteína A de inducir la expresión y posterior producción de citoquinas inflamatorias y quimioquinas en los neutrófilos.

### **Objetivo 2. Evaluar la inducción de señales pro-inflamatorias en neutrófilos en respuesta a *S. aureus* y determinar la contribución de la proteína A en dicho proceso.**

- a. Evaluar la capacidad de *S. aureus* de inducir la expresión y posterior producción de citoquinas inflamatorias y quimioquinas en neutrófilos.
- b. Evaluar el rol de la proteína A en la respuesta inflamatoria inducida por *S. aureus*.

### **Objetivo 3. Caracterizar la capacidad de *S. aureus* de activar MAPKs en neutrófilos y la contribución de la proteína A en dicho proceso.**

- a. Evaluar la capacidad de *S. aureus* de activar las vías de señalización de MAPKs en neutrófilos y establecer la participación de la proteína A en dicha activación.

- b. Evaluar la participación de las vías de señalización de MAPKs en la producción de citoquinas y quimioquinas inducidas en respuesta a *S. aureus* y la proteína A.

**Objetivo 4. Establecer la contribución de la proteína A en la regulación de la sobrevivencia de neutrófilos durante la infección por *S. aureus*.**

- a. Evaluar la capacidad de *S. aureus* y la contribución de la proteína A en la expresión y posterior producción de citoquinas y quimioquinas inflamatorias en neutrófilos a largo plazo.
- b. Evaluar el efecto de la estimulación con *S. aureus* en la sobrevivencia de los neutrófilos.
- c. Caracterizar el tipo de muerte (apoptosis/necrosis) inducido por *S. aureus* y la contribución de la proteína A en la modulación de dicho proceso.

# ***MATERIALES Y METODOS***

## 2.1. SOLUCIONES Y REACTIVOS.

- Buffer carbonato de sodio para coating ELISA: 0.1 M carbonato de sodio, pH 9.5.
- Buffer citrato/acetato para ELISA: 0.1 M de acetato de sodio, 0.1M de ácido cítrico, pH 6.
- Buffer de bloqueo para ELISA: PBS 1X, 10 % suero fetal bovino (SFB).
- Buffer de corrida 5X: Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 0.1% SDS, pH 8.8.
- Buffer de lavado para ELISA: PBS 1X, 0.05% Tween 20.
- Buffer de transferencia: Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 20% Metanol, pH 8.3-8.4.
- Buffer de unión a Anexina-V para citometría de flujo (10x): 0.1 M Hepes/NaOH pH 7.4, 1.4 M NaCl y 25 mM CaCl<sub>2</sub>.
- Buffer TBE 5X: Tris-Borato 0.45 M, EDTA 0.01 M, pH 8.
- Dextran 6%.
- Ficoll- Triyosom.
- Medio de cultivo 2YT: Triptona 16 g/l, Extracto de levadura 10 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7.
- PBS: 10 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7.4.
- Solución de bloqueo: 5% de leche en polvo Svelty en TBS-T.
- Solución de dilución de anticuerpo primario y secundario: 5 % BSA en TBS-T.
- Solución de lisis RIPA: NaCl 150mM, Tris-HCl pH 7.4 50 mM, Triton100 1%, EDTA 1 mM, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaFl, inhibidor de proteasas (Sigma 10 µl/ml de buffer).
- Solución de tinción: Azul Brillante de Coomassie 0.05% en solución de Metanol 45%: Ácido acético 10%.
- Solución decolorante: Ácido acético 7%, Metanol 5%.
- Solución Fisiológica.
- Solución luminol-enhancer: Tris 0.1 M, luminol 1.25 mM, Acido Cumárico 0.23 mM, agua oxigenada (8 µl/2ml).
- Solución stop para ELISA: 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- Sustrato de revelado para ELISA: 3.3',5.5'-tretametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno.
- TBS: 0.1 M Tris- HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8.
- TBS-T: TBS 0.01 % Tween 20.

## 2.2. CEPAS BACTERIANAS Y MEDIOS DE CULTIVO.

Se utilizaron las cepas de *S. aureus* Newman conteniendo el vector pCU1, una mutante isogénica que no expresa SpA conteniendo el vector pCU1 (SpA-) y la mutante isogénica SpA- conteniendo el vector que restaura la expresión de SpA (SpA-(pCU1-SpA)) gentilmente provistas por el Dr. Tim Foster (Trinity Collage, Irlanda). Las mismas fueron crecidas por 16 horas en agar tripticasa de soja (TSA) y resuspendidas en medio RPMI 1640 complementado con 0.5 % albúmina sérica humana (HSA) a una DO<sub>600</sub>= 1 equivalente a una concentración final de 1x10<sup>9</sup> UFC/ml, luego se realizó una dilución en medio RPMI 1640 complementado con 0.5 % albúmina sérica humana (HSA) a hasta alcanzar una concentración final de 2x10<sup>8</sup> UFC/ml.

Para la expresión de proteínas recombinantes, se utilizó la cepa BL21 de *E. coli* transformada con el vector de expresión pGEX-KG la cual fue crecida en medio de cultivo 2YT conteniendo ampicilina (100 µg/ml).

## 2.3. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.

Se indujo la expresión de las proteínas recombinantes y luego se procedió a su purificación, determinación de la integridad proteica y grado de pureza y a la cuantificación de las mismas para su posterior utilización en ensayos *in vitro*. Se utilizaron las siguientes proteínas recombinantes:

GST: Glutation S transferasa.

GST-SpA: proteína A completa fusionada a GST.

GST-Y14A: proteína A mutada que presenta un reemplazo por alanina en la tirosina 14 del dominio de unión a IgG, la cual es crítica para la interacción con el receptor de TNF (TNFR1), fusionado a GST.

GST-Xr: región Xr de la proteína A conteniendo 10 SSR fusionado a GST.

### 2.3.1. Expresión de proteínas recombinantes.

Con el objeto de expresar las distintas proteínas, se utilizó *E.coli* BL21 transformada con el vector de expresión pGEX-KG conteniendo las construcciones de las proteínas mencionadas anteriormente. Este vector posee un promotor inducible por IPTG (análogo de la lactosa) y todo lo necesario para su mantenimiento y amplificación (AmpR, ori) en esta cepa.

- Utilizar una colonia de *E.coli* BL21 conteniendo el plásmido deseado (pGEX-KG, pGEX-KG: SpA, pGEX-KG: Y14A, pGEX-KG: Xr) para crecer un cultivo madre en medio 2YT con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml a 37°C, con agitación a 200 rpm toda la noche (ON).
- A partir del cultivo ON, se crece un cultivo en medio 2YT con ampicilina (100 µg/ml) hasta una densidad óptica de 0.5 (medida a 600 nm), a 37°C con agitación a 200 rpm.
- Agregar IPTG a una concentración final de 1 mM, para inducir en el cultivo la expresión de la proteína de fusión y continuar el cultivo a temperatura ambiente con agitación a 200 rpm ON.
- Centrifugar el cultivo durante 10 minutos a 10000 rpm y el pellet bacteriano se resuspende en PBS 1X frío.
- Agregar lisozima a una concentración final 100 µg/ml y ADNasa a una concentración final 10 µg/ml e incubar a 37°C por 5 minutos, para permitir la ruptura de la pared bacteriana y la posterior degradación del ADN cromosomal y plasmídico bacteriano.
- Las bacterias se lisaron mediante 10 ciclos de congelado (-80°C, 10-15 minutos) y descongelados (37°C, 5-10 minutos) y posteriormente se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a velocidad máxima (13000 rpm) para permitir separar el debris celular (pellet) del lisado proteico (sobrenadante), el cual fue conservado a -80°C hasta su utilización.

### 2.3.2. Purificación de proteínas de fusión a GST.

Se siguió el protocolo de columnas de afinidad Glutation Sefarosa (Amersham) que permite purificar las proteínas recombinantes de las restantes proteínas bacterianas debido a la afinidad del tag GST con la Glutation Sefarosa presente en la resina de la columna.

- Lavar la resina con PBS 1X y centrifugar 1 minuto a 735 *g* a 4°C.
- Incubar el lisado proteico con la resina por 15 minutos a temperatura ambiente con rotación constante para permitir la interacción y unión específica de las proteínas.
- Centrifugar 1 minuto a 735 *g* a 4°C, para permitir separar las proteínas no unidas a la resina.
- Lavar 2 veces con PBS 1X.
- Agregar buffer de elución conteniendo glutation reducido e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente con rotación constante, para permitir la separación de las proteínas recombinantes de la resina.
- Centrifugar 1 minuto a 735 *g* a 4°C para permitir la elución de las proteínas recombinantes.
- Dializar contra 300 volúmenes de PBS 1X con agitación a 4°C toda la noche.
- Conservar el extracto proteico a -80°C.

### 2.3.3. Determinación del grado de pureza e integridad de las proteínas purificadas.

Una alícuota de las proteínas obtenidas se analizó en gel de poliacrilamida desnaturizante (separador 8% y concentrador de 5%) (Tabla 1) con el fin de corroborar la integridad y pureza de las mismas (Tabla 2).

Gel Concentrador 5%	
Agua	2.1
Acrilamida/bis Acrilamida 30%	0.5
Tris 1M (pH: 6.8)	0.38
SDS 10%	0.03
Persulfato de amonio 10%	0.03
TEMED	0.003
<b>Volumen final (ml)</b>	<b>3 ml</b>

Gel Separador 8%	
Agua	4.6
Acrilamida/bis Acrilamida 30%	2.7
Tris 1.5 M (pH: 8.8)	2.5
SDS 10%	0.1
Persulfato de amonio 10%	0.1
TEMED	0.006
<b>Volumen final (ml)</b>	<b>10 ml</b>

**Tabla 1:** Reactivos y volúmenes en ml para la preparación del gel SDS-PAGE 8%.

<b>Proteína Recombinante</b>	<b>Peso Molecular esperado (Da)</b>
GST-SpA	81002
GST-Xr	44787
GST-Y14A	30732
GST	28429

**Tabla 2:** Peso molecular esperado para cada proteína recombinante y para el tag GST.

- La electroforesis de proteínas se realizó siguiendo un método descrito previamente para geles discontinuos conteniendo SDS (Laemmli *et al.*, 1970) a 30 mA por gel, a temperatura ambiente durante aproximadamente (90 minutos), en buffer de corrida 1X frío.
- Se procedió a la coloración del gel con solución de tinción durante 1h con agitación constante y luego se incubó en solución decolorante con agitación ON.

#### **2.3.4. Cuantificación de las proteínas aisladas.**

Se utilizó el método de Bradford para realizar la cuantificación.

- Realizar una curva patrón con diluciones seriadas al medio de albúmina bovina (BSA) con una concentración máxima de 25 µg/µl y hasta una concentración mínima de 0.39 µg/µl.
- Utilizar una dilución 1:500 de las muestras proteicas.
- Colocar en una placa de 96 pocillos 40 µl del reactivo de Bradford y luego agregar 160 µl de las muestras en dilución 1:500 ó de BSA y mezclar por resuspensión con pipeta.
- Realizar la lectura a 595 nm.

#### **2.4. CÉLULAS Y MEDIOS DE CULTIVO CELULAR.**

Se utilizaron neutrófilos humanos purificados de sangre periférica de donadores sanos bajo consentimiento informado, los cuales fueron resuspendidos en RPMI 1640 con 0.5% de albúmina sérica humana.

##### **2.4.1. Obtención de neutrófilos.**

Para la purificación de neutrófilos se utilizó sangre periférica de donadores sanos y la técnica de separación por gradiente de densidad en Ficoll-Triyosom. Se siguió el siguiente protocolo descrito previamente por (Böyum *et al.*, 1968):

- Diluir la sangre al medio con solución fisiológica y sembrar sobre Ficoll-Triyosom en una relación de sangre diluida: Ficoll 2:1 (15ml de sangre llevarlos a 30ml con solución fisiológica y sembrar

sobre 15ml de Ficoll). Centrifugar durante 25 minutos a 480 g con aceleración suave y sin freno a 22°C.

- Descartar el suero y el Ficoll con pipeta pasteur, dejando sólo una película de líquido sobre el pellet de células polimorfonucleares y eritrocitos.
- Trasvasar el pellet de células polimorfonucleares y eritrocitos a un tubo limpio con pipeta pasteur, cuidando de no hacer burbujas. Llevar a 22,5 ml con solución fisiológica. Agregar 7,5 ml de Dextran 6% a temperatura ambiente para aglutinar los eritrocitos. Mezclar suavemente por inversión y desajustar la tapa.
- Incubar 20 minutos a temperatura ambiente hasta que se vea un pellet de eritrocitos y el sobrenadante se ponga claro.
- Recuperar el sobrenadante con cuidado con pipeta pasteur sin tocar el pellet (dejar una capa de líquido en contacto con el pellet de eritrocitos).
- Centrifugar durante 10 minutos a 483 g.
- Preparar 18 ml de agua destilada fría, 2 ml de solución fisiológica 10X en una pipeta pasteur y solución fisiológica fría para la lisis de eritrocitos contaminantes.
- Descartar el sobrenadante (que no quede nada de líquido) golpear el tubo para aflojar el pellet. Agregar los 18 ml de agua destilada fría y mezclar muy suavemente durante 30 segundos. Rápidamente agregar los 2 ml de solución fisiológica 10X. Completar el volumen hasta 40 ml con solución fisiológica fría. Centrifugar durante 8 minutos a 215 g.
- Descartar el sobrenadante y agregar 1 ml de medio RPMI 1640 con 0.5% de albúmina sérica humana y resuspender suavemente cuidando que no queden grumos. Agregar 1 ó 2 ml más de medio, dependiendo de la cantidad de neutrófilos. Resuspender a una concentración final de  $10 \times 10^6$  células/ml.

Posteriormente y con el fin de evaluar la pureza de la purificación, se tomó una alícuota de los neutrófilos obtenidos y se marcó con CD14, y se cuantificó por citometría de flujo la expresión en superficie de dicho marcador, de manera de garantizar que el nivel contaminante de monocitos fuese <0.5%. Asimismo, las preparaciones de neutrófilos fueron analizadas mediante citometría de flujo para garantizar que sus parámetros FSC/SSC fueran compatibles con los de células no activadas. Con el fin de minimizar la activación espontánea de los neutrófilos, las células fueron utilizadas inmediatamente luego de la purificación.

#### **2.4.2. Estimulación de los neutrófilos.**

Los neutrófilos (100 µl de la suspensión  $10 \times 10^6$ /ml) fueron colocados en tubos eppendorff en ausencia de suero y expuestos a los diferentes estímulos adicionados en un volumen de 100 µl. Las diferentes proteínas recombinantes se utilizaron a una concentración final de 0.5 µM. En

determinados experimentos se utilizaron a 0.1  $\mu\text{M}$  o 1  $\mu\text{M}$  según se indica. Las cepas de *S. aureus* fueron utilizadas a una MOI de 20:1 o en aquellos experimentos donde se indica se utilizaron a MOI entre 2 y  $2 \times 10^{-5}$ . En el caso de los ensayos para los cuales fuera necesario obtener ARN mensajero se utilizó un volumen final de 1 ml de neutrófilos con 100  $\mu\text{l}$  de una suspensión bacteriana concentrada a fin de mantener la MOI de 20:1 o de las proteínas recombinantes.

En determinados experimentos los neutrófilos fueron pre-tratados por 30 minutos a 37°C con inhibidores químicos, una concentración final de 25  $\mu\text{M}$  PD98059 (MEK inhibitor V, Calbiochem) o 5  $\mu\text{M}$  SB202190 (p38 MAP Kinase inhibitor II, Calbiochem) y posteriormente expuestos a las proteínas recombinantes o a la suspensión bacteriana.

A los tiempos indicados los neutrófilos fueron cosechados para su posterior extracción de ARN mensajero, preparación de extractos proteicos o tinción para posterior análisis por citometría de flujo y los sobrenadantes resultantes fueron colectados para la detección de citoquinas y quimioquinas por ELISA.

## **2.5. DETECCIÓN DE ARNm PARA CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS.**

### **2.5.1. Extracción y cuantificación de ARN total.**

Se aisló ARN de  $10 \times 10^6$  de neutrófilos totales y para ello se siguió el protocolo de extracción de ARN del reactivo TRIzol (Invitrogen). Este reactivo contiene una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina que permiten la ruptura celular, la disgregación de los componentes celulares y la protección del ARN para evitar su degradación.

- Lisar las células con el reactivo TRIzol (1ml/ $10 \times 10^6$  neutrófilos) pasando las células varias veces a través la pipeta.
- Incubar la muestra 5 minutos a temperatura ambiente para completar la disgregación.
- Agregar 0.2 ml de cloroformo/1ml TRIzol Reagent utilizado inicialmente.
- Agitar los tubos por 15 segundos e incubar 3 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12000 g por 15 minutos a 4°C, para permitir la separación de la fase orgánica-interfase, de la fase acuosa conteniendo el ARN.
- Transferir la fase acuosa a un tubo eppendorf estéril (se recupera aproximadamente 60% del volumen de TRIzol utilizado inicialmente).
- Precipitar el ARN con 0.5 ml alcohol isopropílico /1ml TRIzol Reagent utilizado inicialmente mezclar por inversión 1 segundos, hasta obtener una única fase.
- Incubar 10 minutos a temperatura ambiente y luego incubar ON a 4°C.
- Centrifugar a 12000 g por 10 minutos a 4°C.
- Lavar el pellet con 1ml de etanol 75%/1ml TRIzol Reagent utilizado inicialmente.

- Centrifugar a 7500 g por 5 minutos a 4°C.
- Dejar secar el pellet de ARN.
- Disolver el ARN en 12 µl de agua libre de ARNasa e incubar 10 minutos a 60°C.
- Resuspender pasando a través de la pipeta.
- Agregar 1.5 µl de buffer 10X para ADNasa y 0.5 µl de ADNasa (Promega), e incubar 30 minutos a 37°C.
- Agregar 1.5 µl de solución Stop (Promega), e incubar 10 minutos a 65°C.

Se cuantificó el ARN total obtenido midiendo la absorbancia a 260 nm (ácidos nucleicos). A fin de determinar el grado de pureza, se midió la absorbancia a 280 nm (proteínas). Se consideró que la purificación fue óptima si la relación  $Abs_{260nm}/Abs_{280nm}$  resultó entre 1.8 y 2. La concentración de ARN en las muestras se determinó mediante la siguiente relación:  $Abs_{260nm}=1$  equivale a 40 µg/ml de ARN.

### **2.5.2. Extracción y cuantificación de ADN genómico total.**

A partir de la fase orgánica- interfase del protocolo anterior se obtuvo ADN genómico el cual fue utilizado como control positivo en las reacciones de PCR o bien para la realización de las curvas de calibración para la PCR de tiempo real en los casos que fuera posible.

Precipitación del ADN:

- Precipitar el ADN con 0.3 ml de etanol 100% /1ml de reactivo TRIzol utilizado inicialmente, mezclar por inversión 1 segundo.
- Incubar 3 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 2000 g por 5 minutos a 4°C para sedimentar el ADN.
- Lavar 2 veces el pellet con 1ml de una solución 0.1 M de citrato de sodio en 10% de etanol/1ml de reactivo TRIzol utilizado inicialmente e incubar el pellet de ADN 30 minutos a temperatura ambiente (mezclar periódicamente).
- Centrifugar a 2000 g por 5 minutos a 4°C.
- Suspender el pellet de ADN en 2 ml de etanol 75%/1ml de reactivo TRIzol utilizado inicialmente.
- Incubar 20 minutos a temperatura ambiente y mezclar periódicamente.
- Centrifugar a 2000 g por 5 minutos a 4°C.
- Dejar secar el pellet de ADN.
- Disolver el ADN en 600 µl de una solución 8mM de NaOH.
- Llevar a pH 8.4 con 86 µl de una solución HEPES 0.1 M/ por cada ml de NaOH utilizado en el paso anterior.
- Para remover el material insoluble, centrifugar a 12000 g por 10 minutos.

Se cuantificó el ADN total obtenido midiendo la absorbancia a 260 nm (ácidos nucleicos). A fin de determinar el grado de pureza, se midió la absorbancia a 280 nm (proteínas). Se consideró que la purificación fue óptima si la relación  $Abs_{260nm}/Abs_{280nm}$  resultó entre 1.8 y 2. La concentración de las muestras se determinó mediante la siguiente relación:  $Abs_{260nm}=1$  equivale a 50  $\mu\text{g/ml}$  de ADN.

### 2.5.3. Preparación de ADNc a partir del ARN total.

Las reacciones de retrotranscripción (RT) se realizaron a partir de 1  $\mu\text{g}$  de ARN utilizando la enzima RT (ImProm-II, reverse Transcriptase, promega) y hexámeros de primers.

Fase 1: Annealing de los primers sobre el templado de ARN (Tabla 3):

$\mu\text{l}$ de muestra para 1 $\mu\text{g}$ de ARN	Random primers 1 $\mu\text{g/ml}$ ( $\mu\text{l}$ )	Agua libre de ARNs ( $\mu\text{l}$ )	Volumen final ( $\mu\text{l}$ )
XX	1	XX	5

**Tabla 3:** Reactivos y volúmenes necesarios para la RT-PCR Fase 1.

Ciclo RT1: 70°C 5 minutos.  
Hielo 5 minutos.

Fase 2: RT (Tabla 4):

Reactivo Concentración Inicial	Reactivo Concentración Final
Agua	
5X Buffer	1X
25 mM $\text{MgCl}_2$	3 mM
10 mM dNTPs	0.5 mM
40 U/ $\mu\text{L}$ ARN sin	1 U
RT	1U
<b>Volumen final</b>	<b>15 <math>\mu\text{L}</math></b>

**Tabla 4:** Reactivos y volúmenes necesarios para la RT-PCR Fase 2.

Agregar 15  $\mu\text{l}$  de la mezcla por tubo de la fase 1.

Ciclo RT2: 25°C 5 minutos.  
42°C 60 minutos.  
70°C 15 minutos.

Los ADNc fueron testeados mediante PCR del gen  $\beta$ -ACTINA HUMANA.

Reactivo Concentración Inicial	Reactivo Concentración Final
Agua	
5X PCR buffer	1X
10 mM dNTPs	0.5 mM
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
25 µM Primer β-actina Fw	0.5 mM
25 µM Primer β-actina Rv	0.5 mM
Go Taq 5 U/µl	1 U

**Tabla 5:** Reactivos y volúmenes necesarios para la PCR de β-ACTINA.

Se utilizó 2µl de ADNc por reacción y agua como control negativo.

Programa β-ACTINA	
Temperatura (°C )	Tiempo
95	5 min. Desnaturalización inicial del ADN
95	30 seg. Desnaturalización del ADN
60	45 seg. Annealing de los primers
72	45 seg. Síntesis de ADN
72	10 min. Elongación de cadenas de ADN
4	hold

X35

**Tabla 6:** Programa utilizado para la realización de la PCR β-ACTINA en el termociclador.

Alícuotas de cada reacción de PCR (10µl) fueron analizadas en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X conteniendo 0.3 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). La corrida se realizó en buffer TBE 1X a 80-90 V. Se corrió en paralelo el marcador de peso molecular “100pb ladder” que permitió determinar el tamaño de cada fragmento amplificado. Tamaño del producto esperado para β-ACTINA: 250 pb (utilizando los primers indicados en la Tabla 10, página 46).

#### 2.5.4. PCR de tiempo real.

Para los genes a analizar se realizó una curva de calibración utilizando como templado ADN geonómico. Se realizaron diluciones seriadas del ADN al décimo, partiendo de una concentración máxima de 150 ng/µl hasta una dilución 1/10000 equivalente a 15 pg/µl. Se realizó la reacción de PCR de tiempo real, utilizando 2µl de ADN geonómico o las diluciones en 18 µl de mezcla. Se graficó en escala logarítmica el valor de CT promedio obtenido para cada dilución en función de la

dilución, obteniéndose una recta que permite extrapolar a partir del valor de CT la masa relativa de este gen en cada muestra.

A continuación se muestran los reactivos y volúmenes necesarios (Tabla 7) y el programa de corrida para la realización de la PCR de tiempo real (Tabla 8) y las temperaturas de annealing correspondientes a los genes de  $\beta$ -ACTINA, GRO- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$  (Tabla 9) y las secuencias de los primers para cada gen cuantificados (Tabla 10).

Mezcla para la PCR de tiempo real	
Reactivo Concentración Inicial	Reactivo Concentración Final
Agua	
5X Mezcla de Real Time PCR	1X
25 $\mu$ M Primer Fw	0.25 $\mu$ M
25 $\mu$ M Primer Rv	0.25 $\mu$ M
<b>Volumen final 18 <math>\mu</math>L</b>	

**Tabla 7:** Reactivos y volúmenes necesarios para la PCR de tiempo real.

Programa de PCR de tiempo real	
Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Tiempo
95	15 min. Desnaturalización inicial del ADN
95	15 seg. Desnaturalización del ADN
XX	30 seg. Annealing de los primers
72	60 seg. Síntesis de ADN y al final de este tiempo se mide la fluorescencia.

X40

**Tabla 8:** Programa utilizado para la realización de la PCR de tiempo real.

Temperatura de Annealing	
Primer	Temperatura ( $^{\circ}$ C)
$\beta$ -ACTINA	60
GRO- $\alpha$	60
IFN- $\beta$	55
IP-10	51
MIP-1 $\alpha$	62
MCP-1	55
TNF- $\alpha$	60

**Tabla 9:** Temperatura de annealing de cada primer para cada gen para la realización de la PCR de tiempo real para todos los genes medidos.

Para cada muestra se calculó el CT promedio obtenido en la PCR de tiempo real para  $\beta$ -ACTINA y se extrapoló este valor en su correspondiente curva de calibración, obteniéndose la masa relativa promedio de este gen. Para determinar los niveles de ARNm de GRO- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$  y se calculó la masa relativa en función del CT obtenido en cada muestra y luego se relativizó cada una a su correspondiente valor de masa relativa promedio de  $\beta$ -ACTINA (GRO- $\alpha$ / $\beta$ -ACTINA, IFN- $\beta$ / $\beta$ -ACTINA, IP-10/ $\beta$ -ACTINA, MCP-1/ $\beta$ -ACTINA, MIP-1 $\alpha$ / $\beta$ -ACTINA y TNF- $\alpha$ / $\beta$ -ACTINA).

GEN	SECUENCIA DE CADA PAR DE PRIMER	
<b><math>\beta</math>-ACTINA</b>	Fw-5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'	Rv-5'-CGGTTGGCCTTGGGGTCCAGGGGG-3'
<b>GRO-<math>\alpha</math></b>	Fw-5'-ACGTGAAGTCCCCGGAC-3'	Rv-5'-GCCATTCTTGAGTGTGGCT-3'
<b>IFN-<math>\beta</math></b>	Fw-5'-CTTGGATTCTACAAAGAAGC-3'	Rv-5'-GCATTGACCATCTATGAGATG-3'
<b>IP-10</b>	Fw-5'-ACATATTCTGAGCCTACAGC-3'	Rv-5'-AGAGGTACTCCTTGAATGCC-3'
<b>MCP-1</b>	Fw-5'-CTCTGCCGCCCTTCTGTG-3'	Rv-5'-TGCATCTGGCTGAGCGAG-3'
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	Fw-5'-AGCTGACTACTTTGAGACGAGCA-	Rv-5'-CGGCTTCGCTTGTTAGGA-3'
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fw-5'-GGTGCTTGTTCCCTCAGCCTC-3'	Rv-5'-CAGGCAGAAGAGCGTGGTG-3'

**Tabla 10:** Secuencia de primers utilizados para PCR y PCR de tiempo.

## 2.6. ELISA.

Se cuantificaron los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-8, IP-10 y TNF- $\alpha$  mediante la técnica de ELISA (BD Biosciencias y R&D System) en el sobrenadante de los neutrófilos estimulados.

Se utilizó el siguiente protocolo:

- Cubrir cada pocillo con 50  $\mu$ l del anticuerpo de captura (anticuerpo monoclonal anti-IL1 $\beta$ , anti-IL-8, anti-IP-10 o anti-TNF- $\alpha$  de humano). Sellar la placa e incubar a 4°C ON.
- Aspirar el líquido de cada pocillo y lavar tres veces con 100  $\mu$ l de buffer de lavado. Después de cada lavado invertir la placa y secar sobre papel absorbente para remover el buffer de lavado residual.
- Bloquear la placa con 100  $\mu$ l de buffer de bloqueo e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
- Aspirar y lavar tres veces como en el paso 2.
- Preparar las diluciones del estándar y las muestras en buffer de bloqueo.
- Agregar 50  $\mu$ l de cada estándar y las muestras e incubar 2 horas a temperatura ambiente.
- Aspirar y lavar tres veces como en el paso 2.

- Agregar 50 µl del anticuerpo de detección (anticuerpo monoclonal anti-IL1β, anti-IL-8, anti-IP-10 o anti-TNF-α de humano biotinilados) en cada pocillo. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Aspirar y lavar tres veces como en el paso 2.
- Agregar 50 µl de streptavidina-HRP (streptavidina conjugada a peroxidasa) en cada pocillo. Cubrir la placa e incubar 20 minutos a temperatura ambiente. Evitar la colocación de la placa a la luz directa.
- Aspirar y lavar tres veces como en el paso 2.
- Agregar 50 µl de la solución sustrato (tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno) en cada pocillo. Incubar la placa durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- Agregar 25 µl de la solución stop (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N) en cada pocillo.

## **2.7. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS POR WESTERN BLOT.**

### **2.7.1. Obtención de lisados proteicos.**

- Estimular 10x10<sup>6</sup> neutrófilos y luego de la estimulación lavar las células 1 vez con PBS en frío.
- Agregar 200µl de la solución de lisis RIPA e incubar 60 min a 4°C con agitación.
- Centrifugar 15 minutos a 12000 rpm y guardar el sobrenadante hasta su posterior utilización en los ensayos de western blot, previa cuantificación por el método de Bradford.

### **2.7.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida y transferencia.**

Las proteínas totales (20 µg) se corrieron en un gel de poliacrilamida desnaturante (separador 8% y concentrador de 5%) (Tabla 1). Luego de realizar la corrida electroforética las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en buffer de transferencia durante 2 horas a 150 mA/gel.

### **2.7.3. Detección inmunológica de las proteínas fosforiladas.**

- Incubar la membrana durante 1 hora con solución de bloqueo.
- Incubar con el anticuerpo 1° en TBS-T 5 % BSA con agitación constante ON a 4°C.
- Lavar 3 veces con agitación durante 10 minutos cada vez con TBS-T.
- Incubar con el anticuerpo 2° Conjugado a peroxidasa, durante 60 minutos a T° ambiente.
- Lavar 3 veces con agitación durante 10 minutos cada vez con TBS-T.
- Lavar la membrana con TBS 1X durante 10 minutos.
- Incubar la membrana por 2 minutos con la solución luminol-enhancer.
- Exponer y revelar en la cabina de Image Quant 300.

Las placas reveladas se analizaron por densitometría mediante el programa ImageJ.

<b>Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas fosforiladas</b>			
	<b>Ac</b>	<b>Dilución</b>	
<b>1°</b>	Anti-P-erk1/2	1/200	Santa Cruz Biotecnollogy
	Anti-P-p38	1/500	Cell signalling
	Anti-Erk total	1/200	Santa Cruz Biotecnollogy
	Anti-actina	1/1000	SIGMA
<b>2°</b>	Anti-IgG de ratón	1/2000	Santa Cruz Biotecnollogy
	Anti-IgG de conejo	1/2000	Santa Cruz Biotecnollogy

**Tabla 11:** Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas fosforiladas.

## **2.8. MARCACIÓN DE ANTÍGENOS DE SUPERFICIE POR CITOMETRÍA DE FLUJO.**

Para la marcación de antígenos de superficie en neutrófilos se utilizó el siguiente protocolo:

- Lavar las células con 1 ml de PBS 1X.
- Resuspender las células en 100 µl de PBS 1X.
- Agregar el anticuerpo fluorescente CD11b-FITC (eBioscience) e incubar en oscuridad a 4°C por 30 minutos.
- Agregar 1 ml de PBS 1X frío y centrifugar durante 2 minutos a 5.000 rpm a 4°C.
- Lavar las células con 1 ml de PBS 1X.
- Centrifugar las células durante 2 minutos a 5.000 rpm a 4°C.
- Fijar las células en paraformaldehído 1% en PBS 1X.
- Correr las células por el citómetro de flujo Partec PAS III.

Como control de isotipo se marcó las células con el anticuerpo fluorescente IgG1, kappa de raton- FITC. (eBioscience). Se utilizó la autofluorescencia de las células como control negativo de marcación. Los datos colectados fueron analizados usando el programa WinMDI. Los resultados fueron reportados como porcentaje de neutrófilos CD11b+. En todos los casos se contabilizaron 20000 eventos por condición.

## **2.9. CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD, APOPTOSIS Y NECROSIS DE LOS NEUTRÓFILOS**

Se cuantificó el porcentaje de células viables, apoptóticas o necróticas luego de la estimulación utilizando el siguiente protocolo:

- Lavar las células con 1 ml de PBS 1X.

- Resuspender las células en 100 µl de Buffer de Anexina 1X.
- Agregar 5 µl de anexina-V-FITC (eBioscience) e incubar en oscuridad a temperatura ambiente por 15 minutos.
- Agregar 1 ml de Buffer de anexina 1X frío y centrifugar durante 2 minutos a 5.000 rpm a 4°C.
- Resuspender las células en 500 µl de Buffer de Anexina 1X.
- Agregar 10 µl de yoduro de propidio (Biolegend) e incubar en oscuridad a 4°C por 15 minutos.
- Correr las células por el citómetro de flujo Partec PAS III antes de las 4 horas post tinción.

Se utilizó la autofluorescencia de las células como control negativo de marcación. Como control positivo de marcación se utilizaron neutrófilos tratados con RPMI 50% DMSO y luego se siguió el protocolo de marcación con Anexina-V-FITC o bien con yoduro de propidio. Los datos colectados fueron analizados usando el programa WinMDI. Los resultados fueron reportados como porcentaje de neutrófilos viables (células dobles negativas), apoptóticas (células anexina-V+) o necróticas (células yoduro de propidio+). En todos los casos se contabilizaron 20000 eventos por condición.

## **2.10. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA.**

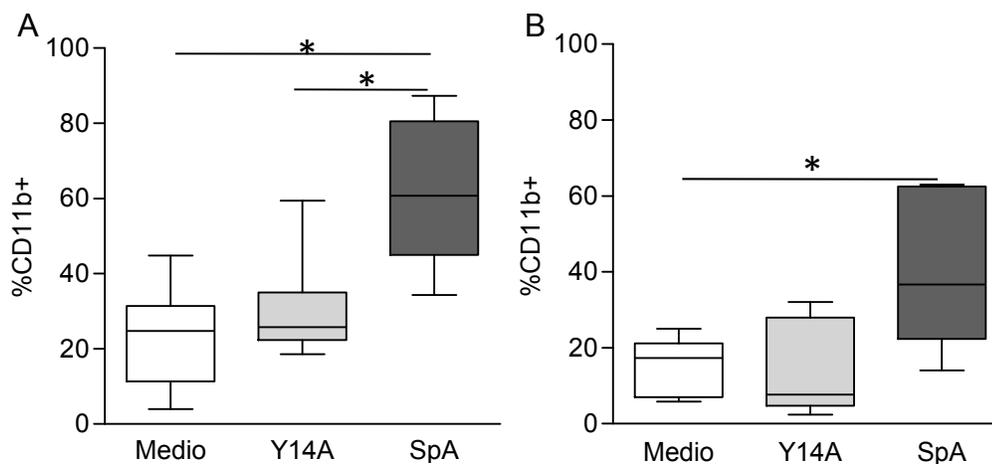
Las muestras no presentaron distribución normal por lo tanto se analizaron con las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney y con la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas o se utilizó ANOVA de un factor no paramétrico con prueba de Friedman's para comparaciones múltiples con Prueba Adicional de Dunn's según se indica. Para el análisis de frecuencias se utilizó la prueba de Chi-cuadrado. Todas las pruebas fueron realizadas con el paquete estadístico GraphPad Prism. La significancia estadística fue definida como  $p < 0.05$ .

# ***RESULTADOS***

### 3.1. INDUCCIÓN DE RESPUESTA INFLAMATORIA EN NEUTRÓFILOS POR LA PROTEÍNA A DE *S. aureus*.

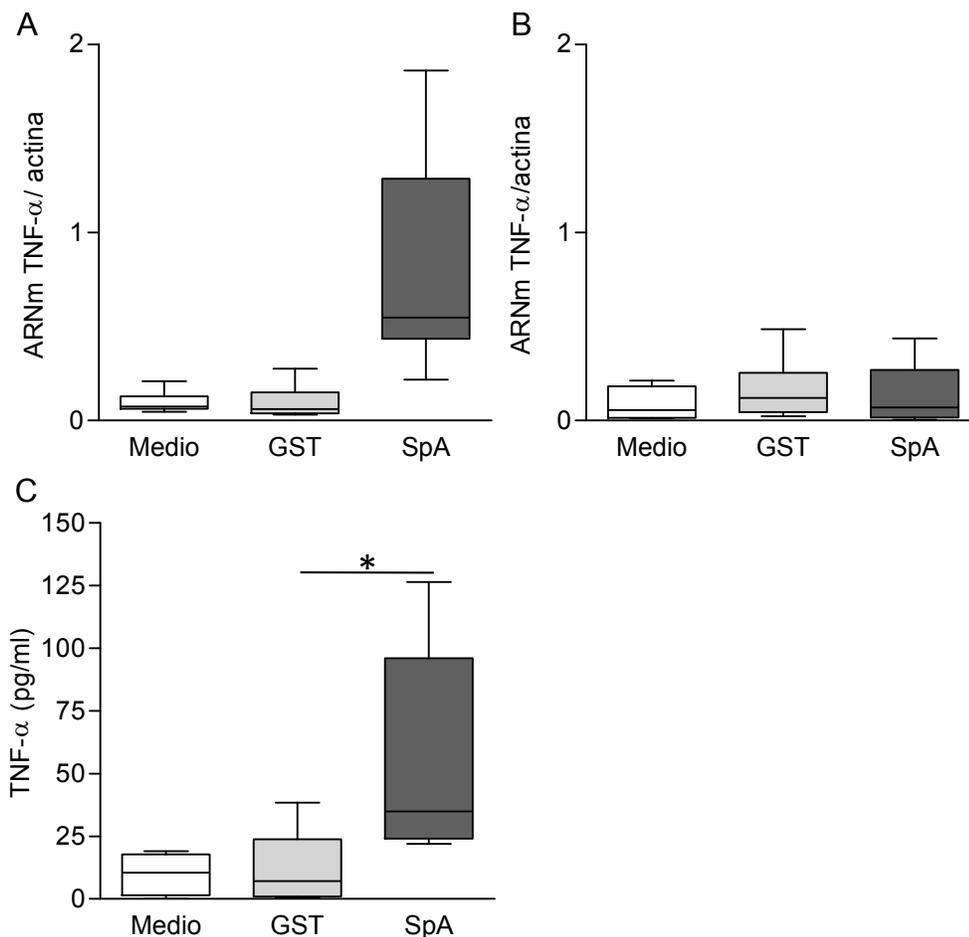
#### 3.1.1. La proteína A induce la expresión y producción de citoquinas inflamatorias.

Dada la capacidad de la proteína A (SpA) de inducir citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias en células epiteliales de las vías aéreas (Gómez *et al.*, 2004) y de la córnea (Kumar *et al.*, 2007), queratinocitos (Soong *et al.*, 2012) y macrófagos (Giai *et al.*, 2013), se evaluó si la misma era capaz de activar e inducir respuestas similares en neutrófilos. Para ello, neutrófilos humanos en cultivo *in vitro* fueron estimulados con proteína A recombinante fusionada a GST, GST o medio (como controles negativos). Inicialmente, se evaluó la capacidad de SpA de incrementar la expresión en superficie de una de las subunidades de la integrina Mac-1, denominada CD11b. Dicho marcador se expresa en la membrana de vesículas secretorias, de gránulos específicos y de gránulos de gelatinasa y pasa a formar parte de la membrana plasmática cuando, como consecuencia de la activación celular, los neutrófilos sufren degranulación (Sadik *et al.*, 2011). Por lo tanto, el nivel de expresión de dicha integrina es un indicador del grado de activación de los neutrófilos. Se observó un aumento significativo en el porcentaje de células expresando CD11b en la superficie de los neutrófilos luego de 2 y 4 horas de estimulación con proteína A (Figura 4A y 4B). El efecto de SpA sobre CD11b fue dependiente de la vía de señalización de TNFR1 (Figura 4A y 4B) como se pudo observar utilizando la mutante de proteína A Y14A que no puede ser reconocida por dicho receptor (Gómez *et al.*, 2006).



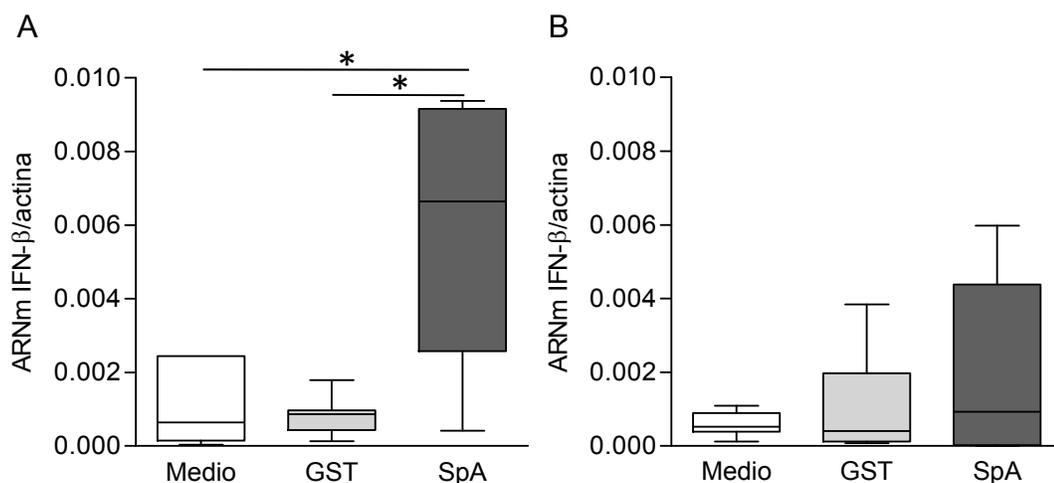
**Figura 4. La proteína A induce la expresión de CD11b en neutrófilos.** Neutrófilos humanos fueron estimulados durante 2 horas (A) o 4 horas (B) con proteína A recombinante (SpA, 0.1  $\mu$ M), la mutante de proteína A Y14A o medio (control). Se determinó la expresión en superficie de CD11b por citometría de flujo. Las cajas indican los percentiles 25 y 75 calculados a partir de los valores obtenidos para cada dador individual, los bigotes representan el valor máximo y el valor mínimo obtenido y la línea horizontal corresponde a la mediana grupal. ANOVA de un factor- Prueba de Friedman con prueba adicional de Dunn's (n=6) (\*:  $p < 0.05$ ).

Posteriormente, se evaluó la capacidad de SpA de inducir la producción de TNF- $\alpha$  dada la relevancia de dicha citoquina para la activación de los neutrófilos durante el proceso infeccioso. Para ello, neutrófilos humanos en cultivo *in vitro* fueron estimulados con SpA por diferentes períodos de tiempo y posteriormente se determinaron los niveles relativos de expresión y la producción de TNF- $\alpha$ . Se observó un incremento en la expresión de TNF- $\alpha$  luego de 2 horas de estimulación con SpA, el cual resultó transiente no observándose diferencias respecto de los controles a las 4 horas luego de la estimulación (Figura 5A y 5B). Al cuantificar la citoquina liberada al medio de cultivo, se observó un aumento significativo de la producción de TNF- $\alpha$  luego de 4 horas de estimulación con SpA (Figura 5C).



**Figura 5. Producción de TNF- $\alpha$  en neutrófilos estimulados con proteína A.** Neutrófilos humanos fueron estimulados durante 2 horas (A) o 4 horas (B y C) con SpA (0.5  $\mu$ M), GST (0.5 $\mu$ M, control) o medio. Se determinó la expresión de TNF- $\alpha$  por RT-PCR de Tiempo Real (datos expresados relativos a actina) y la producción de dicha citoquina por el método de ELISA. Las cajas indican los percentiles 25 y 75 calculados a partir de los valores obtenidos para cada dador individual, los bigotes representan el valor máximo y el valor mínimo obtenido y la línea horizontal corresponde a la mediana grupal. ANOVA de un factor- Prueba de Friedman con prueba adicional de Dunn`s (n=5-6) (\*:  $p < 0.05$ ).

Dada la importancia de la activación de la vía de señalización de IFN- $\beta$  por la región polimórfica de la proteína A en células epiteliales (Martin *et al.*, 2009) y en macrófagos (Garofalo *et al.*, 2012), se evaluó la capacidad de SpA de activar dicha vía de señalización en neutrófilos. Para ello, neutrófilos humanos en cultivo fueron estimulados con SpA por diferentes períodos de tiempo y se cuantificó el nivel de expresión de IFN- $\beta$ . Se observó un aumento significativo, aunque moderado, en la expresión de IFN- $\beta$  luego de 2 horas de estimulación con SpA (Figura 6A). La expresión resultó baja y transiente retornando a los niveles basales a las 4 horas luego de la estimulación (Figura 6B) por lo que el incremento detectado podría ser de escasa relevancia a nivel biológico.

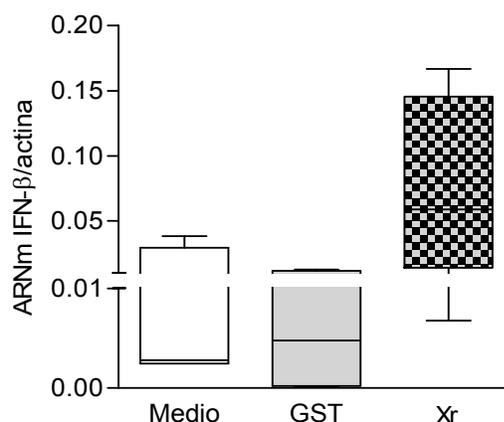


**Figura 6. Expresión de IFN- $\beta$  en neutrófilos estimulados con proteína A.** Neutrófilos humanos fueron estimulados por 2 horas (A) o 4 horas (B) con SpA (0.5  $\mu$ M), GST (0.5  $\mu$ M, control) o medio. Se determinó la expresión de IFN- $\beta$  por RT-PCR de Tiempo Real (datos expresados relativos a actina). Las cajas indican los percentiles 25 y 75 calculados a partir de los valores obtenidos para cada dador individual, los bigotes representan el valor máximo y el valor mínimo obtenido y la línea horizontal corresponde a la mediana grupal. ANOVA de un factor- Prueba de Friedman con prueba adicional de Dunn's (n=6-7) (\*:  $p < 0.05$ ).

En base a estos resultados y considerando que en macrófagos y células epiteliales se demostró previamente que la región polimórfica Xr conduce a la activación de la vía de señalización de IFN- $\beta$ , (Garofalo *et al.*, 2012), se procedió a evaluar el rol de la región Xr en la inducción de IFN- $\beta$  en neutrófilos humanos. Para ello, neutrófilos en cultivo fueron estimulados con la proteína recombinante Xr y se cuantificó la expresión de IFN- $\beta$ .

Se observó un incremento en la expresión de IFN- $\beta$  luego de dos horas de estimulación en respuesta al estímulo con la región Xr aunque el mismo no resultó significativo respecto del nivel de expresión basal (Figura 7).

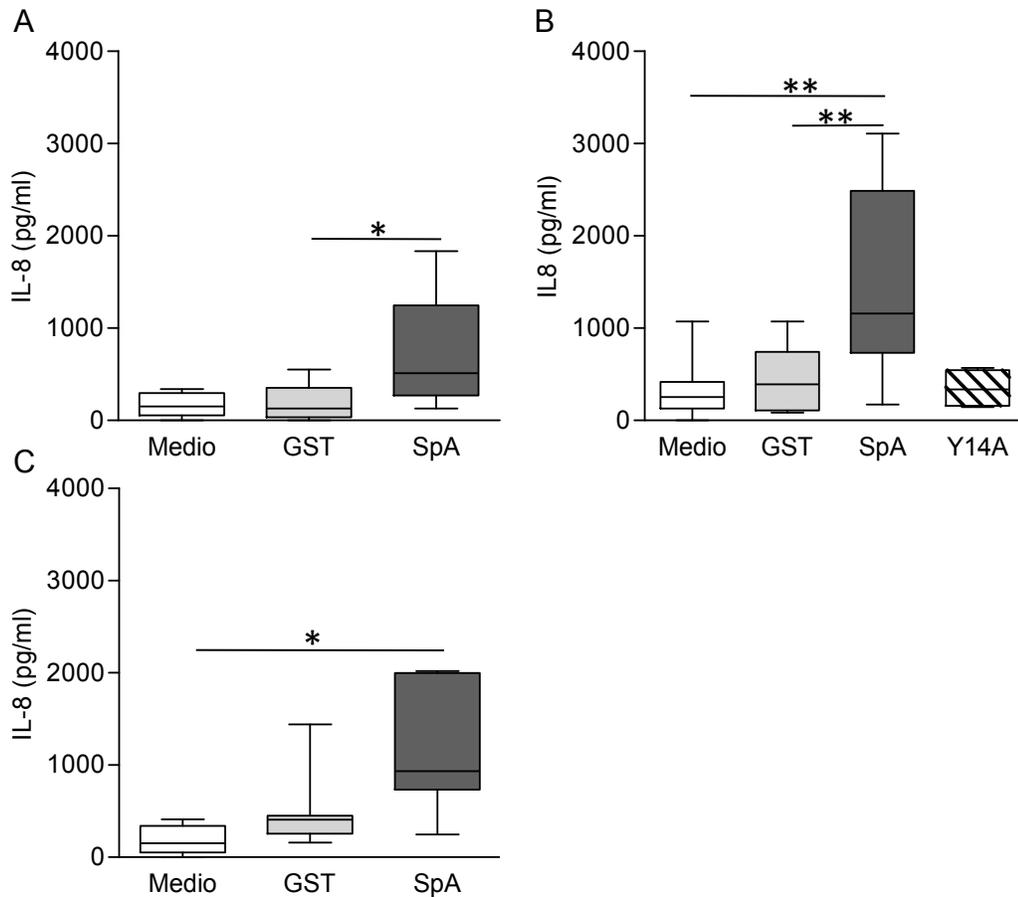
No se observó inducción de IL-1 $\beta$  en respuesta a SpA a ninguno de los tiempos evaluados (datos no mostrados).



**Figura 7. Expresión de IFN- $\beta$  en neutrófilos en respuesta al estímulo con la región Xr de la proteína A de *S. aureus*.** Neutrófilos humanos fueron estimulados durante 2 horas con Xr (0.5  $\mu$ M), GST (0.5  $\mu$ M, control) o medio. Se determinó la expresión IFN- $\beta$  por RT-PCR de tiempo real (datos expresados relativos a actina). Las cajas indican los percentiles 25 y 75 calculados a partir de los valores obtenidos para cada dador individual, los bigotes representan el valor máximo y el valor mínimo obtenido y la línea horizontal corresponde a la mediana grupal. ANOVA de un factor- Prueba de Friedman con prueba adicional de Dunn's (n=4) (\*:  $p < 0.05$ ).

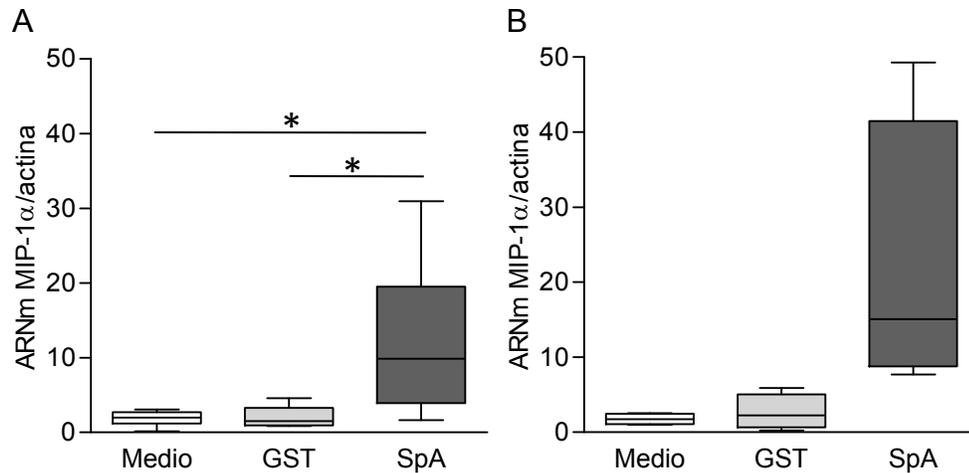
### 3.1.2. La proteína A induce la expresión y producción de quimioquinas inflamatorias.

Paralelamente se procedió a determinar la capacidad de SpA de inducir la producción de IL-8, una de las quimioquinas de mayor relevancia en los procesos inflamatorios, además de ser la principal quimioquina inducida en neutrófilos por diversos estímulos (Cassatella *et al.*, 1999 y Rigby *et al.*, 2012). Para ello, neutrófilos humanos en cultivo fueron estimulados en presencia de diferentes concentraciones de SpA y luego de 4 horas de estimulación se recolectaron los sobrenadantes de cultivo y se cuantificó la producción de IL-8. Se determinó que SpA induce un aumento significativo en la producción de IL-8 luego de 4 horas de estimulación y que la misma resultó dependiente de la dosis de proteína utilizada siendo máxima a una concentración de SpA de 0.5  $\mu$ M (Figura 8A, 8B y 8C). Asimismo, utilizando la mutante Y14A se determinó que la producción de IL-8 en neutrófilos es dependiente de la vía de señalización de TNFR1 (Figura 5B).



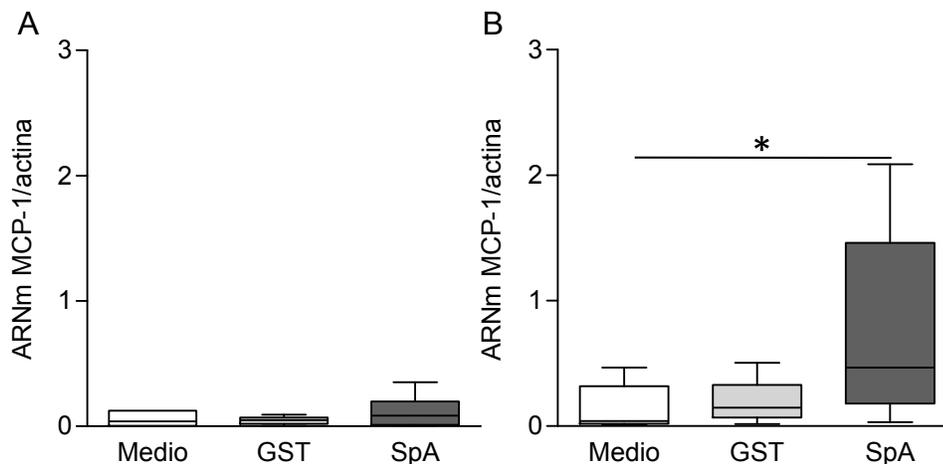
**Figura 8. Producción de IL-8 en neutrófilos estimulados con proteína A.** Neutrófilos humanos fueron estimulados durante 4 horas con SpA 0.1  $\mu\text{M}$  (n=5) (A), SpA 0.5  $\mu\text{M}$  (n=9) (B), SpA 1  $\mu\text{M}$  (n=7) (C), Y14A 0.5  $\mu\text{M}$  (n=4), GST (control) o medio y se cuantificó la producción de IL-8 en el sobrenadante de cultivo por ELISA. Las cajas indican los percentiles 25 y 75 calculados a partir de los valores obtenidos para cada dador individual, los bigotes representan el valor máximo y el valor mínimo obtenido y la línea horizontal corresponde a la mediana grupal. ANOVA de un factor- Prueba de Friedman con prueba adicional de Dunn's (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ).

Luego se evaluó la capacidad de SpA de inducir la expresión de otras quimioquinas que pueden ser producidas por los neutrófilos, las cuales se encuentran involucradas en amplificar la respuesta iniciada por los mismos y poseen además una potente actividad quiomiotáctica y activadora tanto de los neutrófilos como de otros tipos celulares, tales como monocitos/macrófagos y distintas subpoblaciones linfocitarias (Cassatella *et al.*, 1999; Scapini *et al.*, 2000 y Tecchio *et al.*, 2014). Para ello, neutrófilos humanos en cultivo fueron estimulados con SpA por diferentes períodos de tiempo y posteriormente se cuantificó el nivel de expresión de MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, IP-10 y GRO- $\alpha$ . SpA indujo un aumento en la expresión de MIP-1 $\alpha$  luego de 2 y 4 horas de estimulación (Figura 9A y 9B).



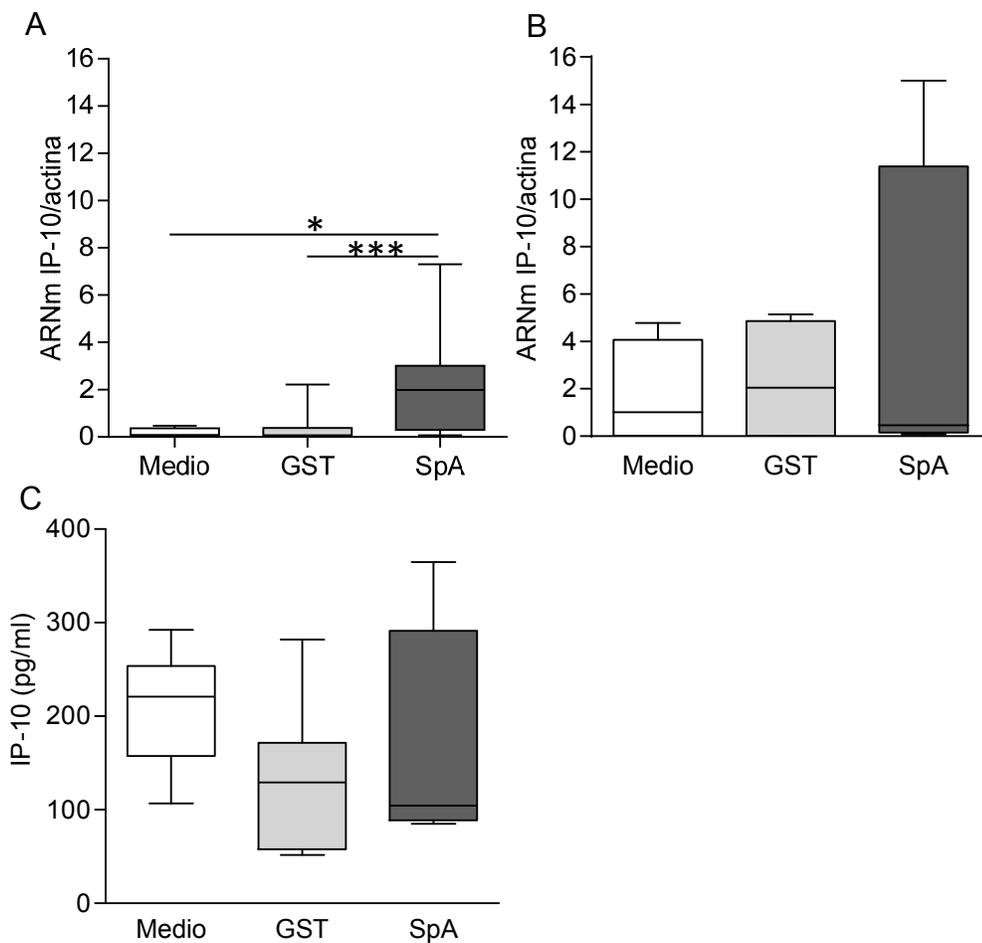
**Figura 9. Expresión de MIP-1α en neutrófilos estimulados con proteína A.** Neutrófilos humanos fueron estimulados durante 2 horas (A) o 4 horas (B) con SpA (0.5 μM), GST (0.5 μM, control) o medio. Se determinó la expresión de MIP-1α por RT-PCR de Tiempo Real (datos expresados relativos a actina). Las cajas indican los percentiles 25 y 75 calculados a partir de los valores obtenidos para cada dador individual, los bigotes representan el valor máximo y el valor mínimo obtenido y la línea horizontal corresponde a la mediana grupal. ANOVA de un factor- Prueba de Friedman con prueba adicional de Dunn`s (n=4-6) (\*:  $p < 0.05$ ).

Al evaluar la expresión de MCP-1, se observó que SpA indujo un incremento significativo en la expresión de dicha quimioquina a las 4 horas luego de la estimulación (Figura 10A y 10B).



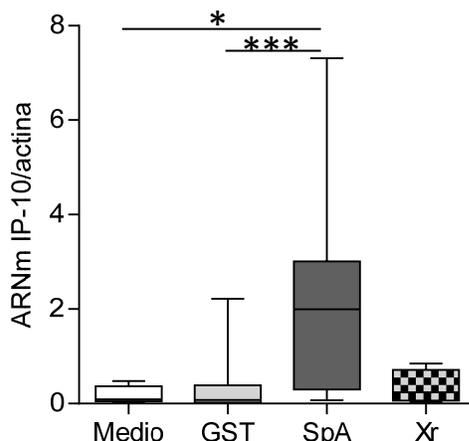
**Figura 10. Expresión de MCP-1 en neutrófilos estimulados con proteína A.** Neutrófilos humanos fueron estimulados durante 2 horas (A) o 4 horas (B) con SpA (0.5 μM), GST (0.5 μM, control) o medio. Se determinó la expresión de MCP-1 por RT-PCR de Tiempo Real (datos expresados relativos a actina). Las cajas indican los percentiles 25 y 75 calculados a partir de los valores obtenidos para cada dador individual, los bigotes representan el valor máximo y el valor mínimo obtenido y la línea horizontal corresponde a la mediana grupal. ANOVA de un factor- Prueba de Friedman con prueba adicional de Dunn`s (n=5-6) (\*:  $p < 0.05$ ).

Considerando que la activación de las vías dependientes de  $\text{TNF-}\alpha$  conducen a la expresión de IP-10 (Liu *et al.*, 2011) evaluamos, posteriormente, la capacidad de SpA de inducir la expresión y producción de IP-10 en neutrófilos. Para ello, neutrófilos humanos en cultivo fueron estimulados con SpA por diferentes períodos de tiempo y se cuantificaron los niveles de expresión y producción de IP-10. Se observó un incremento significativo en la expresión de IP-10 luego de 2 horas de estimulación con SpA, observándose un alto grado de dispersión en la capacidad individual de respuesta (Figura 11A). No se observaron diferencias en la expresión luego de 4 horas de estimulación respecto a los niveles basales probablemente debido a la gran dispersión entre dadores (Figura 11B). Al cuantificar la citoquina liberada al medio de cultivo sorprendentemente no se observó aumento en la producción de IP-10 en respuesta al estímulo por SpA (Figura 11C).



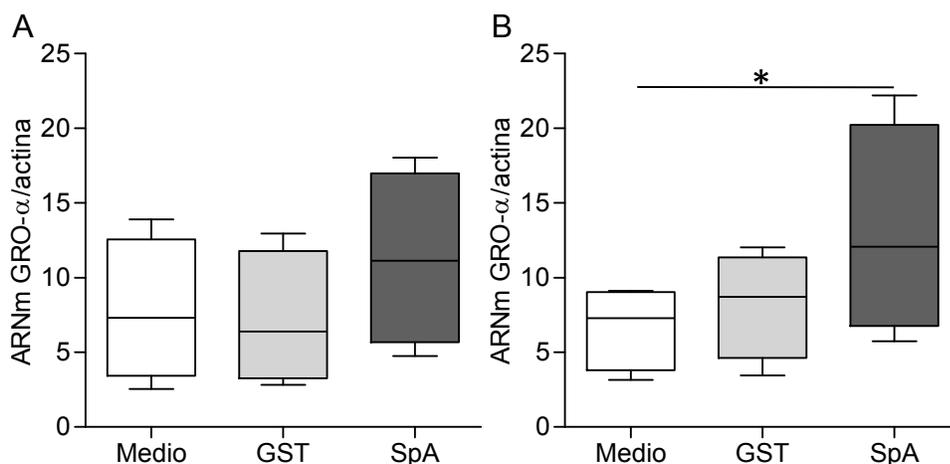
**Figura 11. Expresión de IP-10 en los neutrófilos en respuesta al estímulo con proteína A.** Neutrófilos humanos fueron estimulados durante 2 horas (A) o 4 horas (B y C) con SpA (0,5  $\mu\text{M}$ ), GST (control) o medio. Se determinó la expresión de IP-10 por RT-PCR de Tiempo Real (datos expresados relativos a actina) (n=4-5) y la producción de dicha citoquina por el método de ELISA (n=7). Las cajas indican los percentiles 25 y 75 calculados a partir de los valores obtenidos para cada dador individual, los bigotes representan el valor máximo y el valor mínimo obtenido y la línea horizontal corresponde a la mediana grupal. ANOVA de un factor- Friedman Test con Post Test de Dunn's (\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

Posteriormente se evaluó el rol de la región polimórfica Xr en la inducción de la expresión de IP-10 en neutrófilos determinándose que la misma no está involucrada en la inducción de dicha quimioquina en los neutrófilos a los tiempos evaluados (Figura 12).



**Figura 12: Expresión de IP-10 en neutrófilos en respuesta al estímulo con la región polimórfica de la proteína A.** Neutrófilos humanos fueron estimulados durante 2 horas con SpA (0.5  $\mu$ M) Xr (0.5  $\mu$ M), GST (0.5  $\mu$ M, control) o medio. Se determinó la expresión IP-10 por RT-PCR de tiempo real (datos expresados relativos a actina). Las cajas indican los percentiles 25 y 75 calculados a partir de los valores obtenidos para cada dador individual, los bigotes representan el valor máximo y el valor mínimo obtenido y la línea horizontal corresponde a la mediana grupal. ANOVA de un factor- Friedman Test con Post Test de Dunn's (n=7) (\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

Al evaluar la capacidad de SpA de inducir la expresión de GRO- $\alpha$  se observó un incremento significativo a las 4 horas luego de la estimulación (Figura 13A y 13B)



**Figura 13. Expresión de GRO- $\alpha$  en neutrófilos en respuesta al estímulo con proteína A.** Neutrófilos humanos fueron estimulados durante 2 horas (A) o 4 horas (B) con SpA (0.5  $\mu$ M), GST (0.5  $\mu$ M, control) o medio. Se determinó la expresión de GRO- $\alpha$  por RT-PCR de Tiempo Real (datos expresados relativos a actina). Las cajas indican los percentiles 25 y 75 calculados a partir de los valores obtenidos para cada dador individual, los bigotes representan el valor máximo y el valor mínimo obtenido y la línea horizontal corresponde a la mediana grupal. ANOVA de un factor- Prueba de Friedman con prueba adicional de Dunn's (n=4) (\*:  $p < 0.05$ ).

### 3.1.3. Conclusiones Parciales:

- i. La proteína A de *S. aureus* promueve la activación temprana de los neutrófilos mediante la señalización vía TNFR1.
- ii. SpA es capaz de inducir la expresión de citoquinas pro-inflamatorias tales como TNF- $\alpha$  e IFN- $\beta$  y quimioquinas tales como IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, IP-10 y GRO- $\alpha$  en neutrófilos cultivados *in vitro*.
- iii. La expresión de IP-10 resultó independiente de la región polimórfica Xr de la proteína A en neutrófilos a diferencia de lo observado en otros tipos celulares.

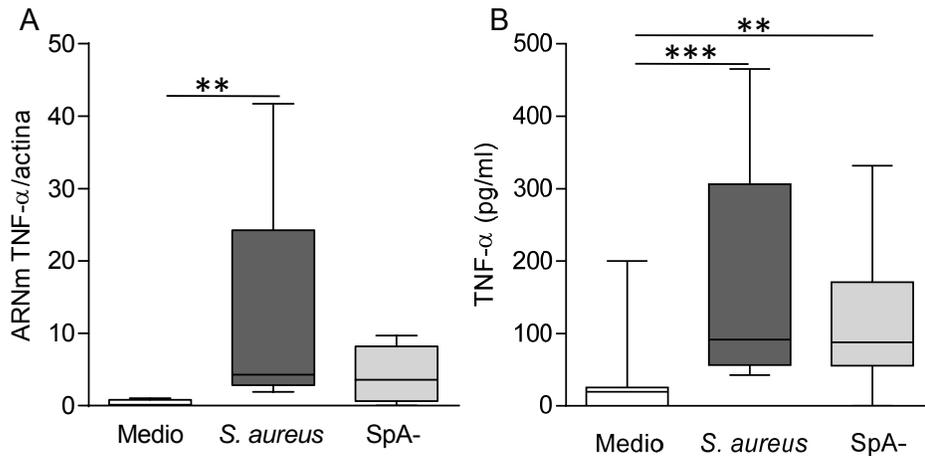
### 3.2. INDUCCIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS EN NEUTRÓFILOS POR *S. aureus*: CONTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA A.

A fin de determinar la relevancia biológica de los resultados obtenidos en los ensayos con proteína A recombinante, se procedió a evaluar la contribución relativa de la misma en la inducción de citoquinas y quimioquinas en respuesta al estímulo con *S. aureus*. Para ello, neutrófilos humanos en cultivo fueron estimulados con *S. aureus* o con una mutante isogénica que carece de la expresión de proteína A (SpA-).

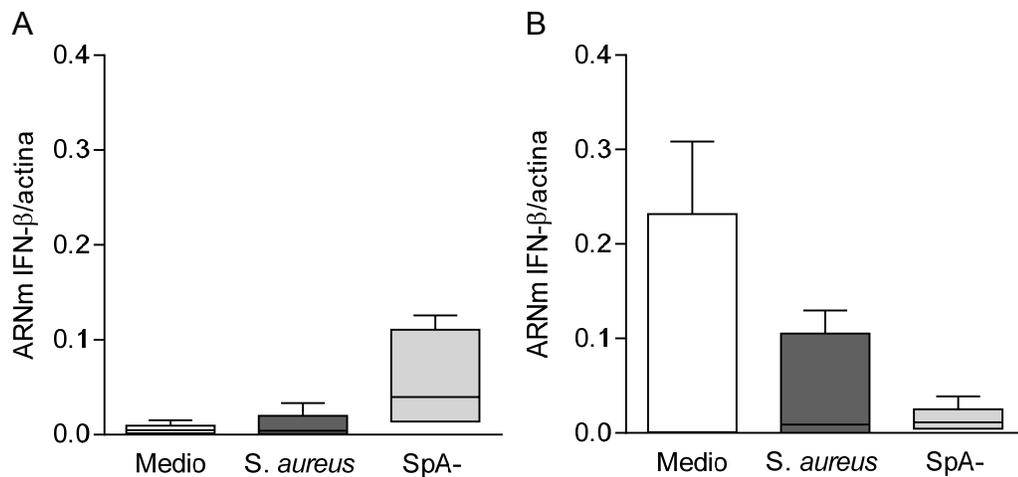
#### 3.2.1. Inducción de citoquinas inflamatorias por *S.aureus* en neutrófilos.

Se evaluó la expresión y producción de TNF- $\alpha$  luego de 2 horas (resultados no mostrados) y 4 horas de estimulación con *S. aureus* (Figura 14). Se observó un aumento significativo en la expresión y producción de TNF- $\alpha$  en respuesta al estímulo con *S. aureus* luego de 4 horas de estimulación (Figura 14A y 14B). Al evaluar el rol de SpA, se observó que la expresión de dicha proteína contribuyó en la inducción de TNF- $\alpha$  por *S. aureus* en neutrófilos aunque no resultó indispensable para la producción de dicha citoquina (Figura 14A y 14B).

La estimulación con *S. aureus* no indujo un incremento en la expresión de IFN- $\beta$  en neutrófilos a tiempos cortos luego de la estimulación (Figura 15A y 15B) a pesar de la pequeña inducción observada en respuesta a SpA (Figura 6).



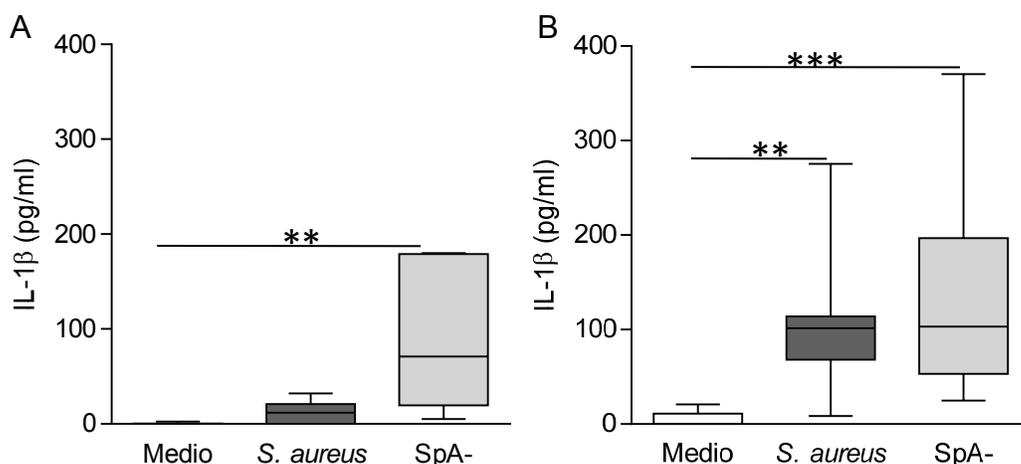
**Figura 14. Rol de la proteína A de *S. aureus* en la expresión y producción de TNF- $\alpha$  en neutrófilos.** Neutrófilos humanos fueron estimulados durante 4 horas (A y B) con *S. aureus* o la mutante isogénica SpA- (MOI=20). Se determinó la expresión de ARNm de TNF- $\alpha$  por RT-PCR de Tiempo Real (datos expresados relativos a actina) (n=5) y la producción de TNF- $\alpha$  por ELISA (n=15). Las cajas indican los percentiles 25 y 75 calculados a partir de los valores obtenidos para cada dador individual, los bigotes representan el valor máximo y el valor mínimo obtenido y la línea horizontal corresponde a la mediana grupal. ANOVA de un factor- Prueba de Friedman con prueba adicional de Dunn's (\*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).



**Figura 15. Expresión de IFN- $\beta$  en respuesta al estímulo con *S. aureus* en neutrófilos.** Neutrófilos humanos fueron estimulados durante 2 horas (A) o 4 horas (B) con *S. aureus* o la mutante isogénica SpA- (MOI=20). Se determinó la expresión de IFN- $\beta$  por RT-PCR de Tiempo Real (datos expresados relativos a actina). Las cajas indican los percentiles 25 y 75 calculados a partir de los valores obtenidos para cada dador individual, los bigotes representan el valor máximo y el valor mínimo obtenido y la línea horizontal corresponde a la mediana grupal (n=4-5).

Al evaluar la producción de IL-1 $\beta$  en respuesta al estímulo con *S. aureus* se observó un aumento significativo únicamente luego de 4 horas de estimulación (Figura 16A y 16B). Al evaluar el

rol de SpA, se observó un aumento significativo en la producción de IL-1 $\beta$  luego de 2 y 4 horas de estimulación con la mutante SpA- (Figura 16A y 16B). Este resultado concuerda con estudios previos del laboratorio y se relaciona con la inducción de IL-1RII soluble por *S. aureus* (Giai *et al.*, 2016).

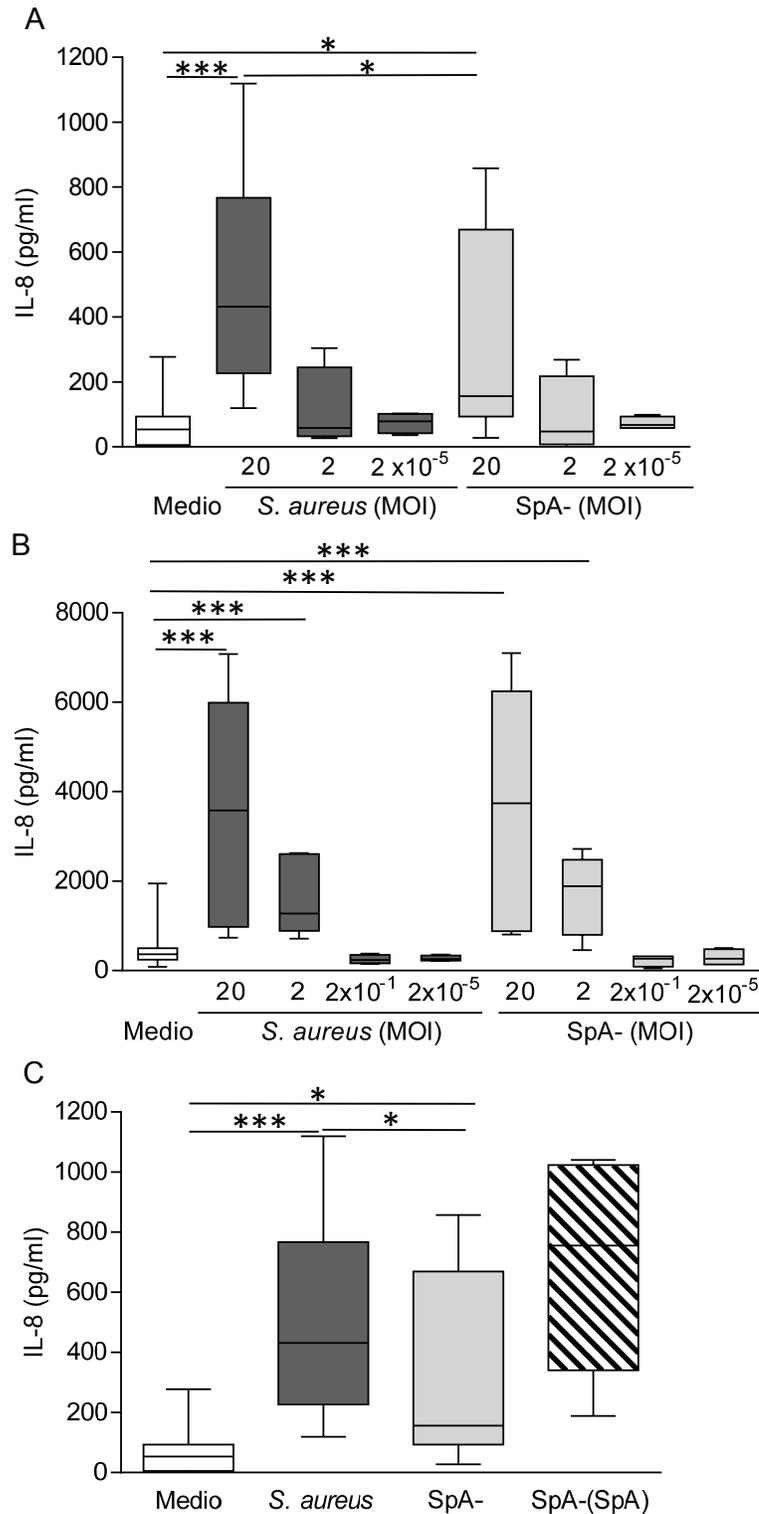


**Figura 16. Producción de IL-1 $\beta$  en respuesta al estímulo con *S. aureus* en neutrófilos.** Neutrófilos humanos fueron estimulados durante 2 horas (A) o 4 horas (B) con *S. aureus* o la mutante isogénica SpA- (MOI=20). Se determinó la expresión de IL-1 $\beta$  por ELISA. Las cajas indican los percentiles 25 y 75 calculados a partir de los valores obtenidos para cada dador individual, los bigotes representan el valor máximo y el valor mínimo obtenido y la línea horizontal corresponde a la mediana grupal (n=6-11). ANOVA de un factor- Prueba de Friedman con prueba adicional de Dunn's (\*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

### 3.2.2. Inducción de quimioquinas por *S. aureus* en neutrófilos.

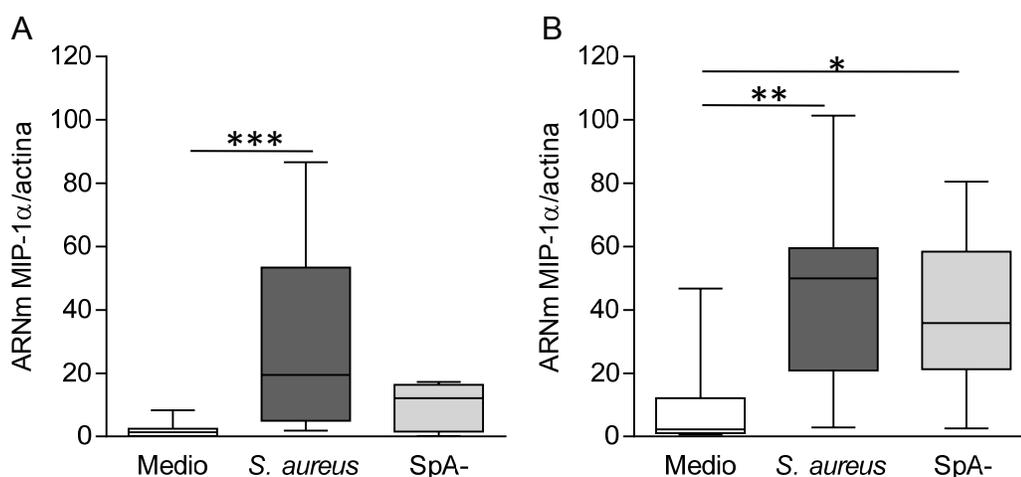
Se evaluó la producción de IL-8 en neutrófilos en respuesta al estímulo por *S. aureus*. Considerando la importancia de la IL-8 para el reclutamiento y activación de neutrófilos, se determinó, además de la cinética de producción, la mínima concentración bacteriana capaz de inducirla. Se observó que a las dos horas luego de la estimulación con *S. aureus* únicamente los neutrófilos estimulados con una MOI=20 produjeron IL-8 (Figura 17A). Por el contrario, a las 4 horas post-estimulación se observó producción de IL-8 en respuesta a *S. aureus* utilizando una MOI=20 así como con una MOI=2 (Figura 17B). No se observó inducción temprana de IL-8 a MOI menores a 2. Asimismo, no se observó producción de IL-8 a los 15, 30 o 60 minutos de estimulación (resultados no mostrados).

Al evaluar el rol de SpA en la producción de IL-8 inducida por *S. aureus* en neutrófilos, se observó que la misma resultó significativamente dependiente de la expresión de SpA a las 2 horas post-estimulación (Figura 17A y 17C). Por el contrario, a las 4 horas post-estimulación la expresión de SpA no resultó indispensable para la inducción de IL-8 (Figura 17B). El rol de la proteína A en la inducción temprana de IL-8 por *S. aureus* se confirmó mediante el uso de la cepa isogénica complementada SpA-(SpA) observándose complementación parcial evidenciada por niveles de IL-8 similares a los observados en respuesta a *S. aureus* (Figura 17C).



**Figura 17. Rol de la proteína A en la producción de IL-8 en respuesta al estímulo con *S. aureus* en neutrófilos.** Neutrófilos humanos fueron estimulados durante 2 horas (A) o 4 horas (B) con *S. aureus* o la mutante isogénica SpA- a las MOI indicadas (n=4-18 por grupo). (C) Neutrófilos humanos fueron estimulados con *S. aureus*, SpA- o la cepa complementada SpA-(SpA) (MOI=20) durante 2 horas (n=6). Se determinó la producción de IL-8 por ELISA. Las cajas indican los percentiles 25 y 75 calculados a partir de los valores obtenidos para cada dador individual, los bigotes representan el valor máximo y el valor mínimo obtenido y la línea horizontal corresponde a la mediana grupal. ANOVA de un factor- Prueba de Friedman con prueba adicional de Dunn's (\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

Paralelamente se evaluó el rol de la proteína A en la inducción de MIP-1 $\alpha$  y MCP-1 en respuesta al estímulo con *S. aureus*. Se observó un aumento significativo en la expresión de MIP-1 $\alpha$  en neutrófilos estimulados durante 2 o 4 horas con *S. aureus* (Figura 18A y 18B). Interesantemente, en ausencia de SpA, se observó inducción de MIP-1 $\alpha$  únicamente a las 4 horas luego de la estimulación, destacando el rol de la proteína A en la inducción temprana de dicha quimioquina (Figura 18A y 18B).

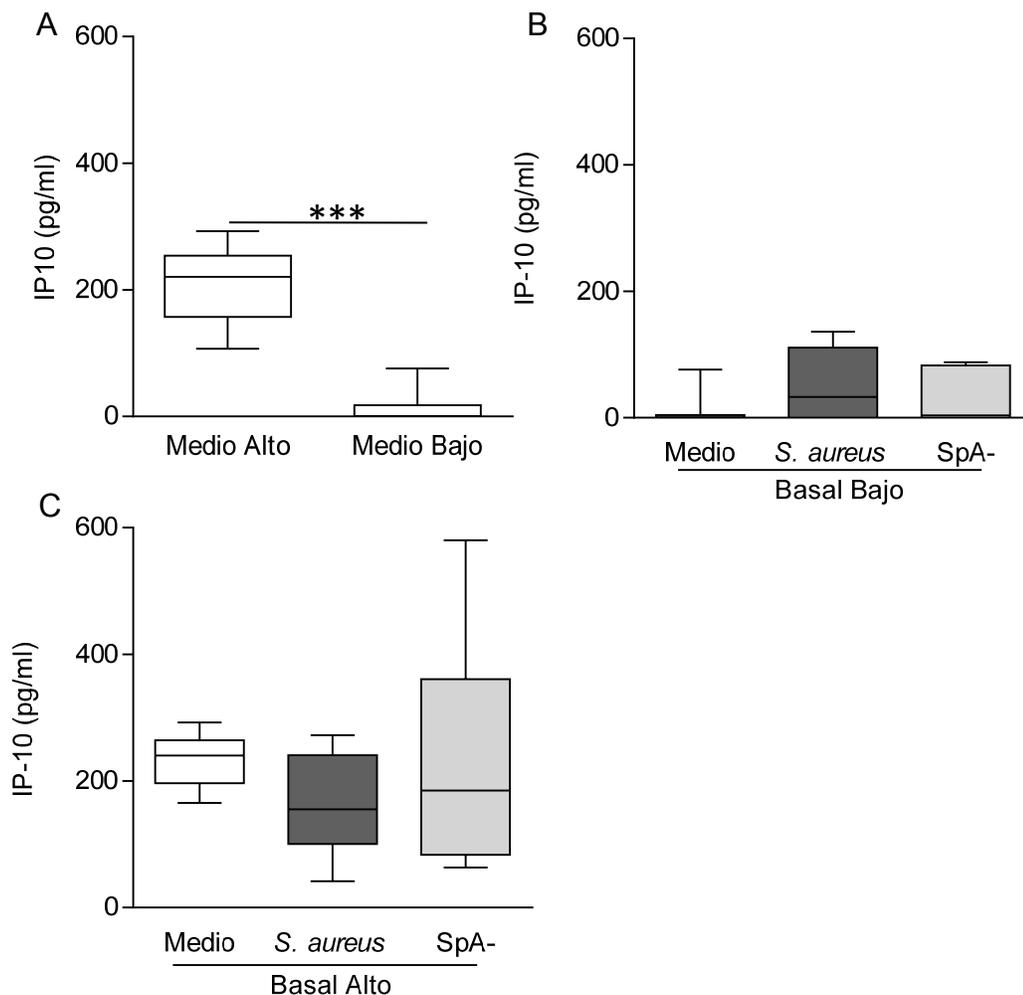


**Figura 18. Rol de la proteína A en la inducción de MIP-1 $\alpha$  en respuesta al estímulo con *S. aureus* en neutrófilos.** Neutrófilos humanos fueron estimulados durante 2 horas (A) o 4 horas (B) con *S. aureus* o la mutante isogénica SpA- (MOI=20). Se determinó la expresión de ARNm por RT-PCR de Tiempo Real (datos expresados relativos a actina). Las cajas indican los percentiles 25 y 75 calculados a partir de los valores obtenidos para cada dador individual, los bigotes representan el valor máximo y el valor mínimo obtenido y la línea horizontal corresponde a la mediana grupal. ANOVA de un factor- Prueba de Friedman con prueba adicional de Dunn's (n=8) (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

Al evaluar la expresión de MCP-1, a pesar de los resultados obtenidos con SpA recombinante (Figura 10B), no se observaron incrementos significativos en respuesta al estímulo con *S. aureus* a las 2 o 4 horas luego de la estimulación (resultados no mostrados).

Posteriormente se procedió a evaluar la relevancia de la inducción de IP-10 por SpA durante el estímulo con *S. aureus*. Al evaluar la producción de IP-10 en neutrófilos en cultivo sin estimular, se observó que existen dos poblaciones de dadores con producción diferencial de la quimioquina luego de 4 horas de cultivo en presencia de medio (Figura 19A). A estas dos poblaciones se las denominó dadores de “basal bajo” (produjeron menos de 100 pg/ml) y dadores de “basal alto” (produjeron más de 100 pg/ml) y se consideró prudente evaluarlas separadamente al cuantificar el efecto de la estimulación con *S. aureus*. No se observaron diferencias significativas en la producción de IP-10 en respuesta a *S. aureus* en ninguno de los grupos (Figura 19B y 19C). No obstante, se observó una tendencia al aumento en la producción de IP-10 en respuesta a *S. aureus* en el grupo de “basal bajo” y una tendencia a la disminución en la producción de IP-10 en respuesta a *S. aureus*

en el grupo de “basal alto” (Figura 19B y 19C). En ambos grupos la cepa SpA- se comportó de manera similar a *S. aureus* (Figura 19B y 19C).



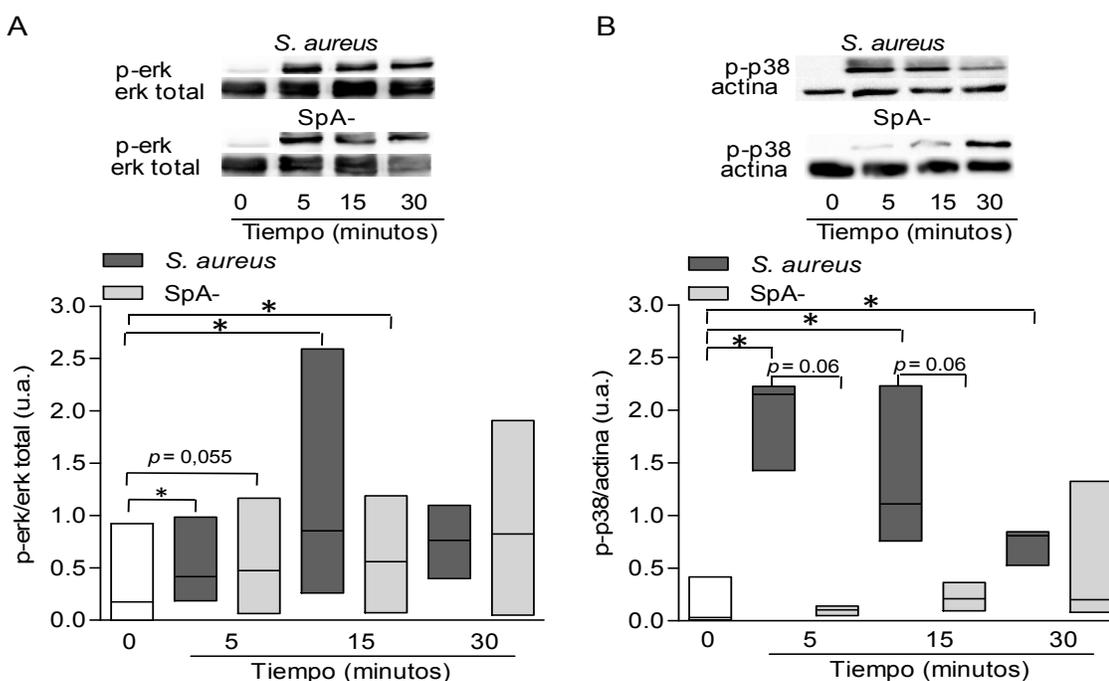
**Figura 19. Inducción de IP-10 en respuesta al estímulo con *S. aureus* en neutrófilos.** (A, B, C) Neutrófilos humanos fueron estimulados durante 4 horas con *S. aureus* o SpA- (MOI=20) y se determinó la producción de IP-10 por ELISA. (A) (n=16), (B) (n=10) y (C) (n=6). Las cajas indican los percentiles 25 y 75 calculados a partir de los valores obtenidos para cada dador individual, los bigotes representan el valor máximo y el valor mínimo obtenido y la línea horizontal corresponde a la mediana grupal. Prueba de Mann-Whitney (\*\*\*:  $p < 0.001$ ).

### 3.2.3. Conclusiones Parciales:

- i. *S. aureus* induce la producción de citoquinas inflamatorias y quimioquinas tales como IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y MIP-1 $\alpha$  en neutrófilos.
- ii. La inducción temprana de IL-8 y MIP-1 $\alpha$  por *S. aureus* resultó dependiente de la expresión de SpA.
- iii. *S. aureus* y la proteína A contribuyen a modular el perfil inflamatorio de los neutrófilos en forma temprana luego de la estimulación.

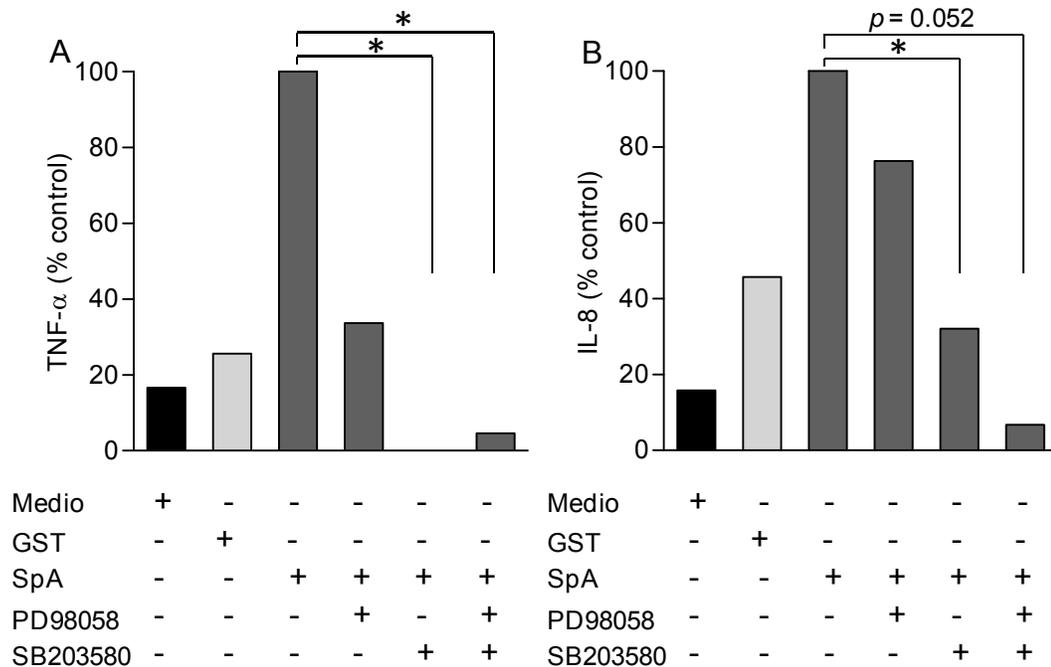
### 3.3. ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE MAPKs EN NEUTRÓFILOS POR *S. aureus* Y LA PROTEÍNA A.

Considerando que la inducción de IL-8 y el aumento en la expresión de CD11b inducido por la proteína A en neutrófilos resultaron dependientes de TNFR1 y dado que dicho receptor induce la activación de MAPKs tales como p38 y erk1/2, se procedió a evaluar si *S. aureus* inducía la activación de MAPKs en neutrófilos y el rol de la proteína A en dicha activación. Para ello, neutrófilos humanos en cultivo fueron estimulados con *S. aureus* o con la mutante isogénica SpA- y a diferentes tiempos se evaluó la fosforilación de erk1/2 y p38. *S. aureus* indujo la fosforilación de erk1/2 tan pronto como a los 5 minutos post-estimulación (Figura 20A), observándose niveles de fosforilación aún mayores a los 15 minutos post-estimulación (Figura 20A). Al evaluar el rol de SpA en la activación de erk1/2 inducida por *S. aureus*, se observó que la misma resultó independiente de la expresión de dicha proteína (Figura 20A). Al evaluar la activación de p38, se observó que *S. aureus* indujo un incremento de la fosforilación de dicha MAPK a partir de los 5 minutos de estimulación (Figura 20B). A diferencia de los resultados obtenidos con erk1/2, la mutante SpA- indujo escasos niveles de fosforilación de p38 los cuales no resultaron significativamente diferentes del nivel basal a ninguno de los tiempos evaluados (Figura 20B).



**Figure 20. Activación de MAPKs inducida por *S. aureus* en neutrófilos.** Neutrófilos humanos fueron estimulados con *S. aureus* o la mutante isogénica SpA- y se determinó la fosforilación de erk1/2 (A) (n=4-8) y p38 (B) (n=4-6) a los tiempos indicados por Western blot. erk total o  $\beta$ -actina fueron usados como control de carga. Se grafican los valores de intensidad relativa en unidades arbitrarias (u. a.) de cada banda obtenida de dadores individuales analizada con el programa ImagenJ. Las barras representan todos los valores obtenidos, sus extremos indican los valores mínimo y máximo y la línea horizontal la mediana grupal. Se muestra un inmunoblot representativo obtenido de un dador individual de al menos 3 experimentos. Prueba de Mann-Whitney (\*:  $p < 0.05$ ).

A fin de determinar el rol de la fosforilación de erk1/2 y p38 en la producción de citoquinas inducida por la proteína A y *S. aureus*, se realizaron ensayos bloqueando la actividad de dichas quinasas. Para ello, los neutrófilos fueron estimulados durante 4 horas con *S. aureus* o proteína A en presencia o ausencia de inhibidores específicos de la quinasa involucrada en la fosforilación de erk1/2 (PD98058, 25  $\mu$ M) o de la actividad catalítica de p38 (SB203580, 5 $\mu$ M) y se cuantificaron los niveles de IL-8 y TNF- $\alpha$ . La inhibición de erk1/2 bloqueó parcialmente la producción de TNF- $\alpha$  (Figura 21A) e IL-8 (Figura 21B) en respuesta a proteína A mientras que la inhibición de p38, por el contrario, bloqueó significativamente la producción de dichas citoquinas inducida por la proteína A (Figura 21A y 21B). La producción de TNF- $\alpha$  e IL-8 fue inhibida por completo cuando las células se estimularon en presencia de ambos inhibidores indicando la importancia de p38 y erk1/2 en la producción de las mismas en respuesta al estímulo con SpA en neutrófilos (Figura 21A y 21B).

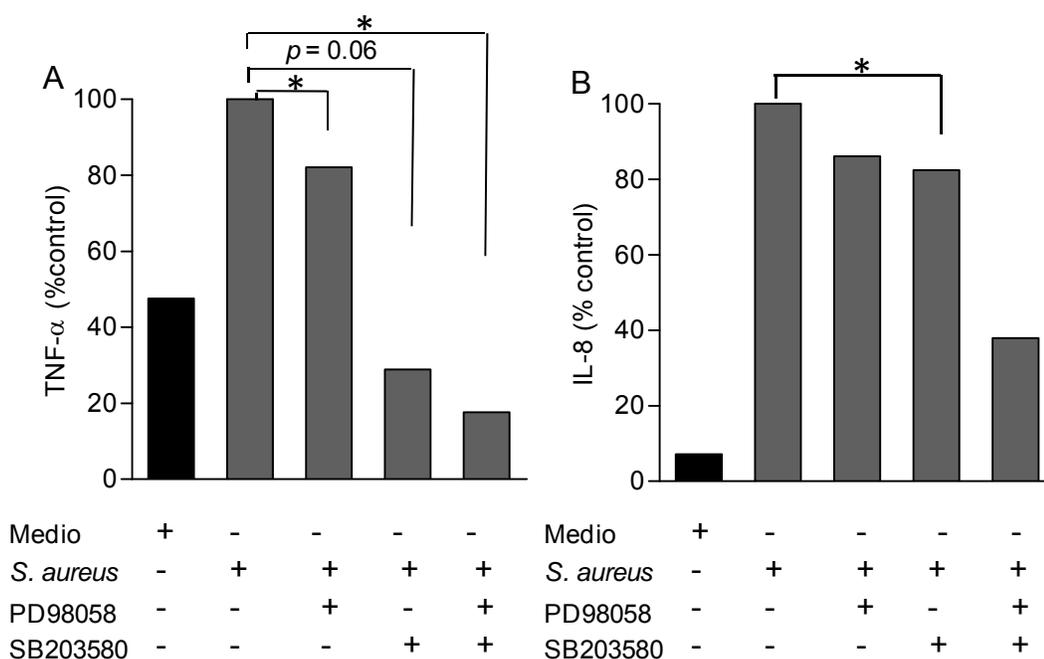


**Figura 21. Efecto de la inhibición de erk1/2 y p38 en la producción de TNF- $\alpha$  e IL-8 inducida por la proteína A purificada en neutrófilos.** Neutrófilos humanos fueron pre-tratados por 30 minutos con el inhibidor de MEK (PD98058, 25  $\mu$ M), el inhibidor de p38 (SB203580, 5  $\mu$ M) o ambos inhibidores y luego estimulados con SpA (0.5  $\mu$ M), GST (control) o medio. Luego de 4 horas se cuantificó la producción de TNF- $\alpha$  (A) e IL-8 (B) por el método de ELISA. Cada barra representa la mediana de los valores de los porcentajes relativos control positivo (considerado como los valores obtenidos al estimular con SpA en ausencia de inhibidor) obtenidos de dadores individuales. Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas (n=3-5) (\*:  $p < 0.05$ ).

Al analizar la implicancia de p38 y erk1/2 en la producción de TNF- $\alpha$  inducida por *S. aureus*, se observó que tanto el bloqueo de erk1/2 como el bloqueo de p38 y en consecuencia el bloqueo simultáneo de ambas quinasas disminuyó significativamente la producción de TNF- $\alpha$  (Figura 22A).

El impacto de la activación de p38 y erk1/2 en la inducción de IL-8 por *S. aureus* resultó menos claro ya que luego de 4 horas de estimulación se observó inhibición parcial en presencia de los inhibidores (Figura 22B) sugiriendo que otras vías de señalización probablemente inducidas por moléculas diferentes de SpA estarían además involucradas en la producción de IL-8 (Figura 22B).

Es posible hipotetizar que las diferencias observadas entre los ensayos de activación de MAPKs, en los que SpA resultó crítica para la activación de p38 y el impacto del bloqueo de la actividad de las mismas en la inducción de IL-8 se deban en parte a los tiempos evaluados. Dado que la producción de IL-8 por los neutrófilos es significativamente dependiente de la expresión de SpA a las dos horas post-estimulación (Figura 17C) y no lo es a las 4 horas post-estimulación (Figura 17B) ensayos de bloqueo de MAPKs luego de 2 horas de estimulación permitirán esclarecer el rol de p38 en la inducción de IL-8 por *S. aureus*.



**Figura 22. Efecto de la inhibición de erk1/2 y p38 en la producción de TNF- $\alpha$  e IL-8 inducida por *S. aureus*.** Neutrófilos humanos fueron pre-tratados por 30 minutos con el inhibidor de MEK (PD98058, 25  $\mu$ M), el inhibidor de p38 (SB203580, 5  $\mu$ M) o ambos inhibidores y estimulados con *S. aureus* durante 4 horas. Se cuantificó la producción de TNF- $\alpha$  (A) e IL-8 (B) por el método de ELISA. Cada barra representa la mediana de los valores de los porcentajes relativos al control positivo (considerado como los valores obtenidos al estimular con *S. aureus* en ausencia de inhibidor) obtenidos de donadores individuales. Prueba de Wilcoxon para muestras pareadas (n=3-5) (\*:  $p < 0.05$ ).

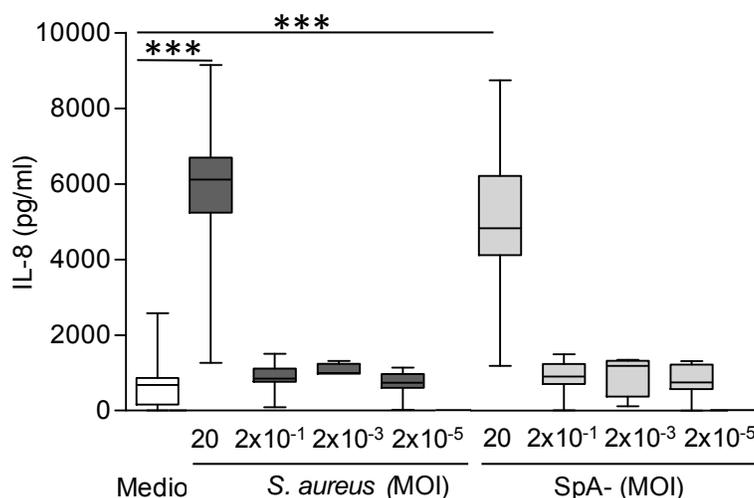
### 3.3.1 Conclusiones parciales:

- i. *S. aureus* induce la activación de erk1/2 y p38 en neutrófilos.
- ii. La proteína A contribuye a la fosforilación temprana de p38.
- iii. Se demostró que la activación de la vía de señalización de erk1/2 y p38 contribuyen a la producción de IL-8 y TNF- $\alpha$  inducida por *S. aureus* y la proteína A en neutrófilos.

### 3.4. IMPACTO DE LA ESTIMULACIÓN CON *S. aureus* EN LA SOBREVIDA DE LOS NEUTRÓFILOS: CONTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA A.

#### 3.4.1. Inducción sostenida de citoquinas y quimioquinas en respuesta al estímulo con *S. aureus*.

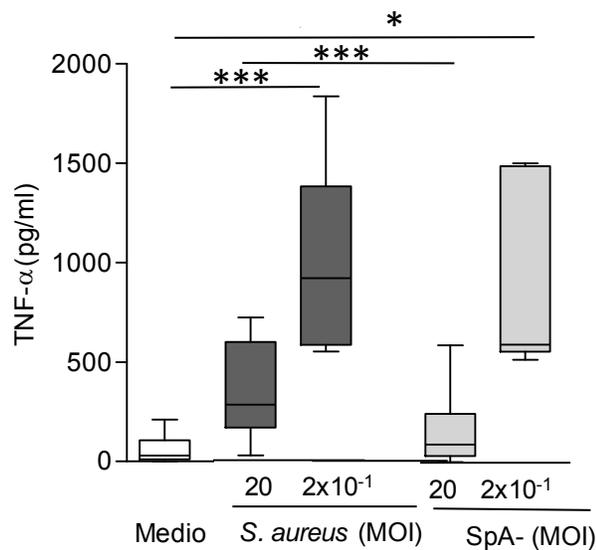
A fin de evaluar el impacto de la estimulación con *S. aureus* en la modulación de la supervivencia de los neutrófilos, se determinó en primer lugar la capacidad de dicho microorganismo y el rol de SpA en la inducción de citoquinas y quimioquinas en neutrófilos a tiempos prolongados de estimulación. Para ello, neutrófilos humanos en cultivo fueron estimulados con *S. aureus* o con la mutante SpA- durante 22 horas y se cuantificó la producción de IL-8, TNF- $\alpha$  e IP-10. Se observó producción de IL-8 a MOI 20 (Figura 23) siendo los niveles de IL-8 producidos luego de 22 horas mayores que los niveles alcanzados a las 4 horas post-estimulación (Figura 17B y 23). Asimismo, se observó que, al igual que a las 4 horas post-estimulación, la expresión de SpA no resultó indispensable para la producción de dicha quimioquina (Figura 23).



**Figura 23. Producción de IL-8 en neutrófilos estimulados con *S. aureus*.** Neutrófilos humanos fueron estimulados durante 22 horas con *S. aureus*, la mutante isogénica SpA- o medio (control) a las MOI indicadas y se determinó la producción de IL-8 por ELISA. Las cajas indican los percentiles 25 y 75 calculados a partir de los valores obtenidos para cada dador individual, los bigotes representan el valor máximo y el valor mínimo obtenido y la línea horizontal corresponde a la mediana grupal. ANOVA de un factor- Prueba de Friedman con prueba adicional de Dunn`s (n=4-24) (\*\*\*:  $p < 0.001$ ).

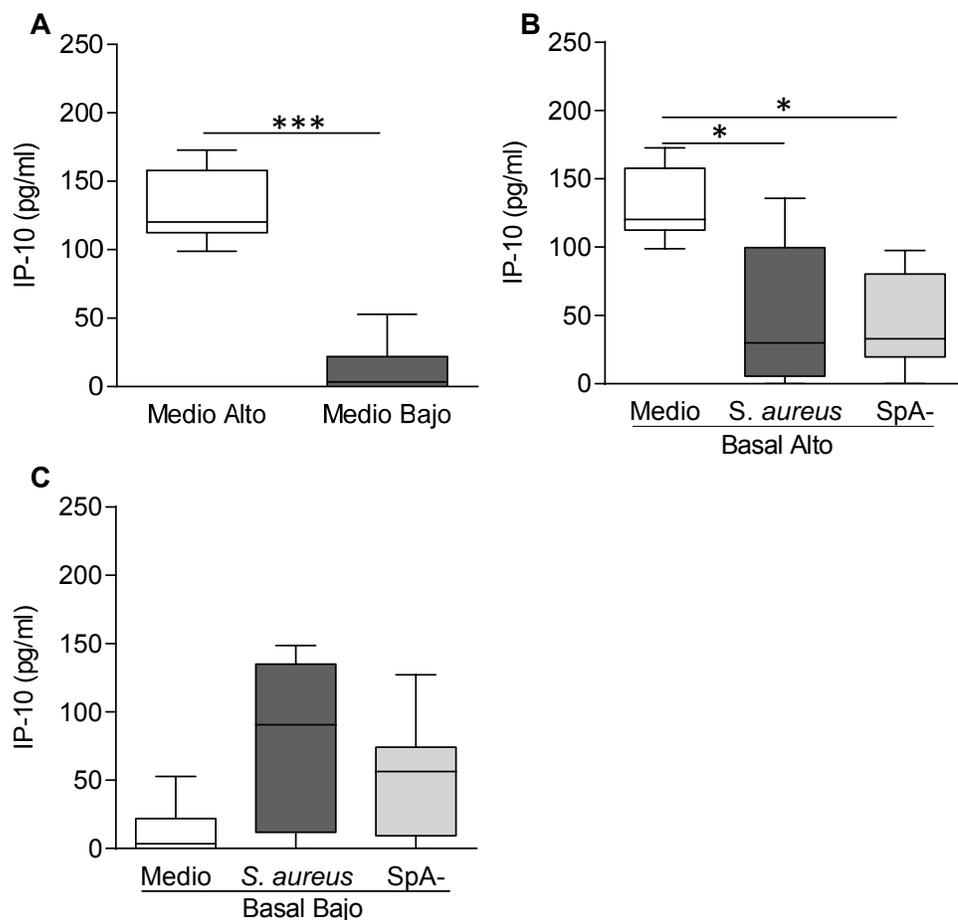
Al evaluar la producción de TNF- $\alpha$  en respuesta al estímulo con *S. aureus*, se observó un aumento significativo en la producción de TNF- $\alpha$  a MOI 20 (Figura 24). Al evaluar la producción de TNF- $\alpha$  a MOI 2x10<sup>-1</sup>, sin embargo, sorprendentemente se observó una mayor producción de TNF- $\alpha$  que la determinada en respuesta a la MOI 20 (Figura 24). A MOI menores de 2x10<sup>-1</sup> no se observó producción de TNF- $\alpha$  utilizando un pequeño número de dadores (resultados no mostrados).

Al evaluar la capacidad de la mutante SpA- de inducir la producción de TNF- $\alpha$ , se determinó que a MOI 20 la mutante SpA- indujo niveles menores de TNF- $\alpha$  que la cepa salvaje que expresa SpA (Figura 24). Estos resultados sugieren un rol para SpA en la producción de TNF- $\alpha$  o alternativamente que la producción de TNF refleje la viabilidad de los neutrófilos en cultivo y que la misma se module diferencialmente en presencia o ausencia de SpA. Para comenzar a discernir entre ambos procesos se evaluó la producción de TNF- $\alpha$  en respuesta a la mutante SpA- a MOI  $2 \times 10^{-1}$ . Interesantemente la mutante SpA- a MOI  $2 \times 10^{-1}$  indujo mayores niveles de TNF- $\alpha$  que los observados a MOI 20 (Figura 24), un fenómeno similar al descrito para la cepa salvaje al comparar las diferentes MOI. Estos resultados sugieren que las diferencias observadas en la producción de TNF- $\alpha$  podrían deberse a una modulación diferencial de la supervivencia de los neutrófilos, hipótesis que se evaluó en los experimentos que se describen más adelante.



**Figura 24. Producción de TNF- $\alpha$  en neutrófilos en respuesta al estímulo con *S. aureus*.** Neutrófilos humanos fueron estimulados durante 22 horas con *S. aureus*, la mutante isogénica SpA- o medio (control) a las MOI indicadas y se determinó la producción de TNF- $\alpha$  por ELISA. Las cajas indican los percentiles 25 y 75 calculados a partir de los valores obtenidos para cada dador individual, los bigotes representan el valor máximo y el valor mínimo obtenido y la línea horizontal corresponde a la mediana grupal. ANOVA de un factor- Prueba de Friedman con prueba adicional de Dunn's (n=11-24) (\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

Posteriormente se evaluó la producción de IP-10 durante el estímulo sostenido con *S. aureus*. En primer lugar se observó que a las 22 horas de cultivo, al igual que a las 4 horas, existen dos poblaciones de dadores con diferente nivel de producción basal de IP-10 (Figura 25A). Por lo tanto el efecto de la estimulación con *S. aureus* o la mutante SpA- se evaluó en forma separada en dichas poblaciones. Se observó que *S. aureus* indujo la inhibición de la producción de IP-10 en los dadores de nivel "Basal Alto" a 22 horas luego de la estimulación (Figura 25B). Por el contrario, en los dadores de "Basal Bajo" no se observaron diferencias significativas respecto del control (Figura 25C).



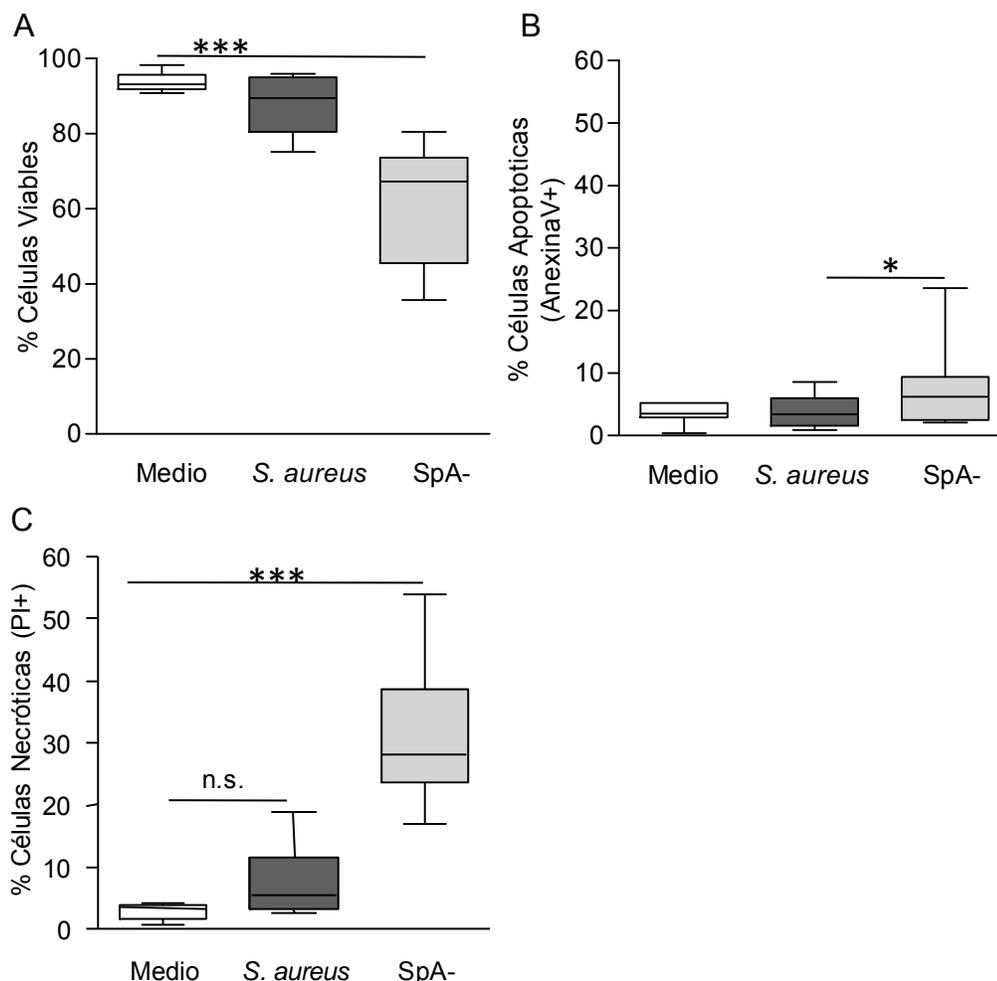
**Figura 25. Producción de IP-10 en neutrófilos en respuesta al estímulo con *S. aureus*.** Neutrófilos humanos fueron estimulados durante 22 horas con medio (control), *S. aureus* o la mutante SpA- (MOI=20). Se determinó la producción de IP-10 por ELISA. Las cajas indican los percentiles 25 y 75 calculados a partir de los valores obtenidos para cada dador individual, los bigotes representan el valor máximo y el valor mínimo obtenido y la línea horizontal corresponde a la mediana grupal. (A) (n=20), (B) (n=10) y (C) (n=10). Prueba de Mann-Whitney (\*\*\*:  $p < 0.001$ ). ANOVA de un factor- Prueba de Friedman con prueba adicional de Dunn's (\*:  $p < 0.05$ ).

### 3.4.2. Modulación de la sobrevivencia de los neutrófilos.

Los resultados obtenidos permitieron demostrar que *S. aureus* induce la producción de señales inflamatorias (algunas dependientes de la expresión de SpA) en neutrófilos y que las mismas se sostienen por períodos prolongados luego de la estimulación. Por lo tanto, es posible plantear la hipótesis que el micro-ambiente pro-inflamatorio generado podría modular el balance entre las señales pro- y anti-apoptóticas, regulando así la vida media de los neutrófilos y el tipo de muerte de los mismos.

A fin de establecer la capacidad de *S. aureus* de modular la sobrevivencia de neutrófilos en cultivo se evaluó la viabilidad celular, la apoptosis y necrosis de los mismos luego de la estimulación con la cepa salvaje o con la mutante SpA- durante 4 o 22 horas. Luego de 4 horas de estimulación con *S. aureus* se observó que más del 90% de los neutrófilos se encontraban viables (Figura 26A). Más aun, la estimulación con *S. aureus* no modificó significativamente el porcentaje de células

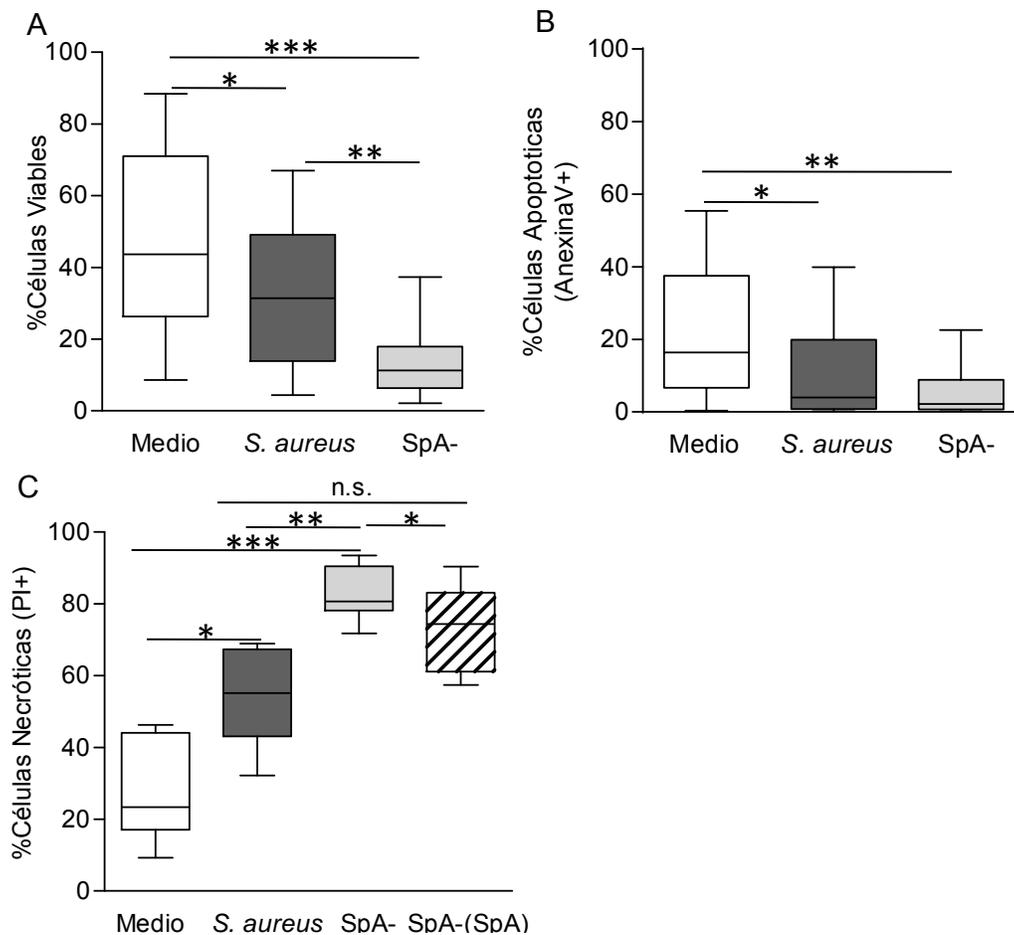
apoptóticas (Figura 26B) y necróticas respecto al control (Figura 26C). Al investigar el rol de SpA en la regulación de la sobrevivencia de los neutrófilos, se observó que la mutante SpA<sup>-</sup> indujo una disminución significativa en el porcentaje de células viables (Figura 26A). Al caracterizar el tipo de mortalidad en respuesta a la mutante SpA<sup>-</sup> se observó un aumento en el porcentaje de apoptosis con respecto a la cepa salvaje *S. aureus* (Figura 26B). Asimismo, se observó un aumento en el porcentaje de células necróticas respecto al control (Figura 26C).



**Figura 26. Viabilidad de neutrófilos estimulados con *S. aureus*.** Neutrófilos humanos fueron estimulados durante 4 horas con *S. aureus*, la mutante SpA<sup>-</sup> o medio (control). Se determinó el porcentaje de neutrófilos viables (dobles negativas) (A), apoptóticos (Anexina-V+) (B) y necróticos (Ioduro de Propidio+) (C) por citometría de flujo. Las cajas indican los percentiles 25 y 75 calculados a partir de los valores obtenidos para cada dador individual, los bigotes representan el valor máximo y el valor mínimo obtenido y la línea horizontal corresponde a la mediana grupal. ANOVA de un factor- Prueba de Friedman con prueba adicional de Dunn's (n=8). (\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

Posteriormente, se determinaron los niveles de viabilidad y se caracterizó el tipo de muerte celular en neutrófilos en cultivo durante 22 horas. Se observó una reducción significativa de la viabilidad de los neutrófilos en cultivo en presencia de medio respecto a los niveles observados a las 4 horas (Figura 26A y 27A, Prueba de Mann-Whitney  $p < 0.001$ ), la cual correlacionó con un esperado incremento en el porcentaje de neutrófilos apoptóticos (Figura 26B y 27B, Prueba de

Mann-Whitney  $p < 0.01$ ) y necróticos (Figura 26C y 27C, Prueba de Mann-Whitney  $p < 0.001$ ). Al evaluar la sobrevivencia de neutrófilos en cultivo estimulados con *S. aureus* se observó una disminución significativa en el porcentaje de neutrófilos viables respecto al control (Figura 27A). Al evaluar el rol de SpA se observó que la estimulación con la mutante SpA- no sólo redujo significativamente la viabilidad de los neutrófilos respecto al control luego de 22 horas de cultivo sino que la misma resultó además significativamente menor a la observada en respuesta a *S. aureus* (Figura 27A). Al evaluar el tipo de mortalidad se observó que tanto *S. aureus* como la mutante SpA- indujeron una disminución significativa en el porcentaje de neutrófilos apoptóticos (Figura 27B) y un aumento significativo en el porcentaje de neutrófilos necróticos respecto al control (Figura 27C). Más aún, la estimulación con la mutante SpA- indujo un mayor porcentaje de necrosis con respecto al observado en neutrófilos estimulados con *S. aureus* (Figura 27C).



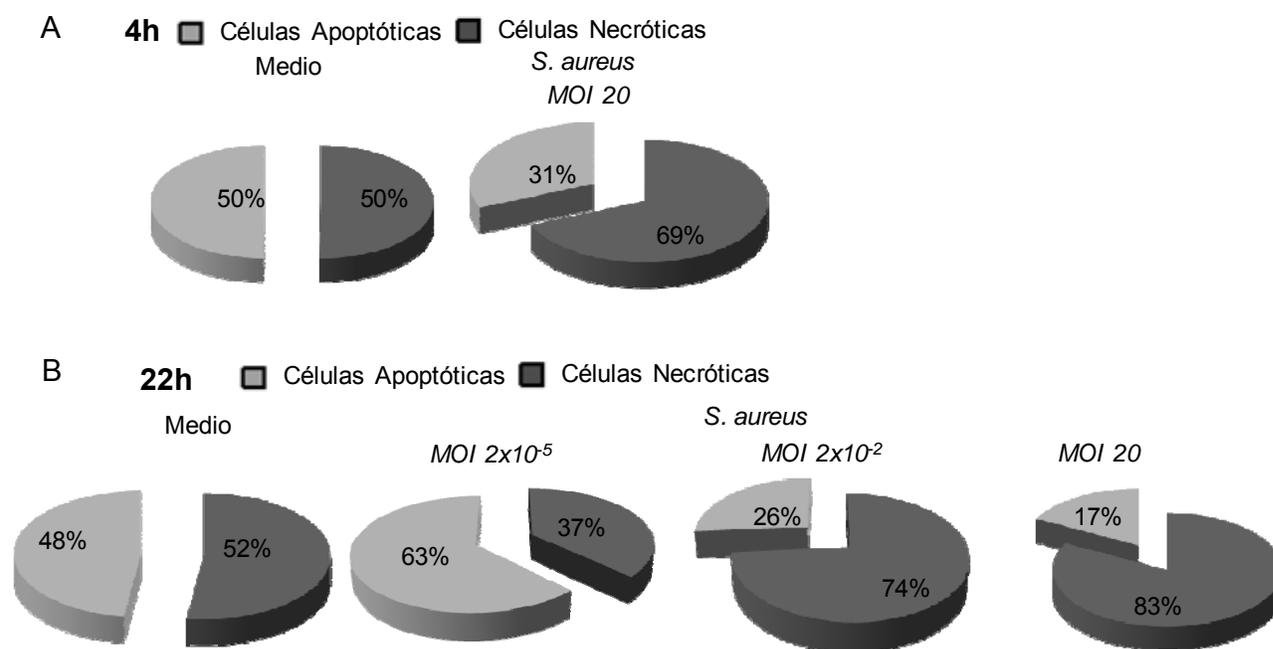
**Figura 27. Sobrevivencia de neutrófilos en respuesta al estímulo con *S. aureus*.** Neutrófilos humanos fueron estimulados durante 22 horas con *S. aureus*, SpA- o medio (control). Se determinó el porcentaje de neutrófilos viables (dobles negativas) (A), apoptóticos (Anexina-V +) (B) y necróticos (Ioduro de Propidio +) (C) por citometría de flujo. Las cajas indican los percentiles 25 y 75 calculados a partir de los valores obtenidos para cada dador individual, los bigotes representan el valor máximo y el valor mínimo obtenido y la línea horizontal corresponde a la mediana grupal. ANOVA de un factor- Prueba de Friedman con prueba adicional de Dunn's (n=6-24). (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

A fin de validar este hallazgo se realizaron ensayos de complementación con la cepa SpA- (SpA) observándose la complementación parcial del fenotipo observado respecto del porcentaje de neutrófilos necróticos luego de 22 horas de estimulación (Figura 27C).

Posteriormente, a fin de determinar si *S. aureus* y SpA modulaban el tipo de mortalidad de los neutrófilos, se analizó la distribución de las frecuencias de células apoptóticas y necróticas, dentro del total de células muertas en respuesta a medio, *S. aureus* o la mutante isogénica SpA-.

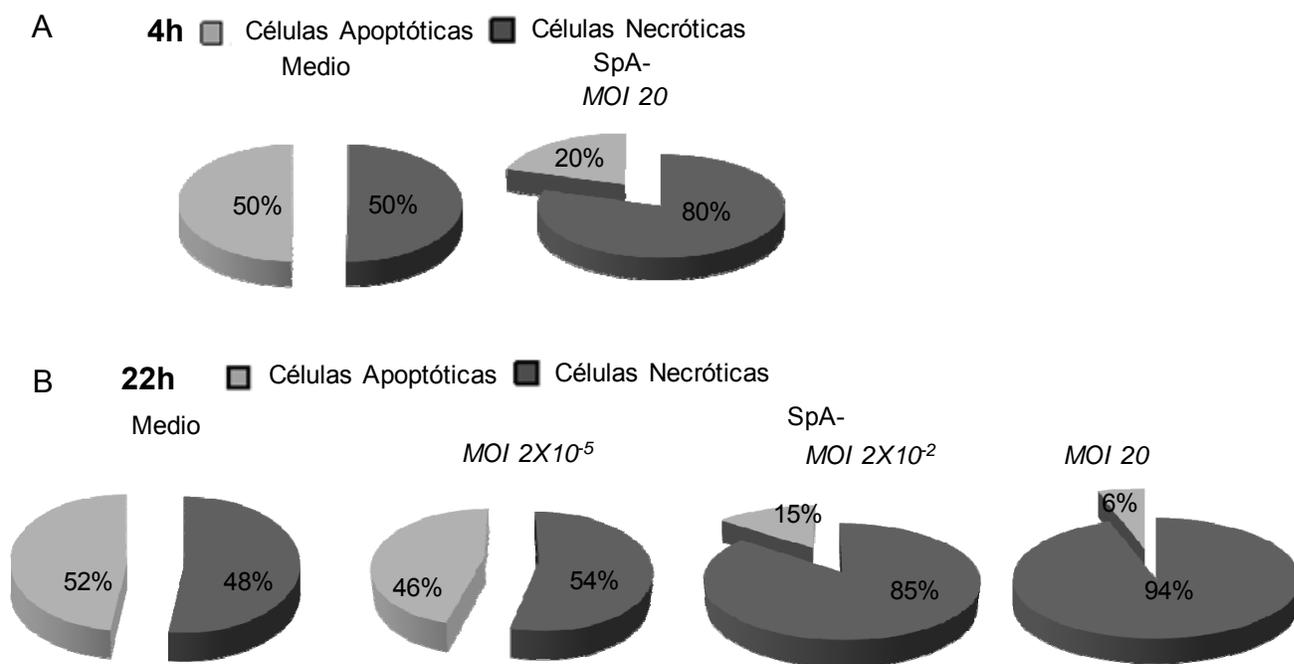
Inicialmente se observó que tanto a las 4 horas como a las 22 horas de cultivo en medio los neutrófilos presentaban similar proporción de apoptosis que de necrosis (Figura 28A y 28B).

Por el contrario, luego de 4 horas de estimulación con *S. aureus* expresando SpA, se observó un cambio significativo en la distribución de apoptosis/necrosis observándose un incremento en este último tipo de muerte celular (Figura 28A). Al evaluar el patrón de mortalidad luego de 22 horas de estimulación, se observó que con una MOI baja ( $2 \times 10^{-5}$ ) el patrón de mortalidad no difirió significativamente respecto de células incubadas en medio (Figura 28B). Al incrementar la carga bacteriana, se observó a partir de  $MOI = 2 \times 10^{-2}$  y en forma dosis dependiente un incremento significativo en el porcentaje de neutrófilos necróticos en respuesta a *S. aureus* (Figura 28B). Estos resultados indican que *S. aureus* induce cambios significativos en el tipo de muerte celular de los neutrófilos.



**Figura 28. Modulación del tipo de mortalidad de los neutrófilos en respuesta al estímulo con *S. aureus*.** Análisis de la frecuencia de neutrófilos apoptóticos y necróticos luego de 4 horas de estimulación (A) (n=4) o 22 horas de estimulación (B) (MOI  $2 \times 10^{-5}$ , n=4), (MOI  $2 \times 10^{-2}$ , n=4) y (MOI 20, n=17). Prueba de Chi-cuadrado realizada para las frecuencias obtenidas para cada dador individual entre Medio y *S. aureus* (\*\*:  $p < 0.01$ , para MOI 0.02 y  $2 \times 10^{-5}$ ).

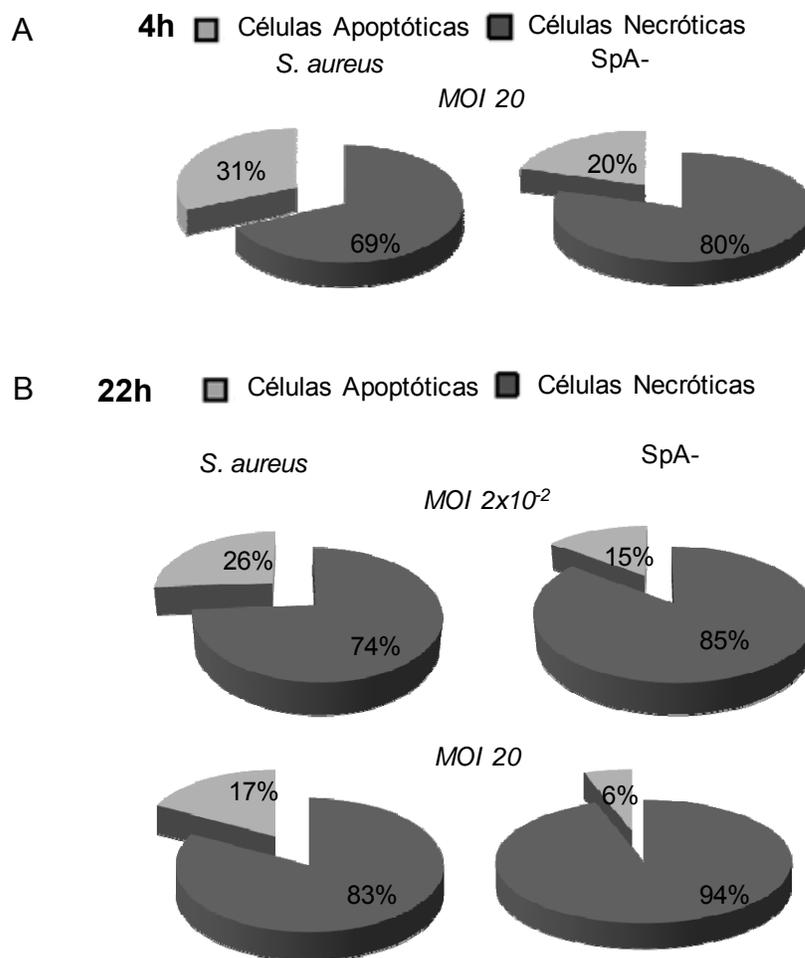
Posteriormente se evaluó el patrón de distribución del tipo de mortalidad inducido por la mutante que carece de la expresión de SpA. A las 4 horas post-estimulación se observó un cambio significativo en la proporción de neutrófilos apoptóticos/necróticos con respecto al patrón observado en células incubadas en medio (Figura 29A) con predominio de necrosis en forma similar a lo observado con la cepa salvaje (Figura 28A). A las 22 horas post-estimulación no se observaron cambios significativos en el tipo de mortalidad de los neutrófilos estimulados con MOI baja ( $2 \times 10^{-5}$ ) (Figura 29B). Sin embargo, se observó a partir de MOI= $2 \times 10^{-2}$  y en forma dosis dependiente un cambio significativo en la proporción de células apoptóticas/necróticas con respecto al control (células en presencia de medio) (Figura 29B) con un predominio de necrosis en forma similar a lo observado para *S. aureus* (Figura 28B). Estos resultados indican el cambio de patrón en el tipo de mortalidad de los neutrófilos inducido por *S. aureus* no sería dependiente únicamente de la expresión de SpA-.



**Figura 29. Modulación del tipo de mortalidad de los neutrófilos en respuesta al estímulo con SpA-.** Análisis de la frecuencia de neutrófilos apoptóticos y necróticos luego de 4 horas de estimulación (A) (n=4) o 22 horas de estimulación (B) (MOI  $2 \times 10^{-5}$ , n=4), (MOI  $2 \times 10^{-2}$ , n=4) y (MOI 20, n=17). Prueba de Chi-cuadrado cuadrado realizada para las frecuencias obtenidas para cada dador individual entre Medio y SpA- (\*\*:  $p < 0.01$  para MOI  $2 \times 10^{-2}$  y MOI 20).

Finalmente, a fin de establecer si SpA podría contribuir en la modulación del cambio de patrón de mortalidad de neutrófilos estimulados con *S. aureus*, se comparó la distribución de células apoptóticas/necróticas luego del estímulo con la cepa salvaje o con la mutante isogénica SpA-. A las 4 horas post-estimulación se observaron diferencias significativas en el porcentaje de neutrófilos

apoptóticos/necróticos inducidos por cada cepa (Figura 30A), observándose mayor proporción de neutrófilos necróticos en ausencia de SpA. Resultados similares se observaron a las 22 horas luego de la estimulación donde la ausencia de SpA indujo un incremento de la población necrótica de neutrófilos con respecto a los presentes en respuesta a *S. aureus* (Figura 30B).



**Figura 30. Modulación del tipo de mortalidad de los neutrófilos en respuesta al estímulo con *S. aureus* y la mutante SpA-.** Análisis de la frecuencia de neutrófilos apoptóticos y necróticos luego de 4 horas de estimulación (A) (n=4) o 22 horas de estimulación (B) (MOI  $2 \times 10^{-2}$ , n=4) y (MOI 20, n=17). Prueba de Chi-cuadrado cuadrado realizada para las frecuencias obtenidas para cada dador individual entre *S. aureus* y SpA- (\*\*:  $p < 0.01$ , para MOI  $2 \times 10^{-2}$  y MOI 20).

### 3.4.3. Conclusiones parciales:

- i. *S. aureus* indujo la producción de señales pro-inflamatorias en los neutrófilos por períodos prolongados de tiempo. La expresión de SpA no resultó indispensable para la producción sostenida de IL-8 por los neutrófilos, siendo su rol en la producción sostenida de TNF- $\alpha$  más controversial.

- ii. La producción endógena de IP-10 por los neutrófilos es dependiente del dador y determina la capacidad de *S. aureus* de modular la producción de dicha quimioquina a largo plazo.
- iii. *S. aureus* indujo un aumento en la mortalidad de los neutrófilos, proceso en el cual la necrosis fue predominante.
- iv. Los experimentos realizados con la mutante SpA- permitieron demostrar que la expresión de SpA previene parcialmente la necrosis masiva de los neutrófilos.
- v. La expresión de SpA no sólo aumenta la viabilidad de los neutrófilos sino que modula el tipo de muerte que experimentan los mismos favoreciendo la apoptosis.

# ***DISCUSSION***

En el pasado, los neutrófilos han sido considerados tan sólo como células fagocíticas efectoras, terminalmente diferenciadas y con bajo nivel de síntesis proteica. Esta visión ha cambiado en base a numerosos trabajos en los que se demuestra la capacidad de los neutrófilos de sintetizar y liberar numerosas citoquinas y quimioquinas en respuesta a diferentes agonistas (Cassatella *et al.*, 1999 y Tecchio *et al.*, 2014). Estudios recientes demostraron, no sólo que los neutrófilos poseen una alta capacidad transcripcional, sino que además son capaces de inducir la síntesis *de novo* de microRNAs como miR-9 (Bazzoni *et al.*, 2009) y miR-223 (Dorhoi *et al.*, 2013) los cuales forman parte del complejo circuito regulatorio de la expresión génica. Por lo tanto, se ha ampliado el rol de los mismos al de células inmunomoduladoras capaces de regular tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa a través de la interacción coordinada con otras células inmunes y mediante la secreción de un patrón definido de citoquinas y quimioquinas (Mantovani *et al.*, 2011). A pesar que la cantidad de proteína sintetizada por los neutrófilos a nivel de célula individual es considerablemente menor a la producida por otros tipos celulares como los macrófagos, los neutrófilos podrían contribuir significativamente a la producción global de citoquinas y quimioquinas *in vivo* como resultado de la gran cantidad de células que se acumulan en el foco de infección (Tecchio *et al.*, 2014). A partir de esta nueva visión acerca del rol de los neutrófilos en la inmunidad innata y adaptativa surge la necesidad de comprender cuáles son los estímulos que conducen a la producción de citoquinas y quimioquinas por parte de los mismos. En este sentido, los resultados obtenidos en el presente trabajo, demuestran la capacidad de *S. aureus* y de la proteína A de regular la activación y el subsecuente patrón de expresión y secreción de citoquinas y quimioquinas por los neutrófilos así como de modular la sobrevivencia y el tipo de muerte que los mismos sufren frente al encuentro con dicha bacteria.

Ha sido demostrado que los neutrófilos activados son capaces de producir citoquinas y quimioquinas en respuesta a diversas especies bacterianas como *Streptococcus pneumoniae* y *Mycobacterium tuberculosis* entre otras (Cassatella *et al.*, 1999; Scapini *et al.*, 2000 y Tecchio *et al.*, 2014). En el caso de *S. aureus*, paralelamente al desarrollo de nuestro trabajo, se ha descrito la capacidad de determinados factores de virulencia de dicha bacteria de inducir la producción de citoquinas y quimioquinas. Las leucocidinas PVL y LukAB (o LukGH) son capaces de inducir citoquinas y quimioquinas en neutrófilos *in vitro* (Ma *et al.*, 2012; Graves *et al.*, 2012 y Yanai *et al.*, 2014). La toxina recombinante PVL induce la liberación de IL-8, IL-6 y TNF- $\alpha$  en forma dependiente de NF- $\kappa$ B así como también promueve la exocitosis de los gránulos de los neutrófilos (Graves *et al.*, 2012 y Ma *et al.*, 2012). LukAB (o LukGH) induce la producción de IL-8 en neutrófilos de manera dependiente de NF- $\kappa$ B y la magnitud de la respuesta es aún mayor que la inducida por PVL (Yanai *et al.*, 2014). Asimismo se ha demostrado que tanto PVL, LukAB (o LukGH) como las leucocidinas HlgA y HlgB y las modulinas solubles en fenol de *S. aureus* son reconocidos por los receptores TLR, NOD2 o el inflammasoma NLRP3 durante la estimulación de sangre humana influenciando el perfil de

la citoquinas/quimioquinas producidas por las células inmunes a tiempos cortos luego de la estimulación (Diep *et al.*, 2006; Shimada *et al.*, 2010; Watkins *et al.*, 2011 y Nygaard *et al.*, 2013). La capacidad de *S. aureus* de contribuir a la producción de citoquinas/quimioquinas por los neutrófilos ha sido evidenciada además en modelos murinos de infección. Se ha observado la producción MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, GRO- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IP-10 en modelos experimentales de absceso cerebral (Kielian *et al.*, 2007) o sepsis por *S. aureus* (Tsuda *et al.*, 2004). Asimismo, en modelos de peritonitis (Watkins *et al.*, 2011) y de infección invasiva de piel (Watkins *et al.*, 2013) por *S. aureus* se ha identificado a los neutrófilos como la principal fuente de IFN- $\gamma$ .

Es necesario considerar que los neutrófilos humanos y murinos difieren en la expresión de diferentes TLRs y en las vías de señalización utilizadas por dichos receptores, lo cual es una limitación importante al momento de trasladar la información obtenida de modelos animales al entendimiento de las infecciones estafilocócicas en humanos (Tamassia *et al.*, 2007 y Thomas *et al.*, 2013). En este sentido, es importante destacar que nuestros estudios fueron realizados con células humanas y mediante este abordaje experimental se demostró la capacidad de *S. aureus* de inducir la expresión y producción temprana de TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-1 $\beta$  y MIP-1 $\alpha$  en neutrófilos. Asimismo se demostró que *S. aureus* no induce la expresión de MCP-1, IFN- $\beta$  ni IP-10 a tiempos cortos luego de la estimulación *in vitro*.

Al considerar las vías de señalización que podrían estar involucradas en la producción de citoquinas y quimioquinas, en este trabajo se demostró que *S. aureus* induce la vía de señalización de MAPKs, entre ellas p38 y erk1/2 en neutrófilos. La activación temprana de p38 resultó dependiente de la expresión de proteína A en la superficie bacteriana. Cuando se evaluó rol de la activación de dichas quinasas en la producción de citoquinas inducida por la proteína A, se demostró que la producción de IL-8 y TNF- $\alpha$  resultó dependiente de la activación de ambas MAPKs. En el caso de *S. aureus*, el bloqueo de erk1/2 y p38 impidió la producción de TNF- $\alpha$  mientras que la producción de IL-8 fue inhibida parcialmente indicando que otras vías de señalización además de las MAPKs podrían estar involucradas.

En forma paralela al desarrollo de nuestros estudios con proteína A, se ha descrito que otras moléculas de *S. aureus* activan MAPKs en neutrófilos, como es el caso del peptidoglicano que induce IL-8 y MIP-1 $\alpha$  en forma dependiente de erk1/2 (Simard *et al.*, 2015), la toxina PVL (Yoong *et al.*, 2012) y el ADN que inducen IL-8 en forma dependiente de p38 (Alvarez *et al.*, 2006). De manera similar a lo observado en respuesta a *S. aureus*, se ha demostrado que otras bacterias son capaces de activar erk1/2 y p38 en neutrófilos. Las fimbrias tipo 1 de *E. coli* activan parcialmente a erk1/2, p38 y NF- $\kappa$ B induciendo la hiperproducción tardía de IL-8 (Sémiramoth *et al.*, 2009). El LPS induce activación de p38 lo cual regula la síntesis de citoquinas y quimioquinas entre ellas TNF- $\alpha$  e IL-8 (Coxon *et al.*, 2003). Asimismo, se ha descrito la capacidad de la flagelina de *Salmonella typhimurium* de activar p38 y erk1/2 (Salamone *et al.*, 2010).

Al evaluar la dependencia, con respecto a la expresión de proteína A, en la producción de citoquinas/quimioquinas se determinó que la producción de IL-8 y la expresión de MIP-1 $\alpha$  por neutrófilos fueron dependientes de la expresión de SpA únicamente en las etapas iniciales luego de la estimulación. Dado que a las 4 horas luego de la estimulación se observa producción de TNF- $\alpha$ , el mismo podría ejercer un rol modulador endócrino en la producción de IL-8 y MIP-1 $\alpha$  inducida por *S. aureus*, lo cual justificaría al menos parcialmente la pérdida de la dependencia de la expresión de SpA. Alternativamente, otra explicación posible sería que la liberación temprana de IL-8 dependiente de SpA se debiese a un aumento en la traducción de los ARNm pre-existentes en pools intracelulares (Scapini *et al.*, 2000 y Mantovani *et al.*, 2011). Otro aspecto a considerar sería la cinética diferencial en la inducción de IL-8 de otras moléculas de *S. aureus* como ácidos teicóicos, peptidoglicano, lipoproteínas y leucocidinas las cuales podrían tener un rol preponderante a tiempos más largos luego de la estimulación (Rigby *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2012; Graves *et al.*, 2012 y Yanai *et al.*, 2014).

Un hallazgo interesante es que a pesar que *S. aureus* no indujo la expresión de MCP-1, la proteína A en su forma recombinante purificada indujo la expresión de MCP-1 a las 4 horas post-estimulación. Se han descrito anteriormente controversias al respecto de los estímulos capaces de inducir la expresión y producción de MCP-1 por neutrófilos humanos. Los estudios originales llevados a cabo por Strieter y colaboradores y Van Damme y colaboradores indicaron que los neutrófilos humanos no eran capaces de producir la liberación de MCP-1 en respuesta a LPS u otros agonistas como IL-1 $\beta$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF, aun cuando los neutrófilos fueron estimulados por 48 horas (Strieter *et al.*, 1990 y Van Damme *et al.*, 1994). Sin embargo posteriormente otros autores demostraron que los neutrófilos humanos fueron capaces de incrementar la expresión del ARNm luego de 24 horas y producir la liberación a partir de las 48 horas de grandes cantidades de MCP-1, en respuesta al ácido lipoteicóico y Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (agonistas de TLR2) y en respuesta al LPS (agonista de TLR4) pero únicamente en presencia de IFN- $\gamma$  (Yoshimura *et al.*, 2007). Asimismo, se observó que la presencia de TNF- $\alpha$  actúa de forma sinérgica con IFN- $\gamma$  en la producción a largo plazo de MCP-1 (Yoshimura *et al.*, 2007). En contraposición, en los estudios realizados por Hilda y colaboradores, se observó producción de MCP-1 luego de 4 horas en respuesta a LPS y Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (Hilda *et al.*, 2016). Por lo tanto, variables como los tiempos de exposición y el posible sinergismo con otras citoquinas/quimioquinas deben ser consideradas para dilucidar las diferencias entre los resultados obtenidos con moléculas bacterianas u agonistas sintéticos y los obtenidos al utilizar la bacteria completa como estímulo. Asimismo, Bishayi y colaboradores y Fox y colaboradores han demostrado que en macrófagos de ratón y monocitos humanos, la interacción de los ácidos lipoteicóicos de *S. aureus* con TLR2 inhibe la expresión en superficie de CCR2, el receptor de MCP-1, impidiendo la interacción con su ligando y la subsecuente regulación positiva de la

expresión y liberación de MCP-1 (Bishayi *et al.*, 2015 y Fox *et al.*, 2011). Este mecanismo podría explicar la ausencia de producción de MCP-1 en respuesta a *S. aureus* en nuestros estudios.

En el caso de la expresión de IFN- $\beta$ , los resultados obtenidos en este trabajo indican que los neutrófilos expresan bajos niveles de ARNm de IFN- $\beta$  en respuesta a SpA recombinante a diferencia de los hallazgos previos de nuestro grupo de investigación en otros tipos celulares como células epiteliales y macrófagos (Martin *et al.*, 2009 y Garofalo *et al.*, 2012). Nuestros resultados en neutrófilos fueron consistentes con la capacidad limitada de los neutrófilos humanos de señalar vía cascadas independientes de MyD88 así como también por TLR3 y TLR7 (Muzio *et al.*, 2000; Tamassia *et al.*, 2007 y Thomas *et al.*, 2013). No obstante, los neutrófilos humanos producen IFN- $\beta$  en respuesta a ácidos nucleicos de diferentes patógenos intracelulares tales como *B. henselae*, *L. monocytogenes*, *L. pneumophila* y adenovirus tipo 5, mediante la activación de diferentes receptores citosólicos (Tamassia *et al.*, 2012 y Tamassia *et al.*, 2013) y de TLR9 (Tecchio *et al.*, 2014). Considerando que nuestros ensayos han sido realizados en ausencia de suero y que en tales condiciones la internalización de la bacteria no fue significativa (resultados no mostrados), mecanismos como el sensado de ácidos nucleicos tanto por TLR9 como a través de receptores citosólicos de ADN (IFI16, MDA5, RIG1, LRRFIP1, DDX41 y STING), mecanismos por los cuales los neutrófilos humanos producen IFN- $\beta$  (Tamassia *et al.*, 2013), podrían verse reducidos. Más aún, se ha demostrado que células dendríticas diferenciadas *in vitro* a partir de monocitos humanos producen bajos niveles de IFN- $\beta$  en presencia de *S. aureus* debido a su capacidad intrínseca de ser resistentes a la degradación en el fagosoma (Kaplan *et al.*, 2012). Es posible que este mecanismo también ocurriese en los neutrófilos humanos, contribuyendo a explicar la ausencia de IFN- $\beta$  en respuesta a *S. aureus*.

Paralelamente, en este trabajo se determinó que los neutrófilos humanos inducen la expresión de IP-10 en respuesta a SpA recombinante, aunque no se observaron diferencias en la secreción de dicha quimioquina a los tiempos estudiados. Llamativamente, en nuestros estudios se observó que los neutrófilos en presencia de medio de cultivo presentan niveles de producción de IP-10 variables tanto a las 4 como a las 22 horas luego de la estimulación, lo cual estaría asociado a diferencias entre dadores. En contraposición con lo observado para otras citoquinas/quimioquinas *S. aureus* indujo una disminución en la producción de IP-10 respecto al basal únicamente en aquéllos dadores que presentaban un basal alto, con lo cual las variaciones intrínsecas de cada dador podrían afectar la capacidad de los neutrófilos de responder a *S. aureus* en el ambiente pro-inflamatorio descrito en nuestro modelo. Al respecto, se han descrito al menos dos mecanismos que promueven la inhibición de la secreción de IP-10. En primer lugar, se ha identificado al factor soluble denominado progranulina, el cual es expresado abundantemente por diferentes tipos celulares, entre ellos las células inmunes (Liu *et al.*, 2012) y es capaz de interactuar con TNFR1 conduciendo a la inhibición de la expresión y secreción de IP-10 (Mundra *et al.*, 2016). Asimismo, se ha demostrado

que la interacción de TNF- $\alpha$  con su receptor inhibe la expresión de CXCR3, el receptor de IP-10, modulando la secreción de IP-10 (Zhang *et al.*, 2010 y Liu *et al.*, 2011). Otro mecanismo de regulación posible descrito involucra la presencia de estímulos combinados de IFN- $\gamma$  con TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , LPS o IFN- $\beta$  (Cassatella *et al.*, 1999; Scapini *et al.*, 2000; Tamassia *et al.*, 2007 y Tecchio *et al.*, 2014). Dado que en nuestros estudios no se evaluó la expresión y producción de IFN- $\gamma$  es posible que la ausencia de secreción de IP-10 observada a tiempos cortos tanto en respuesta a SpA recombinante como a *S. aureus* pueda deberse al menos parcialmente a la falta de sinergismo con otras citoquinas/quimioquinas por ausencia de las mismas. Dado que *S. aureus* es considerado principalmente un patógeno extracelular y como se mencionó anteriormente, en las condiciones en las que fueron realizados los ensayos la internalización de la bacteria no fue significativa, es posible que los mecanismos de sensado de ADN mediante receptores citosólicos (Tamassia *et al.*, 2012), mecanismo por el cual los neutrófilos humanos producen IP-10, no puedan ser correctamente activados.

En forma similar a la controversia observada respecto de la expresión de MCP-1, se observó un aumento de la expresión de IP-10, aunque no se reflejó en un aumento en la secreción de dicha quimioquina, en neutrófilos en respuesta al estímulo con SpA recombinante a diferencia de lo observado con bacteria completa. La expresión de IP-10 resultó independiente de la vía de señalización de IFN- $\beta$ , lo cual podría explicarse por la existencia de vías dependientes de TNF- $\alpha$  que conducen a la expresión de IP-10 (Liu *et al.*, 2011). Asimismo, no se observó participación de la región polimórfica Xr de la proteína lo cual difirió con lo observado previamente por nuestro grupo de investigación en macrófagos y en células epiteliales ya que en estos tipos celulares la región polimórfica Xr induce la expresión de IP-10 y la misma es dependiente de la vía de señalización de IFN- $\beta$  (Garofalo *et al.*, 2012). Las discrepancias observadas pueden deberse a que en los neutrófilos humanos la cascada de IFN- $\beta$  no es preponderante limitando la capacidad estimuladora del Xr en este tipo celular. Cabe destacar que entre sus múltiples funciones, IP-10 posee una fuerte actividad antimicrobiana, tanto de patógenos gram negativos como gram positivos y en particular sobre *S. aureus* (Cole *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003 y Holdren *et al.*, 2014). La concentración a la cual resulta inhibitoria (10  $\mu\text{g/ml}$ ) sería relevante en el contexto *in vivo* dada la cantidad de células productoras de IP-10 en los microambientes pro-inflamatorios (Yang *et al.*, 2003 y Holdren *et al.*, 2014). Por lo tanto, las discrepancias entre la inducción de IP-10 por SpA y la ausencia de inducción por *S. aureus* ameritan estudios futuros.

*S. aureus* indujo la producción de IL-1 $\beta$  a partir de las 4 horas luego de la estimulación, lo cual difirió con observaciones previas en monocitos en los cuales *S. aureus* indujo la producción de IL-1 $\beta$  a partir de las 2 horas luego de la estimulación (Giai *et al.*, 2016). La producción de IL-1 $\beta$  no fue dependiente de la expresión de SpA, al igual que lo observado en monocitos (Giai *et al.*, 2016). Las diferencias observadas en la cinética de producción de IL-1 $\beta$  entre ambos tipos celulares podría

deberse a la capacidad diferencial de dichos tipos celulares de regular la biodisponibilidad de IL- $\beta$  a través del clivaje temprano del receptor IL-1RII en respuesta al estímulo con *S. aureus* (Giai *et al.*, 2016).

Nuestros resultados indican que la presencia de *S. aureus* promueve la producción de elevados niveles de IL-8 y TNF- $\alpha$  en neutrófilos durante al menos 22 horas luego de la estimulación. Estos hallazgos son coincidentes con los obtenidos recientemente por otros investigadores quienes observaron producción de IL-8 en neutrófilos humanos en respuesta a la cepa USA300 de *S. aureus* a las 18 horas luego de la estimulación (Zurek *et al.*, 2015). Los niveles de IL-8 detectados en nuestro trabajo (9000 pg/ml) resultaron superiores a los obtenidos por Zurek y colaboradores (2500 pg/ml) lo cual podría deberse a las condiciones experimentales ensayadas, en particular la MOI, la cual fue mayor en nuestro caso (Zurek *et al.*, 2015). La producción sostenida de IL-8 y TNF- $\alpha$  en nuestro modelo podría estar influenciada por la contribución de otras moléculas de *S. aureus* como las leucocidinas HlgA, HlgB, PVL, LukAB (o LukGH) y las modulinas solubles en fenol de *S. aureus* las cuales inducen dichas citoquinas/quimioquinas de manera temprana lo cual podría contribuir a la acumulación en el medio extracelular y la activación de mecanismos autócrinos/parácrinos (Diep *et al.*, 2006; Shimada *et al.*, 2010; Watkins *et al.*, 2011 y Nygaard *et al.*, 2013).

La producción de TNF- $\alpha$  en respuesta al estímulo prolongado con *S. aureus* en nuestros estudios fue menor (1800 pg/ml a MOI  $2 \times 10^{-1}$  luego de 22 horas de estimulación) a lo observado por otros investigadores (10 ng/ml a MOI 10 luego de 12 horas en cultivo) (Ocaña *et al.*, 2008) probablemente porque en dichos ensayos se utilizó bacteria opsonizada lo cual podría favorecer el reconocimiento por receptores citosólicos y la inducción de mecanismos dependientes de la fagocitosis (Ocaña *et al.*, 2008).

Dado el perfil pro-inflamatorio que la estimulación con *S. aureus* indujo en neutrófilos, se evaluó su capacidad de modular la sobrevivencia de los mismos. Los estudios realizados permitieron evidenciar que luego de 4 horas de estimulación *S. aureus* no indujo cambios significativos en los niveles basales de células viables, apoptóticas y necróticas. Por el contrario la mutante SpA- indujo un aumento en la mortalidad de los neutrófilos indicando que la expresión de SpA modula la viabilidad de neutrófilos expuestos a *S. aureus* en forma temprana. Luego de 22 horas de cultivo *in vitro* se observó, aún en ausencia de exposición a la bacteria, una reducción significativa de la viabilidad de los neutrófilos, con similares porcentajes de neutrófilos apoptóticos y necróticos. Estos resultados son consistentes con los mecanismos fisiológicos de muerte asociados al mantenimiento de la homeostasia y con la ausencia de remoción de los neutrófilos apoptóticos que conducen a una eventual necrosis secundaria (Kennedy *et al.*, 2009; Bratton *et al.*, 2011 y Kolaczowska *et al.*, 2013). La exposición prolongada de los neutrófilos a *S. aureus* no sólo aumentó los niveles de mortalidad sino que indujo cambios en la proporción de neutrófilos apoptóticos/necróticos con un incremento de la proporción de necrosis. En este contexto, la utilización de una mutante deficiente

en proteína A permitió determinar que SpA participa en la inhibición de la necrosis masiva de los neutrófilos favoreciendo la apoptosis. El rol de SpA en la disminución de la necrosis inducida por *S. aureus* podría deberse a la acción de la proteína, tanto presente en la pared celular como soluble en el medio extracelular (Becker *et al.*, 2014) sobre receptores de los neutrófilos, en particular el TNFR1 (Gómez *et al.*, 2004 y Giai *et al.*, 2016). En este sentido, estudios futuros permitirán elucidar el rol de dicho receptor en la inducción de las cascadas de señalización que modulan la mortalidad en neutrófilos.

Un aspecto importante a considerar es asimismo, el rol que las citoquinas y quimioquinas producidas en respuesta a *S. aureus* pudieran tener en la modulación de la sobrevivencia y del tipo de muerte de los neutrófilos. En estudios realizados en neutrófilos estimulados con PVL, se ha demostrado que dosis elevadas de la toxina (100 nM) indujeron la producción de IL-8 (35 ng/ml) y necrosis de neutrófilos a las 5 horas luego de la estimulación. Por el contrario, bajas dosis de PVL (5 nM) indujeron menores niveles de IL-8 (15 ng/ml) y apoptosis (Ma *et al.*, 2012). Nuestros resultados mostraron que el estímulo por 4 horas con *S. aureus* indujo cantidades aun menores de IL-8 (3,6 ng/ml) y no se modificaron los porcentajes de neutrófilos apoptóticos y necróticos respecto del control con lo cual es posible que no se haya alcanzado el umbral para modular la mortalidad.

El estímulo con proteína A recombinante o con *S. aureus* durante 4 horas indujo niveles de TNF- $\alpha$  que se encontraron entre los 0.15-0.5 ng/ml. Esto se acompañó de niveles de apoptosis que no difirieron de los observado en ausencia de estímulo lo cual concuerda con resultados de otros investigadores que demostraron que bajas concentraciones de TNF- $\alpha$  (0.1-1ng/ml) demoran la apoptosis de los neutrófilos e inducen la producción de citoquinas pro-inflamatorias, mientras que altas concentraciones (10-100 ng/ml) inician la apoptosis (Van den Berg *et al.*, 2001).

Es importante además considerar que, en los neutrófilos el TNF- $\alpha$  puede desempeñar un rol dual en cuanto a la modulación de la muerte dado que puede activar la vía extrínseca de la apoptosis o inducir necroptosis. La capacidad de direccionar la vía de muerte que se induce depende de la actividad de la caspasa-8, ya que si se activa induce apoptosis y es capaz de inhibir la vía de señalización de la necroptosis (Weng *et al.*, 2014 y Vanden Berghe *et al.*, 2015). Al respecto se ha demostrado que *S. aureus* es capaz de inducir necroptosis en neutrófilos humanos (Greenlee-Wacker *et al.*, 2014) así como también necrosis secundaria (Kobayashi *et al.*, 2010) y apoptosis (Ocaña *et al.*, 2008). En nuestros estudios observamos que *S. aureus* a tiempos prolongados indujo cambios en la proporción apoptosis/necrosis, con predominio de necrosis. No obstante, al comparar dicha respuesta con la inducida por la mutante SpA- se determinó que la expresión de SpA es crítica para inhibir la necrosis masiva de los neutrófilos mediante la modulación del tipo de muerte que sufren los neutrófilos hacia un perfil con mayor apoptosis que el que se observa en ausencia de SpA. Por lo tanto, es posible hipotetizar que SpA podría modular la cascada de señalización que determinará el tipo muerte de los neutrófilos.

Al analizar si el patrón de mortalidad luego de 22 horas de estimulación era dependiente de la MOI, se observó un efecto de dosis respuesta entre MOI ( $2 \times 10^{-2}$  – 20) con predominio de necrosis. Este mismo efecto de dosis dependencia se observó en respuesta a la mutante SpA-, aunque dicha mutante resultó ser más agresiva induciendo una necrosis aun mayor que la cepa parental. Al evaluar MOI menores ( $2 \times 10^{-5}$ ) no se observaron diferencias respecto de los neutrófilos incubados en medio. Nuestros resultados difieren de los obtenidos por Ocaña y colaboradores, en los cuales se observa que a MOI 1 se demora la apoptosis de los neutrófilos y a MOI 100 se incrementa la tasa de apoptosis por mecanismos dependientes de citoquinas. A MOI 10 no se observaron modificaciones en la tasa de apoptosis luego de 12 horas en cultivo (Ocaña *et al.*, 2008). Otros autores han demostrado que a MOI 10 *S. aureus* induce una rápida lisis de los neutrófilos debido a la activación del mecanismo de necroptosis (los neutrófilos cargados con *S. aureus* viables modulan positivamente el factor de supervivencia PCNA que conduce a la falla en la activación de las caspasas 2, 3, 8 y 9), no así a baja MOI 1 donde se requiere de inhibidores de caspasas para desencadenar el mecanismo de muerte (Greenlee-Wacker *et al.*, 2014). Las diferencias entre los resultados obtenidos por el grupo de Ocaña y colaboradores, el de Greenlee-Wacker y colaboradores y nuestros resultados respecto del efecto de la MOI en la modulación del tipo de muerte que sufren los neutrófilos posiblemente se deban a las características particulares de cada sistema experimental, en especial la presencia de suero, las cuales pueden afectar la interacción de los neutrófilos con *S. aureus*.

Otro aspecto a considerar de nuestro diseño experimental es la contribución que pudiera tener la acumulación de leucocidinas en el medio extracelular en la necrosis masiva observada en respuesta a *S. aureus* y en respuesta a la mutante que carece de la expresión de SpA. La cepa Newman utilizada en este trabajo comparte con la cepa USA300 la producción de las leucocidinas PVL, LukAB (o LukGH) y PSM- $\alpha$  las cuales se sabe juegan un rol clave en la destrucción de los neutrófilos (Wang *et al.*, 2007; Geiger *et al.*, 2012; DuMont *et al.*, 2013; Surewaard *et al.*, 2013; Grosz *et al.*, 2014 y Greenlee-Wacker *et al.*, 2015). Recientemente se ha demostrado el potencial citotóxico de LukAB (o LukGH) sobre los neutrófilos tanto con cepas meticilino-sensibles como meticilino-resistentes. La cantidad de leucocidina LukAB (o LukGH) producida por *S. aureus* a baja MOI (1-10) no induce lisis, pero cuando se utiliza una MOI de 50-100 se acumula suficiente cantidad de LukAB (o LukGH) la cual es capaz de incrementar la lisis de los neutrófilos (DuMont *et al.*, 2011). En estudios llevados a cabo *in vitro* se demostró que la leucocidina PVL recombinante, induce apoptosis afectando la mitocondria a bajas concentraciones, por un mecanismo que no requiere invasión (se une al receptor en membrana y se forma el poro y otras moléculas de PLV ingresan a los neutrófilos y actúan sobre la mitocondria) y altas concentraciones de PVL ocurre necrosis por absorción inespecífica sobre la bicapa lipídica formando grandes poros en los neutrófilos humanos (Genestier *et al.*, 2005 y Ma *et al.*, 2012). Neutrófilos estimulados con sobrenadantes provenientes

de cepas que carecen de PVL como de LukAB (o LukGH) o de la doble mutante, resultaron menos susceptibles a la lisis, indicando que ambas leucocidinas son importantes para la lisis de los neutrófilos luego de 8 horas (DuMont *et al.*, 2013). Por lo tanto en nuestras condiciones experimentales si bien no podemos asegurar que ambas leucocidinas estuvieran induciendo la lisis de los neutrófilos, es posible que durante las 22 horas de incubación se alcance una concentración de dichas leucocidinas lo suficientemente alta como para inducir la lisis. Asimismo, la lisis observada en nuestros estudios podría ser atribuida parcialmente a las modulinas solubles en fenol considerando que nuestros ensayos se realizaron en ausencia de suero (Surewaard *et al.*, 2013).

Una consideración relevante a tener en cuenta al interpretar nuestros resultados es que las determinaciones fueron realizadas en presencia de albúmina sérica humana y en ausencia de suero. Asimismo, los ensayos fueron llevados a cabo con los neutrófilos en suspensión. Al respecto, diversos trabajos han demostrado que los neutrófilos humanos son susceptibles a morir por diferentes mecanismos en respuesta a *S. aureus* (Greenlee-Wacker *et al.*, 2015). Resulta necesario, al momento de evaluar los resultados, tener en cuenta las diferencias en el diseño experimental. Se ha descrito que *S. aureus* cepa ATCC 29213 induce muerte por apoptosis a las 12 horas luego de una estimulación de 30 minutos en ensayos utilizando bacteria opsonizada (Ocaña *et al.*, 2008). En ensayos realizados con *S. aureus* USA300 LAC opsonizado enfrentado a neutrófilos adheridos y sincronizados para la fagocitosis se observó apoptosis seguida de una rápida lisis a las 6 horas (Kobayashi *et al.*, 2010) la cual se sugiere que ocurría por necroptosis (Greenlee-Wacker *et al.*, 2014 y Zurek *et al.*, 2015). Cabe recalcar que en los trabajos realizados en neutrófilos humanos por Kobayashi y colaboradores y Greenlee-Wacker y colaboradores, no se ha dilucidado aun un factor de virulencia de *S. aureus* responsable de la muerte celular (Kobayashi *et al.*, 2010 y Greenlee-Wacker *et al.*, 2014). Otro estudio demostró la muerte acelerada de los neutrófilos (5-60 minutos) por netosis vital y sugiere a la leucocidina PVL de *S. aureus* ATCC 25923 como la responsable de desencadenar a baja concentración y en ausencia de suero este mecanismo (Pilszczek *et al.*, 2010). Por lo tanto la ausencia de suero así como la utilización de la cepa Newman deben tenerse en cuenta al considerar la modulación del cambio de patrón de mortalidad de los neutrófilos estimulados con *S. aureus* y la mutante SpA- a tiempos prolongados observada en nuestro trabajo.

La interacción entre los factores de virulencia y las proteínas de la célula hospedadora es crucial para el éxito de la infección bacteriana y *S. aureus* no representa una excepción. A fin de sobrevivir en el ambiente hostil del hospedador *S. aureus* ha desarrollado variados mecanismos de evasión que involucran, entre otros, la capacidad de inducir la muerte de células inmunes críticas para su erradicación por diferentes mecanismos tales como apoptosis, piroptosis, necroptosis y netosis (Wesson *et al.*, 2000; Kahl *et al.*, 2000; Menzies *et al.*, 2000; Pilszczek *et al.*, 2010; Soong *et al.*, 2012; Korea *et al.*, 2014; Greenlee-Wacker *et al.*, 2014; Kitur *et al.*, 2015 y Zurek *et al.*, 2015). Se ha demostrado que el tipo de mecanismos de muerte inducido por *S. aureus* depende del tipo

celular involucrado, así como también del modelo de infección utilizado. Considerando que nuestros estudios fueron llevados a cabo en ausencia de suero, nuestros hallazgos representan mecanismos que podrían tener lugar en nichos del hospedador donde la presencia de inmunoglobulinas es escasa en condiciones basales como la piel o el pulmón.

Recientemente se ha revisado la patogénesis asociada a la formación de abscesos de piel generados durante la infección por *S. aureus* enfatizándose el rol preponderante de los neutrófilos en la contención y erradicación del patógeno (Kobayashi *et al.*, 2015). En este sentido, estudios realizados en nuestro laboratorio utilizando un modelo murino de infección cutánea han permitido corroborar que los fenómenos observados *in vitro* en este trabajo tendrían lugar durante la infección de piel por *S. aureus* (Gonzalez, manuscrito en preparación, Tesis doctoral 2016). La expresión de SpA no sólo sería crítica para generar el microambiente pro-inflamatorio necesario sino que influenciaría la viabilidad de los neutrófilos *in vivo* con consecuencias en la formación del absceso que permita controlar la infección.

La patogénesis de la infección pulmonar por *S. aureus* se debe mayoritariamente a la respuesta inflamatoria que este patógeno genera. En este sentido, el arribo masivo de los neutrófilos es importante para erradicar la bacteria pero resulta deletéreo para la función pulmonar. Nuestros resultados indican que *S. aureus* promueve el sostenimiento de la producción de citoquinas y quimioquinas por los neutrófilos y contribuye a prolongar su vida media, lo cual podría contribuir significativamente a la respuesta inflamatoria característica de la infección pulmonar por dicho microorganismo. Este mecanismo, se sumaría a los ya descritos para la patogenia de la neumonía por *S. aureus* (Gómez *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2009; Parker *et al.*, 2012; Inoshima *et al.*, 2011; DuMont *et al.*, 2013; Chatterjee *et al.*, 2013 y Kitur *et al.*, 2015).

El presente trabajo de investigación aporta nuevos conocimientos para el entendimiento de la interacción de *S. aureus* con el hospedador y específicamente para el esclarecimiento del rol de la proteína A, una proteína de superficie altamente conservada en *S. aureus*, en la inducción de citoquinas y quimioquinas en neutrófilos humanos. La proteína A indujo la producción temprana de citoquinas y quimioquinas contribuyendo a la generación de un microambiente pro-inflamatorio. Más aún el estímulo con *S. aureus* indujo la producción sostenida de IL-8 y TNF- $\alpha$  y elevados niveles de mortalidad lo cual coincidió con lo reportado, en forma paralela a nuestros estudios, por otros investigadores. Más aún, nuestro trabajo permitió elucidar que la expresión de la proteína A en la superficie bacteriana es crítica para disminuir la necrosis de los neutrófilos favoreciendo la muerte por apoptosis. En consecuencia, la bacteria podría ejercer su mecanismo de evasión tendiente a destruir las células fagocíticas, evitando la inflamación exacerbada que caracteriza la muerte por necrosis. Por lo tanto, la proteína A desempeñaría un rol pro-inflamatorio en los estadios iniciales del encuentro con el hospedador y anti-inflamatorio a tiempos posteriores lo cual le permitiría a la bacteria evadir parcialmente las consecuencias de la inflamación generada por la necrosis de los

neutrófilos. Estos resultados junto con hallazgos previos de nuestro grupo de investigación (Giai *et al.*, 2013 y Giai *et al.*, 2016) permiten destacar que un determinado factor de virulencia puede poseer propiedades pro-inflamatorias y simultáneamente funciones anti-inflamatorias que contribuyan a una eficiente evasión de la respuesta inmune.

# ***CONCLUSIONES***

## 5.1 CONCLUSIONES

1. La proteína A de *S. aureus* contribuye a la activación de neutrófilos promoviendo la generación de una respuesta inflamatoria mediante la inducción de IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, IP-10 y GRO- $\alpha$ .
2. La interacción temprana de *S. aureus* con los neutrófilos promueve la expresión de mediadores inflamatorios tales como: IL-8, MIP-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . La producción temprana de IL-8 y MIP-1 $\alpha$  inducida por *S. aureus* resultó dependiente de la expresión de la proteína A en la superficie bacteriana.
3. La proteína A contribuye a la activación de las MAPKs erk1/2 y p38 inducida por *S. aureus* en neutrófilos. Asimismo, la activación de dichas MAPKs por *S. aureus* contribuyó a la producción de temprana de IL-8 y TNF- $\alpha$ .
4. El estímulo generado por *S. aureus* promueve la producción de citoquinas inflamatorias y quimioquinas como TNF- $\alpha$  e IL-8 en los neutrófilos por períodos prolongados de tiempo.
5. La exposición prolongada de los neutrófilos a *S. aureus* indujo un aumento en los niveles de mortalidad y cambios en la proporción de neutrófilos apoptóticos/necróticos con un incremento de la proporción de necrosis. No obstante, la expresión de SpA resultó crítica para prevenir parcialmente la necrosis masiva de los neutrófilos favoreciendo la muerte por apoptosis.

## 5.2. CONCLUSION GENERAL

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, demuestran la capacidad de *S. aureus* y de la proteína A de regular la activación y el subsecuente patrón de expresión y secreción de citoquinas y quimioquinas por los neutrófilos así como de modular la sobrevivencia y el tipo de muerte que sufren frente al encuentro con esta bacteria. Nuestros hallazgos sugieren que la proteína A de *S. aureus* contribuiría a la inducción de un microambiente pro-inflamatorio durante el encuentro inicial con los neutrófilos incrementando la sobrevivencia de los mismos. En estadios posteriores, la expresión de proteína A contribuiría a prevenir la necrosis masiva y disminuir los efectos deletéreos que la inflamación generada por la misma pudiera tener sobre la viabilidad bacteriana.

**Lic. Garofalo Ailin**

**Dra. Gómez Marisa**  
**Directora de Tesis**

# ***BIBLIOGRAFIA***

Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, Tessler S, San Pedro G, Wunderink R, Dal Nogare A, Nasraway S, Berman S, Cooney R, Levy H, Baughman R, Rumbak M, Light RB, Poole L, Allred R, Constant J, Pennington J, Porter S. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet*. (1998) 351:929-933.

Ahn DS, Parker D, Planet PJ, Nieto PA, Bueno SM, Prince A. Secretion of IL-16 through TNFR1 and calpain-caspase signaling contributes to MRSA pneumonia. *Mucosal Immunol*. (2014) Nov; 7(6):1366-74. doi: 10.1038/mi.2014.24.

Alonzo F 3rd, Kozhaya L, Rawlings SA, Reyes-Robles T, DuMont AL, Myszka DG, Landau NR, Unutmaz D, and Torres VJ: CCR5 is a receptor for *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED. *Nature* (2013) 493:51-55.

Alonzo F 3rd, Torres VJ. The bicomponent pore-forming leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Mol Biol Rev*. (2014) Jun; 78(2):199-230. doi: 10.1128/MMBR.00055-13. Review.

Alvarez ME, Fuxman Bass JI, Geffner JR, Fernández Calotti PX, Costas M, Coso OA, Gamberale R, Vermeulen ME, Salamone G, Martinez D, Tanos T, Trevani AS. Neutrophil signaling pathways activated by bacterial DNA stimulation. *J Immunol*. (2006) Sep 15; 177(6):4037-46.

Arndt PG, Suzuki N, Avdi NJ, Malcolm KC, Worthen GS. Lipopolysaccharide-induced c-Jun NH2-terminal kinase activation in human neutrophils: role of phosphatidylinositol 3-Kinase and Syk-mediated pathways. *J Biol Chem*. (2004) Mar 19; 279(12):10883-91.

Atkins KL, Burman JD, Chamberlain ES, Cooper JE, Poutrel B, Bagby S, Jenkins AT, Feil EJ, van den Elsen JM. *S. aureus* IgG-binding proteins SpA and Sbi: host specificity and mechanisms of immune complex formation. *Mol Immunol*. (2008) Mar; 45(6):1600-11.

Baum C, Haslinger-Löffler B, Westh H, Boye K, Peters G, Neumann C, Kahl BC. Non-spa-typeable clinical *Staphylococcus aureus* strains are naturally occurring protein A mutants. *J Clin Microbiol*. (2009) Nov; 47(11):3624-9. doi: 10.1128/JCM.00941-09.

Bazzoni, F. *et al*. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. (2009). 106, 5282–5287.

Becker S, Frankel MB, Schneewind O, Missiakas D. Release of protein A from the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2014) Jan 28; 111(4):1574-9. doi: 10.1073/pnas.1317181111.

- Berliner N. Molecular biology of neutrophil differentiation. *Curr Opin Hematol.* (1998) Jan; 5(1):49-53. Review.
- Bishayi B, Bandyopadhyay D, Majhi A, Adhikary R. Effect of exogenous MCP-1 on TLR-2 neutralized murine macrophages and possible mechanisms of CCR-2/TLR-2 and MCP-1 signalling during *Staphylococcus aureus* infection. *Immunobiology.* (2015) Mar; 220(3):350-62. doi: 10.1016/j.imbio.2014.10.013.
- Böyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968; 97:7.
- Bratton DL, Henson PM. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol.* (2011) 32(8):350–357.
- Burman JD, Leung E, Atkins KL, O'Seaghdha MN, Lango L, Bernado P, Bagby S, Svergun DI, Foster TJ, Isenman DE, van den Elsen JM. Interaction of human complement with Sbi, a staphylococcal immunoglobulin-binding protein: indications of a novel mechanism of complement evasion by *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem.* (2008) 283:17579-17593.
- Cassatella MA. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol.* (1999) 73:369–509. doi: 10.1016/S0065-2776(08)60791-9.
- Chatterjee SS, Joo HS, Duong AC, Dieringer TD, Tan VY, Song Y, *et al.* Essential *Staphylococcus aureus* toxin export system. *Nat Med.* (2013) 19(3):364–7. Epub 2013/02/12. doi: [10.1038/nm.3047](https://doi.org/10.1038/nm.3047).
- Cheng AG, Kim HK, Burts ML, Krausz T, Schneewind O, Missiakas DM. Genetic requirements for *Staphylococcus aureus* abscess formation and persistence in host tissues. *FASEB J.* (2009) Oct; 23(10):3393-404. doi: 10.1096/fj.09-135467. Epub 2009 Jun 12. Erratum in: *FASEB J.* 2010 Feb; 24(2):648.
- Cheung GY, Joo HS, Chatterjee SS, Otto M. Phenol-soluble modulins—critical determinants of staphylococcal virulence. *FEMS Microbiol Rev.* (2014) Jul; 38(4):698-719. doi: 10.1111/1574-6976.12057. Epub 2014 Jan 16. Review.
- Claro, T., Widaa, A., O'Seaghdha, M., Miajlovic, H., Foster, T. J., O'Brien, F. J. & Kerrigan, S. W. *Staphylococcus aureus* protein A binds to osteoblasts and triggers signals that weaken bone in osteomyelitis. *PLoS ONE.* (2011) 6, e18748.

Claro T, Widaa A, McDonnell C, Foster TJ, O'Brien FJ, Kerrigan SW. *Staphylococcus aureus* protein A binding to osteoblast tumour necrosis factor receptor 1 results in activation of nuclear factor kappa B and release of interleukin-6 in bone infection. *Microbiology*. (2013) Jan; 159(Pt 1):147-54. doi: 10.1099/mic.0.063016-0.

Classen A, Kalali BN, Schnopp C, Andres C, Aguilar-Pimentel JA, Ring J, Ollert M, Mempel M. TNF receptor I on human keratinocytes is a binding partner for staphylococcal protein A resulting in the activation of NF kappa B, AP-1, and downstream gene transcription. *Exp Dermatol*. (2011) Jan; 20(1):48-52. doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01174.x.

Cole AM, Ganz T, Liese AM, Burdick MD, Liu L, Strieter RM. Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J Immunol*. (2001) Jul 15; 167(2):623-7.

Coxon PY, Rane MJ, Uriarte S, Powell DW, Singh S, Butt W, Chen Q, McLeish KR. MAPK-activated protein kinase-2 participates in p38 MAPK-dependent and ERK-dependent functions in human neutrophils. *Cell Signal*. (2003) Nov; 15(11):993-1001.

Deisenhofer, J. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry*. (1981) 20:2361-70.

Diep B. A., Gill S. R., Chang R. F., Phan T. H., Chen J. H., Davidson M. G., Lin F., Lin J., Carleton H. A., Mongodin E. F., Sensabaugh G. F., Perdreau-Remington F. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. (2006) 367, 731–739.

Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol*. (2002) Sep-Oct; 20(5 Suppl 27):S1-13. Review.

Dorhoi A, Iannaccone M, Farinacci M, Faé KC, Schreiber J, Moura-Alves P, *et al*. MicroRNA-223 controls susceptibility to tuberculosis by regulating lung neutrophil recruitment. *J Clin Invest*. (2013) 123:4836–48. doi:10.1172/JCI67604.

Dumont AL, Nygaard TK, Watkins RL, Smith A, Kozhaya L, Kreiswirth BN, Shopsin B, Unutmaz D, Voyich JM, Torres VJ. Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Mol Microbiol*. (2011) Feb; 79(3):814-25. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07490.x

DuMont AL, Yoong P, Day CJ, Alonzo F, 3rd, McDonald WH, Jennings MP, and Torres VJ: *Staphylococcus aureus* LukAB cytotoxin kills human neutrophils by targeting the CD11b subunit of the integrin Mac-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013), 110:10794-10799.

DuMont AL, Yoong P, Surewaard BG, *et al.* *Staphylococcus aureus* elaborates leukocidin AB to mediate escape from within human neutrophils. *Infect Immun.* (2013) 81:1830–1841.

Falugi, F., Kim, H. K., Missiakas, D. M. & Schneewind, O. The role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus*. *mBio* 4. (2013) e00575–00513.

Fernandez S, de Vedia L, Lopez Furst MJ, Gardella N, Di Gregorio S, Ganaha MC, Prieto S, Carbone E, Lista N, Rotrying F, Stryjewski ME, Mollerach M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmec IVc clone as the major cause of community acquired invasive infections in Argentina. *Infect Genet Evol.* (2013) 14:401-405.

Flack CE, Zurek OW, Meishery DD, *et al.* Differential regulation of staphylococcal virulence by the sensor kinase SaeS in response to neutrophil- derived stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111:E2037–E2045.

Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun.* (2005) Apr; 73(4):1907-16. Review.

Foster TJ, and Hook M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* (1998) 6:484-8.

Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol.* (2005) 3:948-58.

Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol.* (2014) Jan; 12(1):49-62. doi: 10.1038/nrmicro3161. Review. PubMed PMID: 24336184.

Fournier B, Philpott DJ. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev.* (2005) 18(3):521-40.

Fournier, B. The function of TLR2 during staphylococcal diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* (2012) 2(January), 167. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00167>.

Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun.* (2010) 2(3):216-27. doi: 10.1159/000284367.

Fox JM, Letellier E, Oliphant CJ, Signoret N. TLR2-dependent pathway of heterologous down-modulation for the CC chemokine receptors 1, 2, and 5 in human blood monocytes. *Blood*. (2011) Feb 10; 117(6):1851-60. Doi 10.1182/blood-2010-05-287474.

Fraunholz M, Sinha B. Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Front Cell Infect Microbiol*. (2012) Apr 24; 2:43. doi: 10.3389/fcimb.2012.00043.

Fridkin SK, Hageman J, McDougal LK, Mohammed J, Jarvis WR, Perl TM, Tenover FC. Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Epidemiology Study Group... Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United States, 1997-2001. *Clin Infect Dis*. (2003) 36(4):429-39.

Gabelloni ML, Trevani AS, Sabatté J, Geffner J. Mechanisms regulating neutrophil survival and cell death. *Semin Immunopathol*. (2013) Jul; 35(4):423-37.

Garofalo A, Giai C, Lattar S, Gardella N, Mollerach M, Kahl BC, Becker K, Prince AS, Sordelli DO, Gómez MI. The length of the *Staphylococcus aureus* protein A polymorphic region regulates inflammation: impact on acute and chronic infection. *J Infect Dis*. (2012) Jul 1; 206(1):81-90. doi: 10.1093/infdis/jjs311.

Garzoni C, Kelley WL. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol*. (2009) 17:59–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.005>.

Gasperini S, Calzetti F, Russo MP, De Gironcoli M, Cassatella MA. Regulation of GRO $\alpha$  production in human granulocytes. *J Inflamm*. (1995) 45:143–151.

Geiger T, Francois P, Liebeke M, Fraunholz M, Goerke C, Krismer B, Schrenzel J, Lalk M, Wolz C. The stringent response of *Staphylococcus aureus* and its impact on survival after phagocytosis through the induction of intracellular PSMs expression. *PLoS Pathog*. (2012) 8:e1003016. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003016>.

Genestier AL, Michallet MC, Prevost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S, Thivolet F, Etienne J, Lina G, Vallette FM, Vandenesch F, Genestier L. *Staphylococcus aureus* Panton–Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest*. (2005) 115(11):3117–3127.

Giai, C., Gonzalez, C., Ledo, C., Garofalo, A., Di Genaro, M. S., Sordelli, D. O., & Gomez, M. I. Shedding of tumor necrosis factor receptor 1 induced by protein a decreases tumor necrosis factor

alpha availability and inflammation during systemic *Staphylococcus aureus* infection. *Infection and Immunity*. (2013) 81(11), 4200–4207.

Giai C, Gonzalez CD, Sabbione F, Garofalo A, Ojeda D, Sordelli DO, Trevani AS, Gómez MI. *Staphylococcus aureus* Induces Shedding of IL-1RII in Monocytes and Neutrophils. *J Innate Immun*. (2016) 8(3):284-98. doi: 10.1159/000443663.

Gómez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, Cheung A, Prince, A. *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat Med*. (2004) 10:842-8.

Gómez MI, O'Seaghda M, Magargee M, Foster TJ, Prince A. *Staphylococcus aureus* protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains. *J Biol Chem*. (2006) 281:20190-6.

Gómez MI, Seaghda MO, and Prince AS. *Staphylococcus aureus* protein A activates TACE through EGFR-dependent signaling. *EMBO J*. (2007) 26:701–709.

Graille M, Stura EA, Corper AL, Sutton BJ, Taussig MJ, Charbonnier JB, Silverman GJ. Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2000) 97:5399-5404.

Graves SF, Kobayashi SD, Braughton KR, Whitney AR, Sturdevant DE, Rasmussen DL, Kirpotina LN, Quinn MT, DeLeo FR. Sublytic concentrations of *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine leukocidin alter human PMN gene expression and enhance bactericidal capacity. *J Leukoc Biol*. (2012) Aug; 92(2):361-74. doi: 10.1189/jlb.1111575.

Greenlee-Wacker MC, Rigby KM, Kobayashi SD, *et al*. Phagocytosis of & *Staphylococcus aureus* by human neutrophils prevents macrophage effer- ocytosis and induces programmed necrosis. *J Immunol*. (2014) 192:4709– 4717.

Greenlee-Wacker M, DeLeo FR, Nauseef WM. How methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* evade neutrophil killing. *Curr Opin Hematol*. (2015) Jan; 22(1):30-5. doi: 10.1097/MOH.000000000000096. Review.

Gresham HD, Lowrance HJ, Caver TE, Wilson BS, Cheung AL. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J. Immunol*. (2000) 164: 3713–22.

Grosz M, Kolter J, Paprotka K, *et al.* Cytoplasmic replication of *Staphylococcus aureus* upon phagosomal escape triggered by phenol-soluble modulins. *Cell Microbiol.* (2014) 16:451–465.

Grumann D, Nübel U, Bröker BM. *Staphylococcus aureus* toxins--their functions and genetics. *Infect Genet Evol.* (2014) Jan; 21:583-92. doi:10.1016/j.meegid.2013.03.013. Epub 2013 Mar 26. Review.

Hall JW, Yang J, Guo H, Ji Y. The AirSR two-component system contributes to *Staphylococcus aureus* survival in human blood and transcriptionally regulates sspABC operon. *Front Microbiol.* (2015) Jul 3; 6:682. doi: 10.3389/fmicb.2015.00682.

Haupt K, Reuter M, van den Elsen J, Burman J, Halbich S, Richter J, Skerka C, Zipfel PF. The *Staphylococcus aureus* protein Sbi acts as a complement inhibitor and forms a tripartite complex with host complement Factor H and C3b. *PLoS Pathog.* (2008) 4:e1000250.

Hartleib J, Köhler N, Dickinson RB, Chhatwal GS, Sixma JJ, Hartford OM, Foster TJ, Peters G, Kehrel BE, Herrmann M. Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood.* (2000) Sep 15; 96(6):2149-56.

Hilda JN, Das SD. TLR stimulation of human neutrophils lead to increased release of MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 and TNF during tuberculosis. *Hum Immunol.* (2016) Jan; 77(1):63-7. Doi 10.1016/j.humimm.2015.10.005.

Holdren GO, Rosenthal DJ, Yang J, Bates AM, Fischer CL, Zhang Y, Brogden NK, Brogden KA. Antimicrobial Activity of Chemokine CXCL10 for Dermal and Oral Microorganisms. *Antibiotics (Basel).* (2014) Oct 23; 3(4):527-539.

Hruz P, Zinkernagel A, Jenikova G, Botwin G, Hugot J-P, Karin M, Nizet V, Eckmann L. NOD2 contributes to cutaneous defense against *Staphylococcus aureus* through a toxin-dependent innate immune activation. *PNAS.* (2009) 106:12873-8.

Inoshima I, Inoshima N, Wilke GA, Powers ME, Frank KM, Wang Y, Bubeck-Wardenburg J: A *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. *Nat Med* (2011), 17:1310-1314.

Ishenman DE, Leung E, Mackay JD, Bagby S, van den Elsen JM. Mutational analyses reveal that the staphylococcal immune evasion molecule Sbi and complement receptor 2 (CR2) share overlapping contact residues on C3d: implications for the controversy regarding the CR2/C3d cocrystal structure. *J Immunol.* (2010) 184:1946-1955.

- Jansson B, Uhlén M, Nygren PA. All individual domains of staphylococcal protein A show Fab binding. *FEMS Immunol Med Microbiol.* (1998) Jan; 20(1):69-78. PubMed PMID: 9514577.
- Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity.* (2013) 38(2):209–23. doi: 10.1016/j.immuni. (2013) .02.003 PMID: 23438821.
- Kahl BC, Goulian M, van Wamel W, Herrmann M, Simon SM, Kaplan G, Peters G, Cheung AL... *Staphylococcus aureus* RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line. *Infect. Immun.* (2000) 68:5385–5392. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.68.9.5385-5392.2000>.
- Kaplan SL. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children. *Semin Pediatr Infect Dis.* (2006) 17:113-9.
- Kaplan A, Ma J, Kyme P, Wolf AJ, Becker CA, Tseng CW, Liu GY, Underhill DM. Failure to induce IFN- $\beta$  production during *Staphylococcus aureus* infection contributes to pathogenicity. *J Immunol.* (2012) Nov 1; 189(9):4537-45. doi:10.4049/jimmunol.1201111. Epub 2012 Sep 24.
- Kennedy AD, DeLeo FR. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res.* (2009) 43(1-3):25-61. doi: 10.1007/s12026-008-8049-6. Review.
- Kielian T, Phulwani NK, Esen N, Syed MM, Haney AC, McCastlain K, Johnson J. MyD88-dependent signals are essential for the host immune response in experimental brain abscess. *J Immunol.* (2007) Apr 1; 178(7):4528-37.
- Kim HK, Cheng AG, Kim HY, Missiakas DM, Schneewind O. Nontoxic protein A vaccine for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in mice. *J Exp Med.* (2010) Aug 30; 207(9):1863-70. doi: 10.1084/jem.20092514. Epub 2010 Aug 16.
- Kim HK, Emolo C, DeDent AC, Falugi F, Missiakas DM, Schneewind O. Protein A-specific monoclonal antibodies and prevention of *Staphylococcus aureus* disease in mice. *Infect Immun.* (2012) Oct; 80(10):3460-70. doi: 10.1128/IAI.00230-12. Epub 2012 Jul 23.
- Kim HK, Thammavongsa V, Schneewind O, Missiakas D. Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol.* (2012) Feb; 15(1):92-9. doi: 10.1016/j.mib.2011.10.012. Epub 2011 Nov 14. Review.

Kim HK, Falugi F, Thomer L, Missiakas DM, Schneewind O. Protein A suppresses immune responses during *Staphylococcus aureus* bloodstream infection in guinea pigs. *MBio*. (2015) Jan 6; 6(1). pii: e02369-14. doi: 10.1128/mBio.02369-14.

Kitur K, Parker D, Nieto P, Ahn DS, Cohen TS, Chung S, Wachtel S, Bueno S, Prince A. Toxin-induced necroptosis is a major mechanism of *Staphylococcus aureus* lung damage. *PLoS Pathog*. (2015) Apr 16; 11(4):e1004820. doi: 10.1371/journal.ppat.1004820.

Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Fridkin SK; Active Bacterial Core surveillance (ABCs) MRSA Investigators. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA*. (2007) Oct 17; 298(15):1763-71.

Kobayashi SD, Braughton KR, Whitney AR, Voyich JM, Schwan TG, Musser JM, DeLeo FR. Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2003) Sep 16; 100(19):10948-53. 5.

Kobayashi SD, Braughton KR, Palazzolo-Ballance AM, *et al*. Rapid neutrophil destruction following phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *J Innate Immun*. (2010) 2:560–575

Kobayashi SD, Malachowa N, DeLeo FR. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. *Am J Pathol*. (2015) Jun; 185(6):1518-27. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.11.030.

Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. (2013) Mar; 13(3):159-75. doi: 10.1038/nri3399.Review.

Korea CG, Balsamo G, Pezzicoli A, Merakou C, Tavarini S, Bagnoli F, Serruto D, Unnikrishnan M. Staphylococcal Esx proteins modulate apoptosis and release of intracellular *Staphylococcus aureus* during infection in epithelial cells. *Infect Immun*. (2014) Oct; 82(10):4144-53. doi: 10.1128/IAI.01576-14.

Koziel J, Maciag-Gudowska A, Mikolajczyk T, Bzowska M, Sturdevant DE, Whitney AR, Shaw LN, DeLeo FR, Potempa J. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by macrophages exerts cytoprotective effects manifested by the upregulation of antiapoptotic factors. *PLoS One*. (2009) 4:e5210. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005210>.

Kubica M, Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Richter W, Gajkowska B, Golda A, Gudowska A, Brix K, Shaw L, Foster T, Potempa J. A potenciales new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination:

the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. PloS One. (2008) 3: e1409.

Kumar A, Tassopoulos AM, Li Q, Yu FS. *Staphylococcus aureus* protein A induced inflammatory response in human corneal epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun. (2007) Mar 23; 354(4):955-61.

Kwiecinski J, Jin T, Josefsson E. Surface proteins of *Staphylococcus aureus* play an important role in experimental skin infection. APMIS. (2014) Dec; 122(12):1240-50. doi: 10.1111/apm.12295. Epub 2014 Jul 22.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. (1970) Aug 15; 227(5259):680-5.

Li X, Jiang S, Tapping RI. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. Cytokine. (2010) Jan; 49(1):1-9. doi: 10.1016/j.cyto.2009.08.010. Epub2009 Sep 22. Review.

Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO, Stiles JK. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. Cytokine Growth Factor Rev. (2011) Jun; 22(3):121-30. doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.06.001.

Liu CJ, Bosch X. Progranulin: a growth factor, a novel TNFR ligand and a drug target. Pharmacol Ther. (2012) Jan; 133(1):124-32. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.10.003. Epub 2011 Oct 8. Review.

Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, Bruck M, Holzinger D, Varga G, Roth J, Kahl B.C., Proctor R.A., Peters G. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. PLoS Pathog. (2010) 6, e1000715.

Löffler B, Tuchscher L, Niemann S, Peters G. *Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes. Int J Med Microbiol. (2014) Mar; 304(2):170-6. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.11.011. Epub 2013 Dec 1. Review.

Lowy, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med. (1998) 339:520-32.

Lowy FD... Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? Trends Microbiol. (2000) 8:341-343.

Lowy, F.D. Secrets of a superbug. Nat Med. (2007) 13:1418-20.

- Ma X, Chang W, Zhang C, Zhou X, Yu F. Staphylococcal Panton-Valentine leukocidin induces pro-inflammatory cytokine production and nuclear factor-kappa B activation in neutrophils. PLoS One. (2012) 7(4):e34970. doi:10.1371/journal.pone.0034970.
- Maggini J, Raiden S, Salamone G, Trevani A, Geffner J. Regulation of neutrophil apoptosis by cytokines, pathogens and environmental stressors. Front Biosci (Landmark Ed). (2009) Jan 1; 14:2372-85.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. Nat Rev Immunol. (2011) Jul 25; 11(8):519-31. doi: 10.1038/nri3024. Review.
- Martin FJ, Gómez MI, Wetzel D, Memmi G, O'Seaghdha M, Soong G, Schindler C, Prince A. *Staphylococcus aureus* activates type I IFN signaling through the Xr repeated sequences of protein A. J Clin Invest. (2009) 119:1931-39.
- Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. Annu Rev Pathol. (2014) 9:181-218. doi: 10.1146/annurev-pathol-020712-164023. Epub 2013 Sep 16. Review.
- Menzies BE, Kourteva I... *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in endothelial cells. FEMS Immunol. Med. Microbiol. (2000) 29:39– 45. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01503.x>.
- Mezyk R, Bzowska M, Bereta J. Structure and functions of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. Acta Biochim Pol. (2003); 50(3):625-45. Review.
- Moks T, Abrahmsen L, Nilsson B, Hellman U, Sjoquist J, and Uhlen, M. Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. Eur J Biochem. (1986) 156:637-43.
- Montgomery CP, Boyle-Vavra S, Daum RS. Importance of the global regulators Agr and SaeRS in the pathogenesis of CA-MRSA USA300 infection. PLoS One. (2010) Dec 2; 5(12):e15177. doi: 10.1371/journal.pone.0015177.
- Mundra JJ, Jian J, Bhagat P, Liu CJ. Progranulin inhibits expression and release of chemokines CXCL9 and CXCL10 in a TNFR1 dependent manner. Sci Rep. (2016) Feb 19; 6:21115. doi: 10.1038/srep21115.
- Muzio, M., D. Bosisio, N. Polentarutti, G. D'amico, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, C. van't Veer, G. Penton-Rol, L. P. Ruco, P. Allavena, and A. Mantovani. Differential expression and regulation of toll-

like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* (2000) 164: 5998–6004.

Nakane A, Okamoto M, Asano M, Kohanawa M, Minagawa T. Endogenous gamma interferon, tumor necrosis factor, and interleukin-6 in *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Infect Immun.* (1995) 63:1165-1172.

Naudé PJ, den Boer JA, Luiten PG, Eisel UL. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *FEBS J.* (2011) Apr; 278(6):888-98.

Nordenfelt P, Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol.* (2011) Aug; 90(2):271-84. doi: 10.1189/jlb.0810457.

Noskin GA, Rubin RJ, Schentag J.J, Kluytmans J, Hedblom E.C, Jacobson C, Smulders M, Gemmen E, Bharmal M. National trends in *Staphylococcus aureus* infection rates: impact on economic burden and mortality over a 6-year period (1998-2003). *Clin Infect Dis.* (2007) 45(9):1132-40.

Nygaard TK, Pallister KB, DuMont AL, DeWald M, Watkins RL, Pallister EQ, Malone C, Griffith S, Horswill AR, Torres VJ *et al.*: Alpha-toxin induces programmed cell death of human T cells, B cells, and monocytes during USA300 infection. *PLoS ONE.* (2012) 7:e36532.

Nygaard TK, Pallister KB, Zurek OW, Voyich JM. The impact of  $\alpha$ -toxin on host cell plasma membrane permeability and cytokine expression during human blood infection by CA-MRSA USA300. *J Leukoc Biol.* (2013) Nov; 94(5):971-9. doi: 10.1189/jlb.0213080.

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) 45:2087–96.

O'Halloran DP, Wynne K, Geoghegan JA. Protein A is released into the *Staphylococcus aureus* culture supernatant with an unprocessed sorting signal. *Infect Immun.* (2015) Apr; 83(4):1598-609. Doi: 10.1128/IAI.03122-14.

O'Seaghda M, van Schooten CJ, Kerrigan Sw, Emsley J, Silverman GJ, Cox D, Lenting PJ, Foster TJ. *Staphylococcus aureus* protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. *FEBS J.* (2006) 273(21): 4831-41.

Otto M. *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr Opin Microbiol.* (2014) Feb; 17:32-7. doi: 10.1016/j.mib.2013.11.004. Epub 2013 Dec 10. Review.

- Palmqvist N, Foster TJ, Tarkowski A, and Josefsson E. Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death. *Microbial Pathogenesis*. (2002) 33:239-49.
- Park HH, Lo YC, Lin SC, Wang L, Yang JK, Wu H The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annu Rev Immunol*. (2007) 25:561–586. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141656.
- Parker D, Prince A *Staphylococcus aureus* induces type I IFN signaling in dendritic cells via TLR9. *J Immunol*. (2012) 189: 4040–4046.
- Parker D, Prince A. Immunopathogenesis of *Staphylococcus aureus* pulmonary infection. *Semin Immunopathol*. (2012) Mar; 34(2):281-97. doi: 10.1007/s00281-011-0291-7. Epub 2011 Oct 31. Review.
- Pauli NT, Kim HK, Falugi F, Huang M, Dulac J, Henry Dunand C, Zheng NY, Kaur K, Andrews SF, Huang Y, DeDent A, Frank KM, Charnot-Katsikas A, Schneewind O, Wilson PC. *Staphylococcus aureus* infection induces protein A-mediated immune evasion in humans. *J Exp Med*. (2014) Nov 17; 211(12):2331-9. doi: 10.1084/jem.20141404.
- Pilsczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, *et al*. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*. (2010)185:7413–25.doi:10.4049/jimmunol.1000675.
- Que YA *et al*. . Mandell GL BJ, Dolin R. (Eds.) Churchill-Livingstone-Elsevier, Philadelphia, USA, electronic version (2010). 2010. In: Principles and Practice of Infectious Diseases, Churchill-Livingstone-Elsevier, Philadelphia, USA ed.
- Rand, M. L., J. S. Warren, M. K. Mansour, W. Newman, D. J. Ringler. Inhibition of T cell recruitment and cutaneous delayed-type hypersensitivity-induced inflammation with antibodies to monocyte chemoattractant protein-1. *Am. J. Pathol*. (1996) 148: 855-864.
- Rigby KM, DeLeo FR. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. *Semin Immunopathol*. (2012) Mar; 34(2):237-59. Doi 10.1007/s00281-011-0295-3. Epub 2011 Nov 12. Review.
- Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol*. (2011) Oct; 32(10):452-60. doi: 10.1016/j.it.2011.06.008. Epub 2011 Aug 11. Review.

Salamone GV, Petracca Y, Fuxman Bass JI, Rumbo M, Nahmod KA, Gabelloni ML, Vermeulen ME, Matteo MJ, Geffner JR, Trevani AS. Flagellin delays spontaneous human neutrophil apoptosis. *Lab Invest.* 2010 Jul; 90(7):1049-59. doi: 10.1038/labinvest.2010.77.

Sasso EH, Silverman GJ, and Mannik M. Human IgM molecules that bind staphylococcal protein A contain VHIII H chains. *J Immunol.* (1989) 142:2778-83.

Scapini, P., Lapinet-Vera, J. A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F., and Cassatella, M. A. The neutrophil as a cellular source of chemokines, *Immunol Rev.* (2000) 177, 195-203.

Sémiramoth N, Gleizes A, Turbica I, Sandré C, Gorges R, Kansau I, Servin A, Chollet-Martin S. *Escherichia coli* type 1 pili trigger late IL-8 production by neutrophil-like differentiated PLB-985 cells through a Src family kinase- and MAPK-dependent mechanism. *J Leukoc Biol.* (2009) Feb; 85(2):310-21. doi: 10.1189/jlb.0608350.

Sethi, S., & Chakraborty, T. Role of TLR- / NLR-signaling and the associated cytokines involved in recruitment of neutrophils in murine models of *Staphylococcus aureus* infection. *Virulence.* (2011) 2(4), 316–328. <http://doi.org/10.4161/viru.2.4.16142>.

Shimada, T., Park, B. G., Wolf, A. J., Brikos, C., Goodridge, H. S., Becker, C. A., Reyes, C. N., Miao, E. A., Aderem, A., Gotz, F., Liu, G. Y., Underhill, D. M. *Staphylococcus aureus* evades lysozyme-based peptidoglycan digestion that links phagocytosis, inflammasome activation, and IL-1 secretion. *Cell Host Microbe.* (2010) 7, 38 –49. 47.

Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, Bost DA, Riehman M, Naidich S, Kreiswirth BN. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol.* (1999) 37:3556-63.

Sidahmed AM, León AJ, Bosinger SE, Banner D, Danesh A, Cameron MJ, Kelvin DJ. CXCL10 contributes to p38-mediated apoptosis in primary T lymphocytes in vitro. *Cytokine.* (2012) Aug; 59(2):433-41. doi: 10.1016/j.cyto.2012.05.002.

Silverman GJ, and Goodyear CS. Confounding B-cell defences: lessons from a staphylococcal superantigen. *Nat Rev Immunol.* (2006) 6:465-75.

Simard FA, Cloutier A, Ear T, Vardhan H, McDonald PP. MEK-independent ERK activation in human neutrophils and its impact on functional responses. *J Leukoc Biol.* (2015) Oct; 98(4):565-73. doi: 10.1189/jlb.2MA1214-599R.

- Smith S, Skerrett SJ, Chi EY, Jonas M, Mohler K, Wilson CB. The locus of tumor necrosis factor- $\alpha$  action in lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* (1998) Dec; 19(6):881-91.
- Soong G, Martin FJ, Chun J, Cohen TS, Ahn DS, Prince A. *Staphylococcus aureus* protein A mediates invasion across airway epithelial cells through activation of RhoA GTPase signaling and proteolytic activity. *J Biol Chem.* (2011) Oct 14; 286(41):35891-8. doi: 10.1074/jbc.M111.295386.
- Soong G, Chun J, Parker D, Prince A. *Staphylococcus aureus* activation of caspase 1/calpain signaling mediates invasion through human keratinocytes. *J Infect Dis.* (2012) May 15; 205(10):1571-9.
- Spaan, A. N., Surewaard, B. G. J., Nijland, R., & van Strijp, J. a G. Neutrophils versus *Staphylococcus aureus*: a biological tug of war. *Annual Review of Microbiology.* (2013) 67, 629–50. <http://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155746>.
- Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJ, Perret M, Badiou C, Aerts PC, Kemmink J, de Haas CJ, van Kessel KP, Vandenesch F *et al.*: The staphylococcal toxin Panton-Valentine Leukocidin targets human C5a receptors. *Cell Host Microbe.* (2013) 13:584-594.
- Strieter, R. M., Kasahara, K., Allen, R., Showell, H. J., Standiford T. J., and Kunkel, S. L. Human neutrophils exhibit disparate chemotactic gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1990) 173, 725-730.
- Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Cytokines in innate host defense in the lung. *J Clin Invest.* (2002) Mar; 109(6):699-705. Review.
- Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* (2010) Aug; 31(8):318-24. doi: 10.1016/j.it.2010.05.006. Review.
- Surewaard B, de Haas C, Vervoort F, Rigby K, Deleo F, Otto M, van Strijp J, Nijland R: Staphylococcal alpha-phenol soluble modulins contribute to neutrophil lysis after phagocytosis. *Cell Microbiol.* (2013) 15:1427-1437.
- Tamassia N, Le Moigne V, Calzetti F, Donini M, Gasperini S, Ear T, Cloutier A, Martinez FO, Fabbri M, Locati M, Mantovani A, McDonald PP, Cassatella MA. The MyD88-independent pathway is not mobilized in human neutrophils stimulated via TLR4. *J Immunol.* (2007) Jun 1; 178(11):7344-56.

Tamassia N, Bazzoni F, Le Moigne V, Calzetti F, Masala C, Grisendi G, Bussmeyer U, Scutera S, De Gironcoli M, Costantini C, Musso T, Cassatella MA. IFN- $\beta$  expression is directly activated in human neutrophils transfected with plasmid DNA and is further increased via TLR-4-mediated signaling. *J Immunol.* (2012) Aug 1; 189(3):1500-9. doi: 10.4049/jimmunol.1102985.

Tamassia N, Cassatella MA. Cytoplasmic receptors recognizing nucleic acids and mediating immune functions in neutrophils. *Curr Opin Pharmacol.* (2013) Aug; 13(4):547-54. doi: 10.1016/j.coph.2013.05.003.

Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front Immunol.* (2014) Oct 21; 5:508. doi: 10.3389/fimmu.2014.00508.

Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control?* (2006) Jun; 34(5 Suppl 1):S3-10; discussion S64-73.

Thammavongsa V, Missiakas DM, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. *Science.* (2013) Nov 15; 342(6160):863-6. doi: 10.1126/science.1242255.

Thammavongsa V, Kim HK, Missiakas D, Schneewind O. Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nat Rev Microbiol.* (2015) Aug 14; 13(9):529-43. doi: 10.1038/nrmicro3521. PubMed PMID: 26272408.

Thomas CJ, Schroder K. Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends Immunol.* (2013) Jul; 34(7):317-28. doi: 10.1016/j.it.2013.02.008.

Thwaites GE, Gant V. Are bloodstream leukocytes Trojan Horses for the metastasis of *S. aureus*? *Nat. Rev. Microbiol.* (2011) 9:215–22.

Tokumoto MB, Ybarra V, Torreno M, Rodríguez M, Ramírez MS, Jordá Vargas L, Centrón D. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) pediatric clone among skin and soft-tissue infections in Buenos Aires. *Int J Antimicrob Agents.* (2007) 30(5):469-71.

Tsuda Y, Takahashi H, Kobayashi M, Hanafusa T, Herndon DN, Suzuki F. Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity.* (2004) Aug; 21(2):215-26.

Uhlen M, Guss B, Nilsson B, Gatenbeck S, Philipson L, and Lindberg M.. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. J Biol Chem. (1984) 259:1695-1702.

Upadhyay A, Burman JD, Clark EA, Leung E, Isenman DE, van den Elsen JM, Bagby S. Structure-function analysis of the C3 binding region of *Staphylococcus aureus* immune subversion protein Sbi. J Biol Chem. (2008) 283:22113-22120.

van den Berg JM, Weyer S, Weening JJ, Roos D, Kuijpers TW. Divergent effects of tumor necrosis factor alpha on apoptosis of human neutrophils. J Leukoc Biol. (2001) Mar; 69(3):467-73.

Vanden Berghe Tom, William J Kaiser, Mathieu JM Bertrand & Peter Vandenabeele Molecularcrosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling, Molecular & Cellular Oncology. (2015) 2:4, e975093, DOI:10.4161/23723556.2014.975093.

Van Damme, J., Proost, P., Put, W., Arens, S., Lenaerts, J. P., Conings, R., Opdenakker, G., Heremans, H., and Billiau, A. Induction of monocyte chemotactic proteins MCP-1 and MCP-2 in human fibroblasts and leukocytes by cytokines and cytokine inducers. Chemicals synthesis of MCP-2 and development of a specific RIA. J. Immunol. (1994) 152, 5495-5502.

van Kessel KP, Bestebroer J, van Strijp JA. Neutrophil-Mediated Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. Front Immunol. (2014) Sep 26; 5:467. doi: 10.3389/fimmu.2014.00467.

Ventura, C.L., Malachowa, N., Hammer, C.H., Nardone, G.A., Robinson, M.A., Kobayashi, S.D., DeLeo, F.R., Identification of a novel *Staphylococcus aureus* two-component leukotoxin using cell surface proteomics. PLoS ONE. (2010) 5, e11634.

von Aulock S, S. Morath, L. Hareng, S. Knapp, K. P. van Kessel, J. A. van Strijp, and T. Hartung. Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* is a potent stimulus for neutrophil recruitment. Immunobiology. (2003) 208:413– 22.

Voyich JM, Braughton KR, Sturdevant DE, Whitney AR, Said- Salim B, Porcella SF, Long RD, Dorward DW, Gardner DJ, Kreiswirth BN, Musser JM, DeLeo FR Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. J Immunol. (2005) 175(6):3907– 3919.

Voyich JM, Otto M, Mathema B, Braughton KR, Whitney AR, Welty D, Long RD, Dorward DW, Gardner DJ, Lina G, Kreiswirth BN, DeLeo FR. Is Pantón–Valentine leukocidin the major virulence

- determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? J Infect Dis. (2006) 194(12):1761–1770.
- Voyich JM, Vuong C, DeWald M, *et al.* The SaeR/S gene regulatory system is essential for innate immune evasion by *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis (2009) 199:1698–1706.
- Wajant H, Scheurich P. TNFR1-induced activation of the classical NF- $\kappa$ B pathway. FEBS J. (2011) Apr; 278(6):862-76.
- Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach TH, Queck SY, Li M, Kennedy AD, Dorward DW, Klebanoff SJ, Peschel A, DeLeo FR, Otto M. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. Nat Med. (2007) Dec; 13(12):1510-4. Epub 2007 Nov 11.
- Watkins RL, Pallister KB, Voyich JM. The SaeR/S Gene Regulatory System Induces a Pro-Inflammatory Cytokine Response during *Staphylococcus aureus* Infection. Diep BA, ed. PLoS ONE. (2011) 6(5):e19939. doi:10.1371/journal.pone.0019939.
- Watkins RL, Zurek OW, Pallister KB, Voyich JM. The SaeR/S two-component system induces interferon-gamma production in neutrophils during invasive *Staphylococcus aureus* infection. Microbes Infect. (2013) Sep-Oct; 15(10-11):749-54. doi: 10.1016/j.micinf.2013.05.004.
- Wesson CA, Deringer J, Liou LE, Bayles KW, Bohach GA, Trumble WR. Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* in epithelial cells utilizes a mechanism involving caspases 8 and 3. Infect. Immun. (2000).68:2998– 3001. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.68.5.2998-3001.2000>.
- Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, Kolonay JF, Shetty J, Killgore GE, Tenover FC, Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. Science. (2003) 302:1569-71.
- Weng D, Marty-Roix R, Ganesan S, Proulx MK, Vladimer GI, Kaiser WJ, *et al.* Caspase-8 and RIP kinases regulate bacteria-induced innate immune responses and cell death. Proc Natl Acad Sci U S A. (2014) 111(20):7391–6. doi: 10.1073/pnas.1403477111.
- Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, *et al.* The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis. (2005) 5:751–62.
- Willet H., Estafilococo. En Microbiología, Zinsser, Joklik, Willet, Amos, 18º edición, (1986) 519-540.

Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., and Halbwachs-Mecarelli, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects, *Lab Invest.* (2000) 80, 617-653.

Witko-Sarsat V, Pederzoli-RibeilM, Hirsch E, Sozzani S, Cassatella MA. Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game. *Trends Immunol.* (2011) 32(3):117–124. doi: 10.1016.

Wright JA, Nair SP. Interaction of staphylococci with bone. *Int J Med Microbiol.* (2010) 300:193-204.

Yamashiro, S., H. Kamohara, T. Yoshimura. MCP-1 is selectively expressed in the late phase by cytokine-stimulated human neutrophils: TNF- $\alpha$  plays a role in the maximal MCP-1 mRNA expression. *J. Leukocyte Biol.* (1999) 165: 671-679.

Yang D, Chen Q, Hoover DM, Staley P, Tucker KD, Lubkowski J, Oppenheim JJ. Many chemokines including CCL20/MIP-3 $\alpha$  display antimicrobial activity. *J Leukoc Biol.* (2003) Sep; 74(3):448-55.

Yanai M, Rocha MA, Matolek AZ, Chintalacharuvu A, Taira Y, Chintalacharuvu K, Beenhouwer DO. Separately or combined, LukG/LukH is functionally unique compared to other staphylococcal bicomponent leukotoxins. *PLoS One.* (2014) Feb 20; 9(2):e89308. doi: 10.1371/journal.pone.0089308.

Yoong P, Pier GB. Immune-activating properties of Panton-Valentine leukocidin improve the outcome in a model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infect Immun.* (2012) Aug; 80(8):2894-904. doi: 10.1128/IAI.06360-11.

Yoshimura T, Takahashi M. IFN-gamma-mediated survival enables human neutrophils to produce MCP-1/CCL2 in response to activation by TLR ligands. *J Immunol.* (2007) Aug 1; 179(3):1942-9.

Zemans RL, Arndt PG. Tec kinases regulate actin assembly and cytokine expression in LPS-stimulated human neutrophils via JNK activation. *Cell Immunol.* (2009) 258(1):90-7. doi: 10.1016/j.cellimm.2009.03.017.

Zhang B, Patel J, Croyle M, Diamond MS, Klein RS. TNF-alpha-dependent regulation of CXCR3 expression modulates neuronal survival during West Nile virus encephalitis. *J Neuroimmunol.* (2010) Jul 27; 224(1-2):28-38. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.05.003.

Zurek OW, Pallister KB, Voyich JM. *Staphylococcus aureus* Inhibits Neutrophil-derived IL-8 to Promote Cell Death. *J Infect Dis.* (2015) Feb 26. pii:jjv124.

