

Trabajo Fin de Grado

TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS: REVISIÓN DE SU PAPEL FISIOLÓGICO Y PATOGENICO

NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS: A REVIEW OF THEIR PHYSIOLOGICAL AND PATHOGENIC FUNCTION

Autora

Sara Monzón Blasco

Directora

Elena Piazuelo Ortega

Facultad de Medicina
2018/2019

RESUMEN	4
PALABRAS CLAVE	4
ABSTRACT	5
KEY WORDS	5
INTRODUCCIÓN	6
OBJETIVOS	9
MATERIAL Y MÉTODOS	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS	11
MECANISMO DE FORMACIÓN DE NETS	13
FACTORES INDUCTORES DE NETS	15
PAPEL DE LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN PROCESOS INFECCIOSOS.....	15
<i>STAPHYLOCCOCUS AUREUS</i>	16
<i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	16
<i>ESCHERICHIA COLI</i>	16
<i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i>	16
<i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i>	17
<i>YERSINIA SPP</i>	17
<i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i>	17
<i>SHIGELLA FLEXNERI</i>	17
<i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	17
<i>VIBRIO CHOLERA</i> E	18
<i>DENGUE</i>	18
<i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i>	18
<i>VIRUS INFLUENZA</i>	18
<i>VIH</i>	19
<i>VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL</i>	19
<i>CANDIDA ALBICANS</i>	19
<i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	19
PAPEL DE LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES.....	20
LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO (LES)	20

ARTRITIS REUMATOIDE (AR).....	21
VASCULITIS	22
PAPEL DE LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN ENFERMEDADES DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS.....	23
PAPEL DE LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN LA ENFERMEDAD TROMBÓTICA.....	26
NETS Y ATEROSCLEROSIS.....	26
NETS, ATEROTROMBOSIS E INFARTO DE MIOCARDIO.....	26
NETS Y TROMBOSIS VENOSA	27
PAPEL DE LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN EL CÁNCER	28
MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE NETS. LAS NETS COMO BIOMARCADORES DE ENFERMEDAD.	29
LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NUTRÓFILOS COMO DIANA TERAPÉUTICA	31
TRATAMIENTO CON DNASAS	31
TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE LA PAD-4.....	32
TRATAMIENTO CON ECULIZUMAB	32
TRATAMIENTO CON NADPH OXIDASA	32
TRATAMIENTO CON CALCITRIOL	32
TRATAMIENTO CON HIDROCLOROQUINA	33
TRATAMIENTO CONTRA IL-7 y TNF	33
TRATAMIENTO CONTRA LA P-SELECTINA.....	33
TRATAMIENTO CON HEPARINA	33
TRATAMIENTO CONTRA LA MPO.....	33
CONCLUSIONES.....	34
BIBLIOGRAFÍA	35
ANEXOS	45
ANEXO 1: GLOSARIO	45
ANEXO 2: ENSAYOS CLÍNICOS DESARROLLADOS ACTUALMENTE SEGÚN <i>clinicaltrials.gov</i>	46

RESUMEN

Los neutrófilos (polimorfonucleares) forman parte del sistema de inmunidad innata, siendo las primeras células que acuden al lugar de inflamación con objeto de eliminar elementos patógenos que atacan al organismo, actuando a través de la fagocitosis, degranulación y, tal y como ha sido descrito recientemente, mediante la expulsión al exterior de unas estructuras en forma de redes formadas por ADN y proteínas que se han denominado Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs) y NETosis al proceso de formación de las mismas. Esta revisión se centra en conocer la composición, mecanismo de formación, función fisiológica de las NETs así como su implicación en el desarrollo de diversas patologías.

El ADN constituye el principal componente estructural de las NETs sobre el que se incorporan diferentes proteínas neutrofílicas nucleares, citoplasmáticas y granulares con capacidad antimicrobiana. Se han descrito dos tipos de NETosis: vital, cuyo resultado es un neutrófilo enucleado que mantiene su capacidad fagocítica, y suicida que conlleva la muerte celular del neutrófilo.

Las NETs resultan efectivas en la contención de una amplia variedad de microorganismos causantes de infección incluyendo bacterias, hongos y parásitos aunque, en algunos casos, estos disponen de mecanismos para evadir su acción antimicrobiana.

Sin embargo, evidencias científicas crecientes sugieren que las NETs son un arma de doble filo, ya que también podrían estar involucradas en la iniciación y promoción de diversas patologías en las que existe un elevado estado de inflamación como las enfermedades autoinmunes, ciertas enfermedades respiratorias o el cáncer. Por otra parte, se ha constatado que las NETs inducen la activación plaquetaria, coagulación y formación de trombos, a la vez que dañan las células endoteliales provocando su disfunción, por lo que se les atribuye un papel importante en la enfermedad trombótica y la aterosclerosis.

De este modo, se ha propuesto que la detección de NETs en sangre o tejido podría resultar útil como biomarcador diagnóstico y pronóstico de enfermedad. Igualmente, las NETs podrían constituir una diana terapéutica para las patologías en las que se ven involucradas. A este respecto, diversos tratamientos con antioxidantes, DNAsas, inhibidores de PAD-4 o anticuerpos monoclonales están siendo evaluados.

PALABRAS CLAVE

Neutrófilo, trampas extracelulares de neutrófilos, NETs, NETosis, cromatina, inflamación, infección, autoinmunidad, trombosis, cáncer.

ABSTRACT

Neutrophils (polymorphonuclear) are part of the innate immune system, being the first cells to reach the site of the inflammation site in order to eliminate pathogens that attack the organism, carrying out their function throughout fagocytosis, degranulation, and as has been recently described, expelling to the extracellular space some networks made up of DNA and proteins, called Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and NETosis, the process of formation. This review focuses on knowing how they are generated, their composition, physiological function as well as their involvement in various pathologies.

DNA is the main structural component of NETs, on which different nuclear, cytoplasmic and granular neutrophilic proteins with antimicrobial capacity are incorporated. Two types of NETosis have been described: vital, resulting in an enucleated neutrophil that conserves its phagocytic capacity, and suicide that leads to neutrophil cell death.

NETs are effective in containing a wide variety of microorganisms that cause infection including bacteria, fungi and parasites although, in some cases, they have some methods to get way with their antimicrobial action.

Nevertheless, increasing scientific evidences suggest that NETs are a double-edge sword, since they could also be involved in the initiation and promotion of some disorders with high inflammation rates such as autoimmune diseases, some respiratory diseases and cancer. On the other hand, it has been shown that NETs activate platelets, coagulation and thrombosis. In addition, they also harm endothelial cells, causing their disfunction. Therefore, they play an important role in thrombotic disease and atherosclerosis.

In this way, it has been proposed that detection of NETs in blood or tissue could be useful as a biomarker diagnosis and prognosis of several diseases. Likewise, NETs could become a therapeutic target for the pathologies in which they are involved. In this regard, various treatments with antioxidants, DNase, PAD-4 inhibitors or monoclonal antibodies are being evaluated.

KEY WORDS

Neutrophil, Neutrophil extracellular traps, NETs, NETosis, cromatin, inflammation, infection, autoimmunity, thrombosis, cancer.

INTRODUCCIÓN

Los **neutrófilos**, también denominados leucocitos polimorfonucleares (PMN), constituyen la población celular más abundante en la sangre humana. Son producidos en la médula ósea, forman parte del sistema inmune y son las primeras células que acuden al lugar de la inflamación, donde aportan citocinas a los tejidos y contribuyen a eliminar microorganismos patógenos, para finalmente acabar siendo eliminados por los macrófagos. ⁽¹⁾ Se encuentran normalmente circulando por el torrente sanguíneo, donde tienen una vida media de 6 a 8 horas, mientras que en los tejidos pueden llegar a durar hasta 7 días. ⁽²⁾

El fenotipo de los neutrófilos sufre variaciones a lo largo de su recorrido desde su formación en la médula ósea (neutrófilos frescos) hasta que acaban siendo eliminados (neutrófilos viejos). Este envejecimiento confiere al neutrófilo distintas propiedades, al igual que los distintos ambientes por donde circula la célula, que también son clave para la adquisición de diversas funciones. ⁽³⁾

Los neutrófilos forman parte del sistema de inmunidad innata. Son las primeras células que acuden desde el torrente sanguíneo hasta las zonas de infección. Una vez allí actúan tratando de eliminar a los microorganismos con la ayuda de enzimas proteolíticas, antimicrobianas y **Especies de Oxígeno Reactivo (ROS)** ⁽⁴⁾ a la vez que sirven de señal activadora de otras células del sistema inmune que llegarán para contener y acabar con la infección. Los neutrófilos son conocidos por su núcleo lobulado (polimorfonucleares, PMN) y porque contienen en su citoplasma gran cantidad de gránulos ⁽⁵⁾ con numerosas proteínas en su interior tales como la α -defensina, la hCAP18 (Human Cationic Antimicrobial Protein 18) o la lactoferrina entre otras ⁽⁶⁾. La principal acción de los neutrófilos es eliminar microorganismos, fagocitarlos.

Los neutrófilos detectan la presencia del microorganismo a través de los receptores transmembrana **Toll-like (TLR)**, que reconocen a los patógenos e inician una cascada de transducción de la señal activadora de la respuesta inflamatoria. ⁽⁷⁾

Los neutrófilos pueden utilizar diferentes mecanismos para eliminar agentes patógenos: 1) la **fagocitosis** y eliminación de los microorganismos internalizados dentro del fagosoma gracias a la ayuda de las Especies de Oxígeno Reactivo (ROS) y compuestos antimicrobianos que son liberados en las vacuolas fagocíticas; 2) mediante la **degranulación**, es decir, liberando sustancias contra los microorganismos en el lugar de la infección; 3) otra vía de eliminación de patógenos que ha sido recientemente descrita es mediante la expulsión al exterior de unas estructuras en forma de entramado o redes de ADN y proteínas con función bactericida, que se han denominado **Trampas Extracelulares de Neutrófilos** (en inglés, Neutrophil Extracellular Traps, **NETs**). ⁽⁸⁾ Esta última función es la que vamos a estudiar en esta revisión bibliográfica.

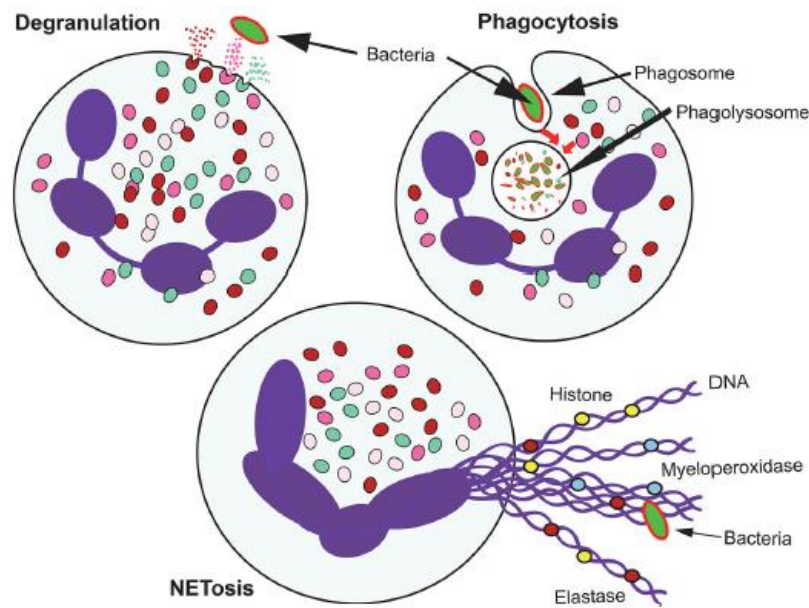


Figura 1. Diferentes tipos de mecanismos para eliminar agentes patógenos de los neutrófilos. *Frontiers in Physiology*. 2018. ⁽⁹⁾

Las **NETs** se descubrieron en 1996, como una forma de muerte celular diferente a la necrosis y a la apoptosis. ⁽¹⁰⁾ *Takey et al.* investigaban la relación de la activación de los neutrófilos y su destrucción usando forbol-miristato-acetato (**PMA**). Observaron cambios morfológicos diferentes de aquellos que ocurrían en la necrosis y en la apoptosis. Así fue cómo se plantearon la existencia de una tercera vía de muerte celular ⁽²⁾. Estos autores describieron lo siguiente: primero, el núcleo multilobulado se fusionaba, a la vez que se descondensaba la cromatina. Más tarde la membrana nuclear se rompía para liberar el contenido hacia el citoplasma. Tres horas después la membrana extracelular se fragmentaba gracias a un mecanismo mediado por Especies Reactivas de Oxígeno (ROS). En 2004 este proceso fue descrito más a fondo y se denominó **NETosis**. ⁽¹¹⁾

Las NETs son estructuras en forma de red que contienen cromatina descondensada, proteínas citoplasmáticas y granulares que son capaces de atrapar y eliminar los patógenos. ⁽¹²⁾

Existe una forma de muerte celular similar a la NETosis: la **ETosis**, que es llevada a cabo por eosinófilos y mastocitos. Estos expulsan al exterior redes con ADN mitocondrial y proteínas granulares que podrían formar parte de la respuesta en situaciones de hipersensibilidad alérgica. ⁽¹³⁾

A pesar de que las NETs constituyen un mecanismo de defensa para eliminar microorganismos, en los últimos años han aparecido estudios que han puesto de manifiesto que estas estructuras pueden estar asociadas al desarrollo de patologías tan diversas como enfermedades autoinmunes, enfermedad cardiovascular o cáncer entre

otras. En esta revisión describiremos la composición y función fisiológica de las NETs, así como su papel en el desarrollo de diferentes patologías.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es revisar la evidencia científica disponible hasta el momento en relación a la estructura, modo de acción, papel fisiológico de las Trampas Extracelulares de Neutrófilos, así como su implicación en la patogenia de distintos tipos de enfermedades, su potencial uso como marcador diagnóstico y/o pronóstico o diana terapéutica para el desarrollo de nuevos tratamientos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Con el fin de realizar esta revisión bibliográfica se han obtenido diversos artículos científicos realizando búsquedas sistemáticas en la bases de datos de PubMed y Biblioteca Cochrane de estudios, ensayos *in vitro* e *in vivo* y revisiones bibliográficas en lengua inglesa durante el periodo de tiempo comprendido entre 1996 y 2019 que tratasen sobre los neutrófilos y la liberación de NETs, así como las relaciones de estos con diversas entidades patológicas. Además se ha realizado una búsqueda de ensayos clínicos o estudios observacionales relacionados con las NETs en el sitio web clinicaltrials.gov.

Para la búsqueda se utilizaron términos tales como “Neutrophil extracellular traps”, “NETs”, “NETosis” “*Haemophilus influenzae*”, “*Mycobacterium tuberculosis*”, “Dengue”, “cancer”, “biomarker”, “quantification”, “therapeutics”. Se revisaron los resúmenes de los artículos y se seleccionaron los que más interés suscitaban con respecto a esta revisión.

Por otra parte también han sido incluidos en este trabajo artículos obtenidos de la búsqueda directa a partir de las referencias de los mismos que aparecían en otros artículos revisados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS

F. Urban et al ⁽¹⁴⁾ aislaron neutrófilos de donantes sanos con el fin de investigar la composición de las NETs. Los indujeron utilizando forbol-miristato-acetato (PMA). Identificaron 24 proteínas diferentes de localización nuclear, granular y citoplasmática.

- Nucleares: encontraron cuatro tipos de histonas del core y el antígeno de diferenciación de la célula mieloide (MNDa): Histona H2A (H2A), Histona H2B (H2B) y H2B-like (H2B), Histona H3 (H), Histona H4 (H4), Antígeno de diferenciación de la célula mieloide (MNDa).
- Granulares: identificaron ocho proteínas, cinco de las cuales (elastasa neutrofílica (NE), lactotransferrina (LTF), catepsina G (CG), mieloperoxidasa (MPO) (11) y proteinasa leucocitaria 3 (PR3) (15) ya habían sido previamente asociadas con las NETs. Azurocidina (AZU1), lisozima C (LysC) y defensina neutrofílica 1 y 3 (DEFA-1 y -3) también son componentes de este entramado.
- Citoplásmicas: encontraron las proteínas S100 A8, A9 y A12
- Citoesqueleto: actina β y/o γ (ACTB, ACTG1), miosina-9 (MYH-9), actinina- α (1 y/o 4) (ACTIN-1, ACTIN-4), plastina-2 (LCP 1), citoqueratina-10 (KRT-10)
- Peroxisomas: catalasa (CAT)
- Enzimas glicolíticas: α -enolasa (ENO1), transcetolasa (TKT)

Las **histonas** (proteínas básicas que contribuyen a la formación de cromatina por parte del ADN)⁽⁵⁾ facilitan la adhesión de virus y bacterias (negativamente cargados). Histonas y ácidos nucleicos tienen, per se, actividad bactericida. ⁽¹²⁾ Esta capacidad fue descubierta por James Hirsch en la década de 1950. El ADN es activo frente a *Pseudomonas aeruginosa* gracias a su esqueleto fosfodiéster, que actúa como quelante para cationes y es capaz de romper las membranas interna y externa de dicho microorganismo. ⁽²⁾ La histona H2A es presumiblemente uno de los agentes antimicrobianos más efectivos, sobre todo contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus albus* y *Staphylococcus aureus*. H4 es activo frente a *Staphylococcus aureus* y *Propionibacterium spp.* ⁽¹⁶⁾ Poseen además capacidad antiparasitaria. Wang et al observaron que H2A y H2B reducían la replicación de los promastigotes de *Leishmania spp.* hasta en un 50%. ⁽¹⁷⁾

Las histonas de las NETs se encuentran citrulinadas. ⁽¹⁸⁾ La **citrulinización** es la conversión de arginina a citrulina por peptidil arginina deaminasas (**PADs**). La PAD4 está relacionada con la citrulinización y por tanto descondensación de la cromatina en la formación de las NETs. Está demostrado que la eliminación de la PAD4 mediante métodos químicos o manipulación genética reduce la formación de NETs. ⁽¹⁹⁾ ⁽²⁰⁾ ⁽²¹⁾ De todas formas este es un campo que queda por estudiar en más profundidad.

Por otro lado también es conocido el efecto de citotoxicidad de las histonas, que podría ser una de las causas del efecto patógeno de las NETs. De hecho existen anticuerpos anti-histona que previenen sus efectos en varias enfermedades.⁽²²⁾

La citotoxicidad que producen las histonas es debido a las fuerzas electrostáticas: se encuentran cargadas positivamente, y reaccionan frente a moléculas con cargas negativas.⁽²³⁾ Las histonas catiónicas se unen a los fosfolípidos de membrana (aniones) y se integran entre ellos con el fin de alterar la permeabilidad, resultando en muerte celular.

Las histonas, cuando se encuentran en el medio extracelular, son capaces de generar citotoxicidad directa en tejido epitelial y endotelial. También pueden activar el complemento y desencadenar una respuesta inflamatoria, reclutando células del sistema inmune por la vía de los receptores Toll-like (TLR). Este proceso actúa como feedback positivo, incrementando la liberación de más cantidad de histonas y a su vez amplificando la respuesta inflamatoria. El proceso es el siguiente: las **histonas** activan los **TRL**, que a su vez estimulan la liberación de **citocinas** y activan las vías de señalización dependientes de **MyD88** (factor de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88). La activación de **TLR9** desencadena la producción de **ROS**, con posterior activación del **inflammasoma NLRP3**, la **caspasa 1** y reclutamiento de **otras células proinflamatorias**. El resultado de toda esta cascada de activación es el **daño** orgánico por inflamación.⁽²⁴⁾

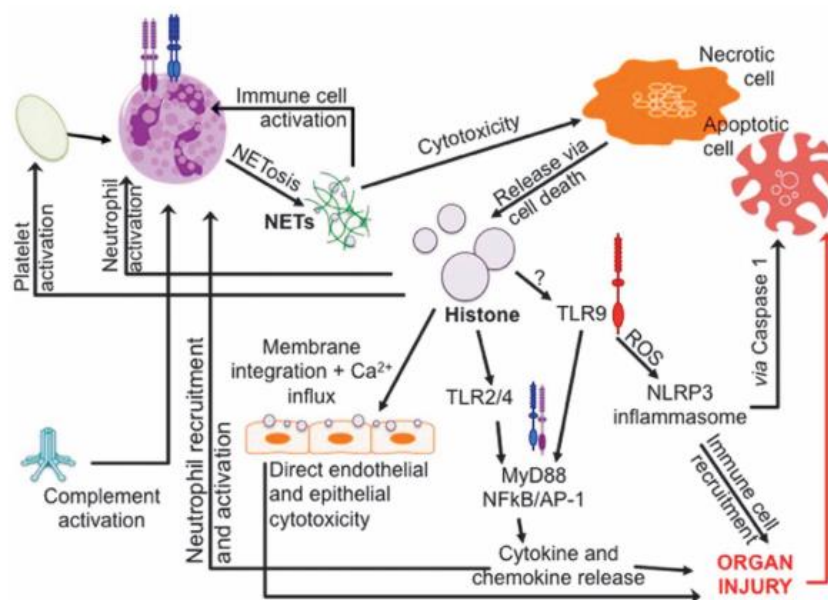


Figura 2. Cadena de activación de la inflamación y daño orgánico por estimulación neutrofílica. Cell death and disease. 2017; 8(5): e2812⁽²⁴⁾

MECANISMO DE FORMACIÓN DE NETS

Existen evidencias de que la formación de NETs puede ocurrir mediante al menos dos mecanismos distintos, uno dependiente de la activación de NADPH oxidasa y, por tanto de la formación de ROS y otro independiente. Además, no siempre que se produce la formación de NETs tiene lugar la muerte del neutrófilo, por lo que se han diferenciado dos tipos de NETosis: suicida y vital. En la primera, el resultado final es la muerte celular del neutrófilo, mientras que en la segunda la célula no se destruye, sino que el ADN nuclear se libera al exterior mediante la formación de vesículas, no existe ruptura de la membrana celular y el neutrófilo mantiene su capacidad para fagocitar y destruir los patógenos fagocitados.

NETOSIS SUICIDA: Se trata de un proceso lento (horas). En primer lugar el estímulo es reconocido por el neutrófilo vía diferentes receptores de la membrana como los **Toll-like** (TLRs), o los receptores para el fragmento Fc, entre otros. Se produce la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico al citosol lo que provoca la activación de las vías Protein Kinasa C (PKC) o RAF/MEK/MAPK, que inducen la fosforilación de la proteína **gp91phox** del complejo **NADPH oxidasa** y éste se activa. El resultado es la formación de ROS.

En el citoplasma existe un complejo proteico que reside en los gránulos azurófilos que contiene **proteasas de serina** tales como elastasa (**NE**), mieloperoxidasa (**MPO**), **catepsina G** y **azurocidina**. Las ROS formados por la activación de la NADPH oxidasa desencadenan la disociación de este complejo, de forma que dichas enzimas se trasladan hasta el núcleo por un mecanismo desconocido. Una vez en el núcleo, estas proteasas actúan sobre las histonas, facilitando la descondensación de la cromatina. El calcio, por su parte, es el cofactor de una enzima nuclear, la peptidil arginina deaminasa (**PAD4**), vital en todo este proceso de formación de NETs, cuya misión es convertir la arginina de las histonas en citrulina y así permitir el desensamblaje de éstas con el ADN y de esa forma descompactar la cromatina. Esta comienza así a perder su estructura compacta y el núcleo pierde su lobulación (proceso propio de la NETosis, que no comparten ni la necrosis ni la apoptosis) ⁽⁵⁾. Las membranas de los gránulos citoplasmáticos y la del núcleo comienzan a desorganizarse y a romperse. Como consecuencia, todo el material del neutrófilo se entremezcla en el citoplasma para, poco después, ser expulsado al exterior tras desintegrarse la membrana celular. Finalmente las trazas de ADN se liberan al espacio extracelular. ⁽²⁾

Algunos de los estímulos capaces de dar lugar a la NETosis suicida mediada por ROS son microorganismos, colesterol o **PMA in vitro**. ⁽⁵⁾ Este tipo de NETosis tiene una duración de 2-4 horas.

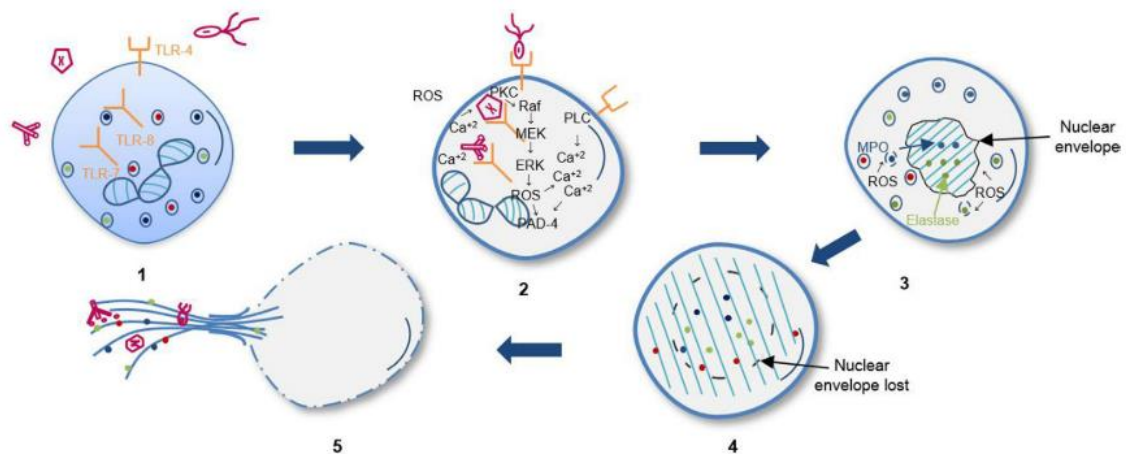


Figura 3. Proceso de la NETosis sucida. ⁽²⁾

NETOSIS VITAL: Proceso más rápido (minutos) ⁽¹²⁾, en el que la cromatina se libera a través de vesículas que la exteriorizan en la membrana celular. El resultado final es un neutrófilo anucleado que sigue pudiendo realizar funciones de fagocitosis o quimiotaxis. ⁽²⁵⁾. Puede ser inducido por elementos microbianos y no requiere de la participación de la NADPH oxidasa. ⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾ *Pilsczek et al* comprobaron que cuando se cultivaban neutrófilos con *S. aureus* tenía lugar una rápida liberación de ADN. El núcleo se dilataba y se formaban vesículas que contenían ADN, se fundían con la membrana celular y expulsaban al exterior su contenido sin que la célula muriese. ⁽²⁶⁾ El proceso es el siguiente: los receptores Toll-like (TLR) de la membrana del neutrófilo y el receptor del complemento C3 reconocen los estímulos activadores ⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾. La activación de PAD4 promueve la descondensación de la cromatina, se separan las membranas nucleares interna y externa y se forman vesículas con contenido de ADN y se aproximan junto con los gránulos del citosol hacia la membrana celular. Allí se libera el contenido de las vesículas sin producirse ruptura de la membrana celular. Se desconoce cómo se produce la liberación de estas vesículas pero lo que se ha comprobado es que los neutrófilos conservan su capacidad para migrar, fagocitar, producir oxidantes y matar a los patógenos ingeridos tras la formación de las NET ⁽²⁾ In vivo, se ha observado que en presencia de determinados ligandos de TLR o ciertas cepas bacterianas, se produce la interacción entre el antígeno-1 asociado a función de leucocito (LFA-1) de los neutrófilos y las plaquetas, lo que a su vez provoca este tipo de NETosis. ⁽³⁰⁾

Se ha descrito también otro tipo de NETosis vital en el que los neutrófilos liberan ADN mitocondrial, si bien éste último no ha sido bien estudiado y se desconoce si ejerce algún papel antimicrobiano ⁽³⁰⁾

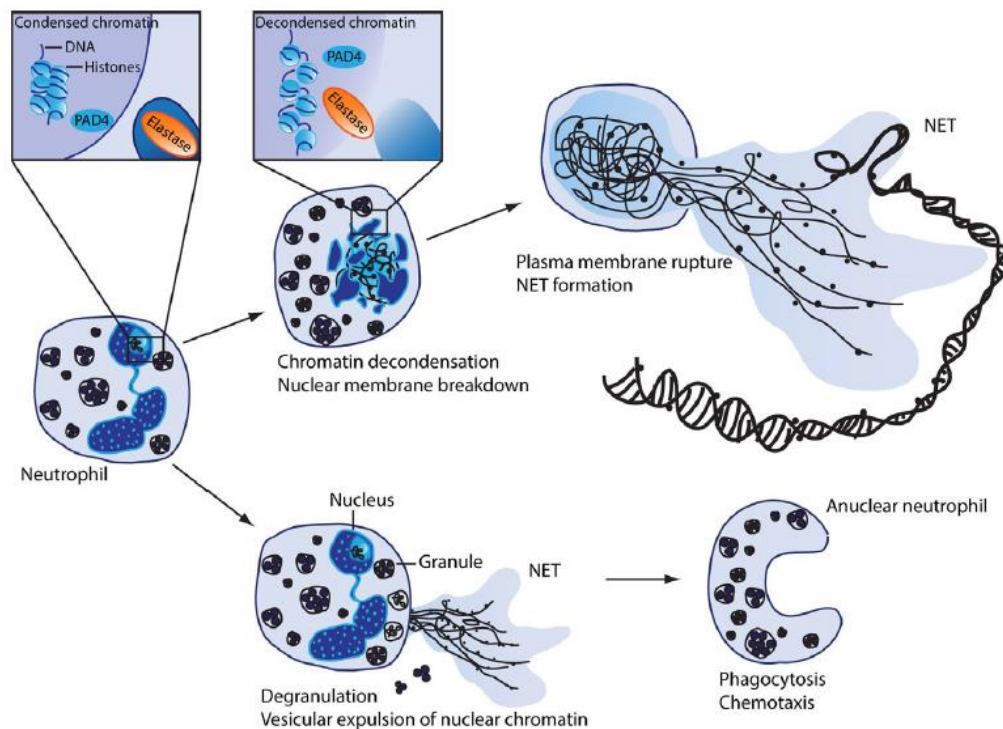


Figura 4. Proceso de la NETosis vital y suicida. European Journal of Clinical Investigation. 2018. ⁽²⁵⁾

FACTORES INDUCTORES DE NETS

Se han descrito diversos agentes biológicos y químicos capaces de inducir la formación de NETs por parte de los neutrófilos tanto *in vivo* como *in vitro*: bacterias Gram positivas y negativas ⁽¹¹⁾⁽³¹⁾⁽²⁶⁾, hongos ⁽³²⁾, parásitos ⁽³³⁾, virus ⁽³⁴⁾, protozoos ⁽⁷⁾, plaquetas activadas ⁽²⁹⁾, péptidos derivados del complemento ⁽³⁵⁾, autoanticuerpos ⁽¹⁵⁾, IL-8 ⁽¹¹⁾, peróxido de hidrógeno ⁽³¹⁾⁽³⁶⁾, cristales de urato ⁽³⁶⁾, humo de tabaco ⁽³⁷⁾, citocinas ⁽³⁸⁾ o colesterol ⁽³⁹⁾. El PMA es un estímulo efectivo para que los neutrófilos liberen NETs, pero de manera artificial. Este activa la NADPH oxidasa. Se ha observado que los neutrófilos de los neonatos son menos propensos a formar NETs en respuesta a diversos estímulos, lo que podría explicar la mayor predisposición de estos a sufrir infecciones. ⁽⁴⁰⁾

Una vez visto qué son las NETs, sus componentes y mecanismos de formación, pasamos a estudiar sus relaciones con distintas patologías.

PAPEL DE LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN PROCESOS INFECCIOSOS

Ya se ha comentado previamente que las NETs tienen capacidad antibacteriana. Directa, matando microorganismos e indirecta impidiendo la propagación de la infección. Entre sus componentes destacan las defensinas o catelicidinas, péptidos antibacterianos. ⁽⁴¹⁾

Las NETs son degradados por las **DNAsas**,⁽¹¹⁾ por lo tanto el potencial patógeno de las bacterias que las contienen es evidentemente mayor que el de las que carecen de ellas.⁽⁴²⁾⁽⁴³⁾ En ciertos casos, algún componente de las NETs en concreto resulta ser más decisivo que otro en la interacción con ciertos microorganismos. Un ejemplo es el caso de la infección por *S. aureus*, en la cual es vital la actuación de la MPO⁽⁴⁴⁾, o la lactoferrina y calgranulina, que intervienen en infecciones fúngicas, secuestrando iones y así restringiendo el crecimiento de los hongos.⁽⁴⁵⁾

A continuación comentaremos algunos microorganismos relacionados con la producción de NETs⁽²⁾.

STAPHYLOCCOCUS AUREUS

El *S.aureus* es una bacteria Gram positiva con una gran capacidad de supervivencia, ya que consigue evadir el sistema inmune y hacerse resistente a tratamientos con antibióticos.⁽⁴⁶⁾ Reside principalmente en el epitelio escamoso de la cavidad nasal. Es responsable de infecciones tales como osteomielitis, endocarditis o gastroenteritis. La bacteria es inductora de las NETs,⁽²⁵⁾ pero los convierte en desoxiadenosina con la ayuda de nucleasas y adenosina sintetasas propias, promoviendo la inactivación de las NETs liberando las trazas de DNA de las histonas.⁽⁴⁷⁾⁽⁴¹⁾⁽²⁾

STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

El *Streptococcus pneumoniae* reside normalmente en las vías respiratorias. Al igual que el anterior, el *S.pneumoniae* también escapa de las NETs.⁽²⁾ Se trata de una bacteria Gram positiva capaz de evadir la acción de las NETs cambiando su morfología de superficie creando una cápsula polisacárida y cambiando su carga eléctrica.⁽⁴⁵⁾⁽⁴⁸⁾ El *S. pneumoniae*, al ser atrapado por las trazas de ADN produce factores de virulencia como la **endonucleasa A (endA)**, encargada de romper los enlaces fosfodiéster de las cadenas de ADN, y así liberar la bacteria de las NETs, provocando una mayor reproducción y diseminación del microorganismo.⁽²⁾

ESCHERICHIA COLI

La *E.coli* es una bacteria Gram negativa que coloniza el tracto gastrointestinal. Es el microorganismo anaerobio facultativo más abundante en la microbiota humana. Es capaz de causar enteritis, infecciones urinarias, meningitis o sepsis. *Kambas et al.* observaron que este inducía la liberación de NETs cuando en el suero del paciente con shock séptico entraba en contacto con los neutrófilos, por activación de receptores del tipo Toll-like (TRL) o receptores del complemento para C3 o C5a.⁽⁴⁹⁾

HAEMOPHILUS INFLUENZAE

La infección por *H. influenzae* es inductora de la NETosis a través de los receptores Toll-like de los neutrófilos⁽⁷⁾, si bien la bacteria escapa del efecto de las NETs creando un **biofilm** lipooligosacárido y, de esta manera, escapan a la fagocitosis.⁽⁶⁾ Estos biofilms son películas de superficie que recubren la bacteria y que impiden su destrucción por parte de las células del sistema inmune y de los antibióticos.⁽⁵⁰⁾

CLOSTRIDIUM DIFFICILE

Es una bacteria que causa diarrea y colitis pseudomembranosa debido, normalmente, al uso previo de antibioterapia. El *C. difficile* forma parte de la microbiota de los humanos. Normalmente compete con otros microorganismos por el alimento como forma de prevención de su excesiva reproducción, pero cuando la microbiota se ve alterada y por tanto aumenta la disponibilidad de sus nutrientes, a la vez que disminuye la producción de ácidos biliares, el *Clostridium difficile* comienza a colonizar de forma patógena el intestino. Cuando el *Clostridium* llega al tejido linfático intestinal, estimula la producción de citocinas proinflamatorias tales como la IL-1 β , IL-8 y CXCL5, que inducen el reclutamiento de neutrófilos. ⁽⁵¹⁾⁽⁵²⁾

Los neutrófilos aquí tienen dos funciones: reducen el potencial microbiano de las toxinas de *Clostridium* secretando AMP y liberan NETs, que previenen la diseminación de la infección. ⁽⁵³⁾

YERSINIA SPP.

Es el agente causante de enteritis aguda y enterocolitis. Invade el epitelio y se traslada hasta las placas de Peyer. ⁽⁵⁴⁾ Se ha observado *in vitro* la capacidad de la *Yersinia enterocolitica* para inducir la liberación de NETs tras 1 hora de incubación, pero, al incrementar este tiempo, la inducción de NETs va disminuyendo. Esto podría ser debido a que las NETs finalmente son degradadas por los efectos de las nucleasas dependientes de calcio y magnesio. ⁽⁴⁸⁾

SALMONELLA TYPHIMURIUM

Se trata de una bacteria intracelular anaerobia facultativa. Coloniza el intestino, y allí infecta a los enterocitos, células dendríticas y macrófagos. Dentro de ellos se replica y expresa sus factores de virulencia (adhesinas, flagelo, fimbrias y T3SS). También es capaz de utilizar una superóxido dismutasa (**SodCI**), que contrarresta la acción de las ROS. ⁽⁵⁵⁾ No obstante, *Salmonella* favorece la activación de las NETs, quienes, a su vez, terminan por destruirla. ^{(56) (3)}

SHIGELLA FLEXNERI

La *S. flexneri* es una bacteria Gram negativa que se adquiere junto con alimentos en mal estado y llega a la luz intestinal, donde infecta las células del epitelio y se propaga. Las células infectadas, como respuesta, activan el factor nuclear kappa B (NF- κ B), produciendo IL-8, que actúa de señal activadora de neutrófilos. Allí la elastasa degrada los factores de virulencia bacterianos. ⁽⁵⁷⁾⁽⁵⁸⁾ *S. flexneri* es un Gram negativo cuya relación con los neutrófilos ha sido estudiada *in vitro* por *Brinkmann et al*, que sostienen que induce la formación de NETs y que estos actúan favorablemente en su degradación.

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

M. tuberculosis es un bacilo aerobio intracelular con gran capacidad de evasión del sistema inmune, causante de la tuberculosis. Utiliza el interior de los macrófagos para replicarse y diseminarse por el organismo. Induce la formación de NETs pero estos solo son capaces de dificultar su propagación, no eliminarlo. ⁽⁵⁹⁾ El *Mycobacterium* estimula

la apoptosis de neutrófilos en un intento por frenar la creación de granulomas, responsables de la infección primaria tuberculosa, los cuales contienen al bacilo. ⁽⁶⁰⁾

VIBRIO CHOLERAE

Este es otro ejemplo de bacteria capaz de estimular a las NETs pero salir ilesa de sus efectos. Se trata de un Gram negativo que se encuentra en ecosistemas acuáticos y que llega al intestino a través de agua o pescado contaminados. ⁽⁶¹⁾ Allí secreta toxinas, adhesinas, hemaglutininas, proteasas y hemolisinas, e induce la producción de citocinas y la activación de los neutrófilos. Estos expulsan NETs, pero las nucleasas Dns y Xds del *V. cholerae* inhiben su acción. ⁽⁶²⁾

DENGUE

Es interesante estudiar la relación de este virus con la NETosis, ya que todavía no se ha llegado a un consenso sobre esta. El Dengue es un virus ARN de la familia *Flaviviridae*. Es capaz de generar en el organismo infectado desde febrícula hasta la llamada fiebre hemorrágica. Se ha observado *in vitro* la capacidad de las NETs de atrapar y frenar al virus, pero, por otro lado, se ha objetivado la inhibición de las NETs por parte de este. *Moreno-Altamirano et al* realizaron la siguiente comprobación: estimularon neutrófilos con PMA para que llevaran a cabo la NETosis. Después cultivaron esas NETs junto con el virus *DENV-2*, y el resultado fue una reducción de los mismos del 80%. Observaron que el virus del Dengue inhibía la absorción de glucosa por parte de los neutrófilos, elemento que estos necesitan para llevar a cabo su función. De esta forma el virus utiliza una vía metabólica para frenar la formación de NETs. ⁽⁶⁰⁾ ⁽⁶³⁾ La relación del virus del Dengue con los neutrófilos y la NETosis es todavía objeto de estudio. ⁽²⁾

LACTOBACILLUS RHAMNOSUS

El *Lactobacillus rhamnosus* es un probiótico Gram positivo capaz de restaurar la barrera intestinal, con lo cual resulta beneficioso en patologías como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. ⁽⁶⁴⁾ ⁽⁶⁵⁾ Es capaz de unirse al epitelio intestinal y hacerlo resistente a la bilis y a ácido gástrico.

Está comprobado que el *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibe la producción de NETs inducidos por otras bacterias como *E. coli* o *S.aureus*. La causa más probable es su acción antioxidante y a las proteínas que secretan que todavía están por estudiar. ⁽⁶⁶⁾

VIRUS INFLUENZA

En concreto, el virus Influenza A, causante de la famosa **gripe A** es capaz de inducir el reclutamiento de neutrófilos en los pulmones, y por lo tanto, este virus es también inductor de la formación de NETs. En este caso, la α -defensina-1 asociada con las NETs es la que inhibe la replicación del virus bloqueando la vía de la proteína quinasa C (PKC). Las histonas H3 y H4 ricas en arginina son claves para la neutralización del virus. ⁽²⁾

El virus influenza estimula a su vez otro elemento, el LL37, responsable de aumentar la producción de NETs por parte de los neutrófilos *in vitro* ⁽⁶⁷⁾.

El efecto de recluir tal cantidad (excesiva) de neutrófilos en el pulmón resulta en un daño de los tejidos a nivel local por infiltración de NETs en los capilares de los alveolos mediado por AMPs (Péptido Anti Microbiano).

VIH

Este virus representa un ejemplo de inducción de la producción de NETs pero sin éxito, ya que el VIH escapa finalmente infectando el organismo. Los neutrófilos reconocen la señal activadora del VIH a través de los receptores TLR7 y TLR8, liberan especies reactivas de oxígeno (**ROS**) para la formación de NETs. Estos atrapan al virus y lo intentan eliminar, pero sale finalmente airoso al inducir, por vía de la lectina tipo C y el CD 209, la producción de IL-10, que inhibe a las especies reactivas de oxígeno y por lo tanto la liberación de las NETs. ⁽³⁴⁾

VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL

El virus respiratorio sincital (VRS) es el causante de una de las infecciones pediátricas más importantes. Es el causante de una importante infección respiratoria, en la que entran en juego células epiteliales, macrófagos, fibrina, células dendríticas... La relación de este virus con las NETs ha sido estudiada *in vitro* al cultivar muestras de lavado broncoalveolar de pacientes infectados por el virus junto con neutrófilos. El VRS activa a los neutrófilos y estos a su vez llevan a cabo la NETosis en un intento por acabar con la infección, que no llevan del todo a cabo. Las NETs son capaces de prevenir la diseminación viral pero no de matar al patógeno. Incluso podrían resultar perjudiciales ya que son capaces de agravar la clínica formando estructuras de moco y ADN que ocluyen el tracto respiratorio. ^{(68) (69) (60)}

CANDIDA ALBICANS

En situaciones de inmunodeficiencia, cuando se suelen producir las infecciones por *Candida*, las células epiteliales y los macrófagos la reconocen y responden liberando quimiocinas que activan neutrófilos. ^{(70) (71)} Estos producen NETs como mecanismo de defensa para eliminar el hongo ya sea en forma de levadura o hifa. ⁽⁷²⁾ De hecho, los neutrófilos son capaces de calcular la medida del hongo, diferenciando entre su forma de hifa o levadura, para así producir una mayor o menor cantidad de NETs. Para que sea más rápida la respuesta neutrofílica, debe ser reconocido el β -glucano de las hifas por el receptor del complemento 3 y estar presente la fibronectina, que forma parte de la matriz extracelular. ^{(28) (41)}

TRYPANOSOMA CRUZI

El *Trypanosoma cruzi* es el parásito causante de la enfermedad de **Chagas**, una enfermedad tropical causante de miocardiopatía y vasculopatía. La primera respuesta del organismo contra la invasión tripanosómica es la innata: macrófagos, eosinófilos, monocitos y neutrófilos actúan intentando frenar la infección al reconocer al parásito a través de receptores Toll-like (TLR). *Sousa-Rocha et al.* ⁽⁷⁾ llevaron a cabo un estudio en ratones para evaluar si *Trypanosoma* estimula la NETosis y si el parásito una vez atrapado en las NETs muere o simplemente es inmovilizado. Para ello, un grupo de ratones fue infectado con *T. cruzi* previamente expuesto a NETs y otro sólo con *T. cruzi*, sin ser tratado con NETs. Ambos grupos fueron monitorizados. Se observó en los dos

grupos un incremento inicial de la parasitemia para descender posteriormente, si bien el grupo de ratones infectado con el parásito pretratado con NETs mostraba niveles de parasitemia más bajos que el grupo control. Este hallazgo sugiere que los parásitos en contacto con las NETs sufren una pérdida de virulencia, capacidad de invasión y replicación, posiblemente gracias a componentes de las NETs como elastasa, catepsina D, histonas o mieloperoxidasa, degradadores de factores de virulencia.

El glucosilfosfatidilinositol de la membrana de los tripomastigotes es capaz de estimular el TLR-2 (receptor Toll-like transmembrana de los neutrófilos) y así inducir la síntesis de citotinas proinflamatorias como el TNF o la IL-2.

Otro hallazgo interesante de este grupo de investigadores fue la presencia de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en el proceso de formación de NETs al ser infectado un organismo por *T. cruzi*.

La conclusión del estudio es que la infección por *Trypanosoma cruzi* induce la liberación de NETs gracias a la señal activadora de los receptores Toll-like de la membrana de los neutrófilos, y esto afecta al parásito reduciendo su virulencia y patogenicidad sin afectar a su viabilidad.

PAPEL DE LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Se ha comprobado la presencia de NETs en numerosas enfermedades en las que existe un elevado y patológico estado de inflamación, como es el caso de las enfermedades autoinmunes.⁽⁷³⁾ En dichas situaciones existen evidencias que indican que las NETs ejercen un papel perjudicial. En ellas existe una respuesta anormal por parte del sistema inmune contra el propio organismo.⁽⁷⁴⁾ Pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES), artritis reumatoide (AR) y vasculitis asociadas con anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos (ANCA) desarrollan toda una serie de **autoanticuerpos** que son capaces de reconocer a las estructuras de las que se componen las NETs, ya que varias de las moléculas de las que se forman las NETs resultan ser autoantígenos en enfermedades autoinmunes.⁽⁷⁵⁾ Se ha planteado la excesiva producción de NETs, la exposición prolongada a ellos o falta de eliminación como posible factor desencadenante de la respuesta autoinmune en pacientes propensos.⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁶⁾

LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO (LES)

En la enfermedad del lupus, los autoanticuerpos (contra antígenos nucleares como el ADN, histonas y gránulos de los neutrófilos)⁽⁴¹⁾ forman inmunocomplejos que se depositan en la piel, riñón, pulmón, pleura, corazón, etc. En un estudio realizado en pacientes con nefritis lúpica se objetivó que aquellos con nefritis de tipo IV presentaban mayor cantidad de NETs en el glomérulo que los de tipo III.⁽⁷⁷⁾ Otros investigadores determinaron que el suero de pacientes con LES no era capaz de degradar las NETs⁽⁷⁸⁾,

ya que en él se encontraron anticuerpos inhibidores de las DNAsas, y otro tipo de anticuerpos ligados al ADN que evitaban su degradación.⁽⁷⁹⁾

Más del 70% de los componentes de las NETs resultan ser autoantígenos para el LES y otras enfermedades autoinmunes.⁽⁴⁵⁾ Las NETs, inducidos por estímulos autoinmunes en el contexto del LES, activan células dendríticas a través de la vía de los receptores TLR9 y TLR7, que terminan expresando el IFN tipo I, lo cual conduce a una mayor actividad de la enfermedad.^{(80) (76)} Tras la activación de estas células dendríticas por las NETs, se observó que al ser inyectadas en ratones, se formaban anticuerpos específicos de neutrófilos y aparecía daño renal.⁽⁸¹⁾ Las NETs activan las células dendríticas gracias a la asociación del ADN con el péptido antimicrobiano LL-37. Existe un feedback entre las NETs y el TNF I que explica cómo las NETs exacerban la patología autoinmune.⁽⁸²⁾ Las NETs podrían, a su vez, activar el complemento, intensificando así la patogenia de la enfermedad.⁽⁷⁸⁾

También se han observado elevados niveles de ADN citrulinado en pacientes con LES y la presencia de anticuerpos contra las proteínas de las NETs.⁽⁸³⁾ En definitiva, todos estos estudios evidencian la relación entre el incremento de síntesis de NETs con la mayor actividad de la enfermedad, teniendo los pacientes con LES menor capacidad para eliminar estos productos de los neutrófilos.⁽⁴⁾ Podría ser debido a que las NETs promueven la formación de autoanticuerpos en pacientes con LES.⁽⁷⁶⁾

Estudios realizados por *Hakkim et al*⁽⁸⁴⁾ sugirieron la importancia de la DNasa I en la eliminación de las NETs. Analizaron suero de pacientes con lupus, observando que un numeroso grupo de sujetos tenía reducida la capacidad de degradación de los mismos. Los clasificaron como “degradadores” y “no degradadores”. En el suero de aquellos “no degradadores” había niveles mayores de NETs y de anticuerpos anti dsDNA (anti ADN bicatenario) en comparación con el grupo de “degradadores”. Al mismo tiempo se comprobó que la mayor capacidad de degradación del material genético coincidía con periodos de remisión, y, al contrario, cuando menos se degradaban las NETs era en momentos de brotes.⁽⁷⁴⁾

En resumen, todos estos datos de estudios relacionan claramente el proceso de NETosis con el LES, y la menor degradación de las NETs con la severidad o brote de la enfermedad.

ARTRITIS REUMATOIDE (AR)

Esta enfermedad autoinmune se caracteriza por provocar una inflamación sinovial de las articulaciones y a su vez afectar a diversos órganos por infiltración celular y degradación de colágeno.⁽⁸⁵⁾ La sobreproducción de sustancias proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF) o la IL-6 contribuyen a perpetuar el estado de inflamación.

En el líquido sinovial de estos pacientes encontramos autoanticuerpos que sirven como diagnóstico: factor reumatoide (**FR**) y anticuerpos anti-péptidos citrulinados cíclico (**Ac**

anti-CCP). Tal y como se han mencionado anteriormente, la citrulinización es la conversión enzimática de la arginina a citrulina, lo cual podría afectar a la antigenicidad de las proteínas. Como ya hemos comentado, el proceso de citrulinización es clave en la formación de las NETs, por lo tanto resulta interesante estudiar la relación entre las NETs y la artritis reumatoide.

A la hora de estudiar la relación entre la AR y la NETosis, se llegó a varias conclusiones tras observarse diversos hallazgos. Los neutrófilos presentes tanto en el líquido sinovial como en el torrente sanguíneo de pacientes con dicha enfermedad tendían más a la liberación de NETs que los de sujetos sanos. A su vez se comprobó que existían cúmulos de NETs en tejidos sinoviales, en la piel y en los nódulos que caracterizan a la AR. También objetivó que las NETs poseían la metaloproteasa-8 de la matriz (MMP-8), implicada en la destrucción tisular en la artritis reumatoide. Estos pacientes poseen niveles altos de IL17a y de TNF- α , los cuales actúan como inductores de los neutrófilos en la formación de NETs. Estos últimos activan los fibroblastos de las sinoviales para que produzcan IL6, IL8, quimiocinas y moléculas de adhesión, contribuyendo así a la inflamación crónica.

La conclusión de todo esto reside en que las NETs, al contener proteínas citrulinadas que actúan como autoantígenos en la artritis reumatoide, sirven de sustrato para autoanticuerpos como el anti-CCP, perpetuando así una aberrante respuesta autoinmune que resulta en la cronicidad del estado de inflamación.⁽⁷⁴⁾

VASCULITIS

Dentro del grupo de las **vasculitis de pequeño vaso** encontramos tres enfermedades diferenciadas: la granulomatosis de Wegener, el síndrome de Churg-Strauss y la poliangeítis microscópica (PAM).⁽⁸⁶⁾ El Wegener y el Churg-Strauss se diferencian por la presencia de asma y eosinofilia en el primero. En las vasculitis de pequeño vaso hay una inflamación crónica necrotizante de los mismos en pulmones, piel o riñones. Los pacientes desarrollan **ANCA**s (anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo) que reaccionan contra el PR3 (asociado con la vasculitis granulomatosa de Wegener) o la MPO (en relación con la poliangeítis), componentes de las NETs. Estos ANCA estimulan la NETosis uniéndose a la MPO y al PR3, y activan a las células dendríticas.⁽¹⁵⁾ Como resultado, en la sangre y en biopsias renales de dichos pacientes podemos encontrar material derivado de las NETs (histonas, ADN y proteínas granulares)⁽⁸⁷⁾ ⁽¹⁵⁾. Otros componentes de las NETs que actúan como antígenos de los ANCA son la lactoferrina, la elastasa o la catepsina G.⁽⁷⁴⁾

Se llevó a cabo un estudio⁽¹⁵⁾ en el que se examinaba si los neutrófilos activados por los ANCA eran capaces de liberar NETs. Los autores concluyeron que los complejos MPO-DNA presentes en el suero de estos pacientes, especialmente en aquellos con enfermedad activa, provenían, al menos parcialmente, de la NETosis sufrida por neutrófilos. Confirmaron también hallazgos previos que sugerían la presencia de nucleosomas (histonas y ADN) en pacientes con vasculitis asociadas a ANCA.⁽⁷⁴⁾

Se comprobó que el tratamiento con DNAsas era efectivo inhibiendo la liberación de NETs y disminuyendo la inflamación vascular.⁽⁸¹⁾

Existe una interesante relación entre las vasculitis de pequeño vaso y los eventos tromboembólicos, y las NETs parecen ser el nexo entre ellas. Los pacientes con esta clase de vasculitis tienen tendencia a sufrir enfermedad tromboembólica.⁽⁸⁸⁾ Las NETs serían los responsables de la unión entre plaquetas y factores procoagulantes, provocando así un trombo. Los neutrófilos de pacientes con vasculitis de pequeño vaso, tal y como ha sido comprobado, liberan NETs y factor tisular, lo cual contribuye al inicio de la cascada de la coagulación. En el análisis de muestras de sangre de este tipo de pacientes se evidenció la presencia de partículas derivadas de neutrófilos, entre ellas factor tisular y ADN.⁽⁸⁹⁾

Esta relación entre las vasculitis, las NETs y la trombosis ha sido planteada y estudiada tras diversos hallazgos que las correlacionaban. En autopsias de pacientes con poliangeitis microscópica (PAM) complicada con trombosis venosa profunda, se evidenció la presencia de infiltrados neutrofílicos presentes en hemorragia alveolar y severa glomerulonefritis. Las NETs abundaban tanto en el riñón como en los trombos, cuya cantidad era mucho mayor que en aquellas autopsias de pacientes con trombosis pero sin PAM.⁽⁹⁰⁾

PAPEL DE LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN ENFERMEDADES DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS

La NETosis también está implicada en el desarrollo de complicaciones de enfermedades respiratorias debido a las infecciones secundarias que ocurren en estas. En enfermedades crónicas propensas a la infección secundaria existe un excesivo reclutamiento de neutrófilos, lo que favorece la NETosis y con ella el daño en la microcirculación de los alveolos. Por tanto, una mayor cantidad permanente de ADN extracelular presente en la vía respiratoria resulta en una obstrucción de la misma y en la perpetuación de la inflamación crónica.⁽²⁾

Las NETs también forman parte de enfermedades respiratorias que cursan con inflamación tales como **asma** o **EPOC**. *Wright et al*⁽⁹¹⁾ estudiaron la presencia de NETosis en ellas, observando cúmulos de ADN en la vía aérea de pacientes con asma y EPOC y concluyeron que estos hallazgos tenían relación con la neutrofilia de las vías, la gravedad del asma, el empeoramiento de la función respiratoria y la clínica. Las NETs resultan tóxicas a las células del endotelio y el epitelio respiratorio⁽⁹²⁾ y por lo tanto contribuyen a la exacerbación de la clínica y los efectos de estas enfermedades. En el citado estudio se objetivó la presencia de trazas de ADN y proteínas granulares tales como la LL-37, α -defensinas 1-3 y elastasa nuclear en este tipo de pacientes, en concreto en los que presentaban niveles mayores de neutrofilia.

La duda aquí subyace en si la cantidad anormal de NETs y sus componentes son factores que estimulan la aparición de asma y EPOC (causa) o si por el contrario suponen el resultado (consecuencia) de estas enfermedades. Deberá ser investigado con mayor profundidad.⁽⁹¹⁾

Por otra parte, las NETs han sido igualmente relacionadas con el síndrome de distrés respiratorio del adulto y el daño pulmonar agudo. En estas enfermedades hay un daño en las células epiteliales que aumenta la permeabilidad de la barrera entre los alvéolos y los vasos sanguíneos. Las células epiteliales secretan IL-8, lo cual promueve el paso de neutrófilos desde los vasos hasta el alvéolo edematizado por la inflamación. Una vez en el alvéolo, los neutrófilos sufren NETosis, cuyos componentes contribuyen, en un sistema de feedback positivo, a incrementar el daño tisular, perpetuando la inflamación crónica alveolar. Entre las acciones de los citados componentes de las NETs se encuentran: la elastasa neutrofílica (NE), que se adhiere al citoesqueleto de actina del endotelio e induce la apoptosis de las células epiteliales y la liberación de citocinas proinflamatorias; la E-cadherina y la VE-cadherina, que aumentan la permeabilidad de la barrera alvéolo capilar; el péptido LL-37, citotóxico y proapoptótico para las células endoteliales; y ROS producido por la MPO, que causa también daño epitelial que resulta finalmente en apoptosis o necrosis. ⁽⁴⁵⁾⁽⁹²⁾

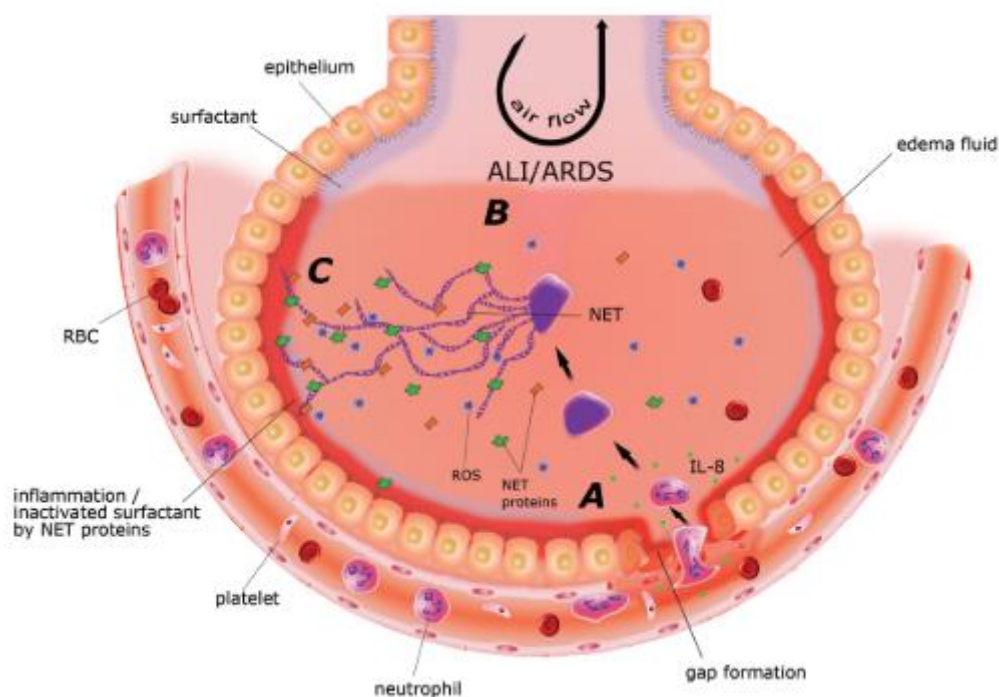


Figura 5. Patogenia del síndrome de distrés respiratorio y del daño pulmonar agudo. J Clin Invest. 2004; 144 (12): 1693-6⁽⁴⁵⁾

Dentro del apartado de enfermedades respiratorias en relación con las NETs, no podemos dejar de mencionar la **fibrosis quística**. La fibrosis quística consiste en una mutación en el gen que regula el transportador de Na^+/Cl^- , localizado en las células

epiteliales, causando deshidratación y, por lo tanto, aumento de la viscosidad de las secreciones mucosas, dificultando su expulsión de la vía aérea. ⁽⁹³⁾

Otro factor que favorece la alta viscosidad del moco es la presencia de ADN en el esputo de los pacientes con esta patología, que, según *Marcos et al* se relaciona con el cúmulo de neutrófilos y NETs en los pulmones. La alta viscosidad resulta ser un factor muy favorable para los microorganismos, que invaden las vías respiratorias de estos pacientes con más frecuencia y virulencia que las de los pacientes sanos. Estas infecciones crónicas víricas y bacterianas (*S. aureus*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*) perpetúan en el tiempo un estado de inflamación neutrofílica. Además, la producción de NETs en estos pacientes no cumple enteramente su función antibacteriana debido al bajo nivel de proteínas del surfactante en dicha capa que se aprecia en este tipo de pacientes. ⁽⁴⁵⁾

La cantidad de ADN extracelular está directamente relacionada con el empeoramiento de la función pulmonar. ⁽⁹¹⁾ Se ha comprobado que cuanto menor es el nivel de surfactante (hecho frecuente en enfermedades pulmonares) menor es también la eliminación de las NETs. ⁽⁹³⁾

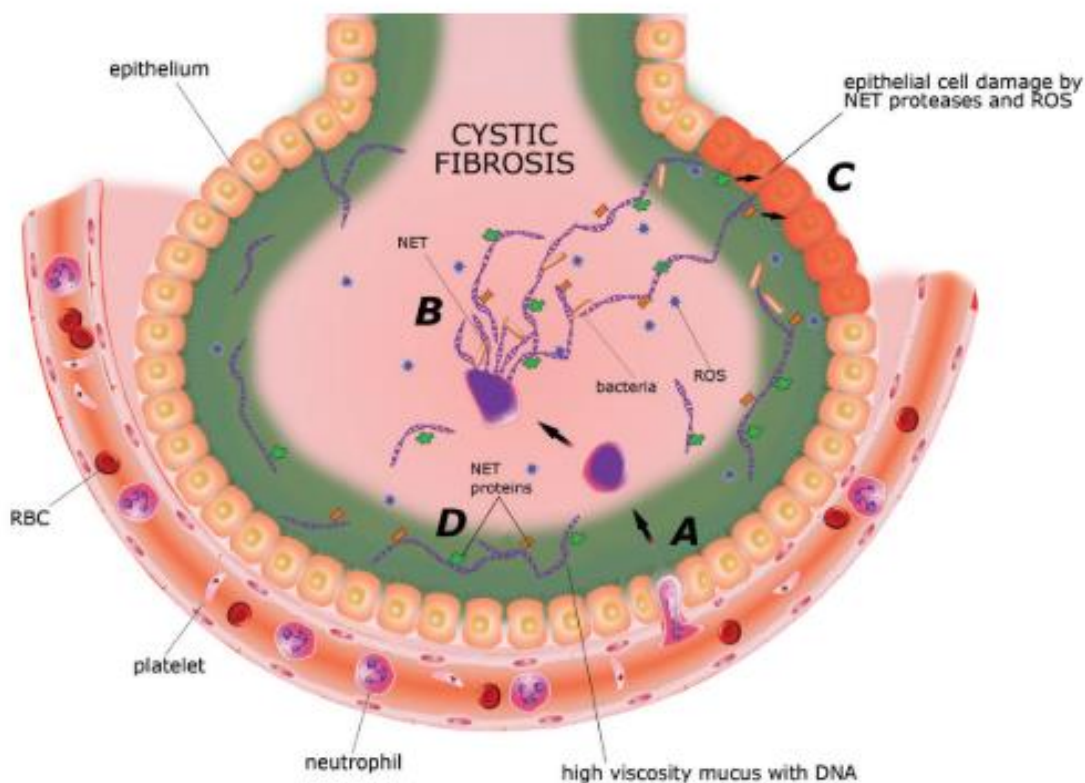


Figura 6. Patogenia de la fibrosis quística. Acta Biochim Pol. 2013;60(3):277-84⁽⁴⁵⁾

PAPEL DE LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN LA ENFERMEDAD TROMBÓTICA

NETS Y ATEROSCLEROSIS

Las NETs inducen la activación plaquetaria, la coagulación y la formación de trombos.⁽⁵⁾ La relación de la NETosis con la enfermedad aterotrombótica se empezó a estudiar a raíz de la observación de NETs en el lumen de arterias con lesiones ateroscleróticas de ratones y humanos.⁽¹²⁾ En esta enfermedad se forman placas de ateroma en las arterias compuestas principalmente por lípidos. Estas lesiones pueden llegar a romperse favoreciendo cuadros isquémicos.⁽⁹⁴⁾ Está comprobado que el ADN extracelular (las NETs, por ejemplo) posee efectos citotóxicos y protrombóticos, pudiendo constituir la causa que une la inflamación con la coagulación.⁽¹²⁾ Se ha observado que las NETs inducen la disfunción del endotelio activando y dañando las células endoteliales.⁽⁹⁵⁾ Las trazas de ADN y los gránulos proteicos neutrofílicos estimulan las células dendríticas en la pared del vaso, induciendo la respuesta del interferón tipo 1 y obteniendo como resultado la aterogénesis.⁽⁹⁶⁾

Las histonas de las NETs son importantes actores en el proceso de trombosis (procoagulantes), ya que inducen la liberación de factor tisular (TF) y disregulación de la trombomodulina.⁽⁷³⁾

NETS, ATEROTROMBOSIS E INFARTO DE MIOCARDIO

La inmunotrombosis ha sido reconocida como un proceso de coagulación en el que la inmunidad innata juega un papel importante y su disregulación originaría toda una serie de disfunciones trombóticas.⁽⁷³⁾ Los neutrófilos forman parte de los trombos, y su recuento podría predecir accidentes cardiovasculares.⁽⁹⁷⁾ Numerosos estudios se han llevado a cabo intentando investigar la relación de los neutrófilos y la NETosis con los accidentes cardiovasculares, obteniendo como conclusión que la interacción de plaquetas activadas con neutrófilos en los lugares de ruptura de placas de ateroma durante un infarto agudo de miocardio resulta en la formación de NETs y la activación del factor tisular, favoreciendo la formación de nuevos trombos.⁽⁸⁹⁾ Se ha comprobado que el contacto de neutrófilos con cristales de colesterol induce la producción de NETs.⁽³⁹⁾

La patogenia de la **aterotrombosis** comienza con el daño endotelial. El endotelio activado favorece la liberación de NETs por parte de los neutrófilos, que a su vez continúan dañándolo en un círculo vicioso (las NETs externalizan una proteasa proangiogénica, la MMP-9, que induce la secreción de MMP-2 en las células endoteliales, contribuyendo al daño endotelial).⁽⁴⁾ Al lugar del daño endotelial acuden lipoproteínas, que junto con monocitos se acumulan en la capa subendotelial. Estos últimos se diferencian a macrófagos y fagocitan lipoproteínas y colesterol, formando acúmulos espumosos que van construyendo la placa de ateroma. Poco a poco va creciendo y obstruyendo el flujo, pudiendo llegar a romperse, generando hipoxia y daño tisular.⁽⁴¹⁾

NETS Y TROMBOSIS VENOSA

La trombosis venosa profunda es una enfermedad que puede complicarse con un embolismo pulmonar y llegar a originar cuadros de isquemia. En la patogenia está presente la **triada de Virchow**: estasis (disminución del flujo vascular), daño endotelial e hipercoagulabilidad.⁽⁹⁸⁾ La reducción del flujo sanguíneo resulta en una hipoxia tisular, que a su vez sirve como estímulo inductor de la activación del endotelio de las venas. Este libera el factor von Willebrand, que regula la P-selectina. A su vez, plaquetas y neutrófilos son activados y reclutados, y las plaquetas estimulan también la generación de NETs por parte de los neutrófilos. Estas trazas de ADN forman agregados junto a plaquetas y eritrocitos, contribuyendo a la formación y estabilización del trombo. Se han propuesto los neutrófilos situados en los trombos como pieza fundamental de la propagación de la trombosis venosa profunda uniéndose al factor XII y fomentando su activación a través de la NETosis. Las DNAsas como tratamiento sirven para disolver el trombo, al igual que lo hace la heparina, rompiendo la unión de las histonas y la cromatina.⁽⁹⁹⁾⁽⁴¹⁾

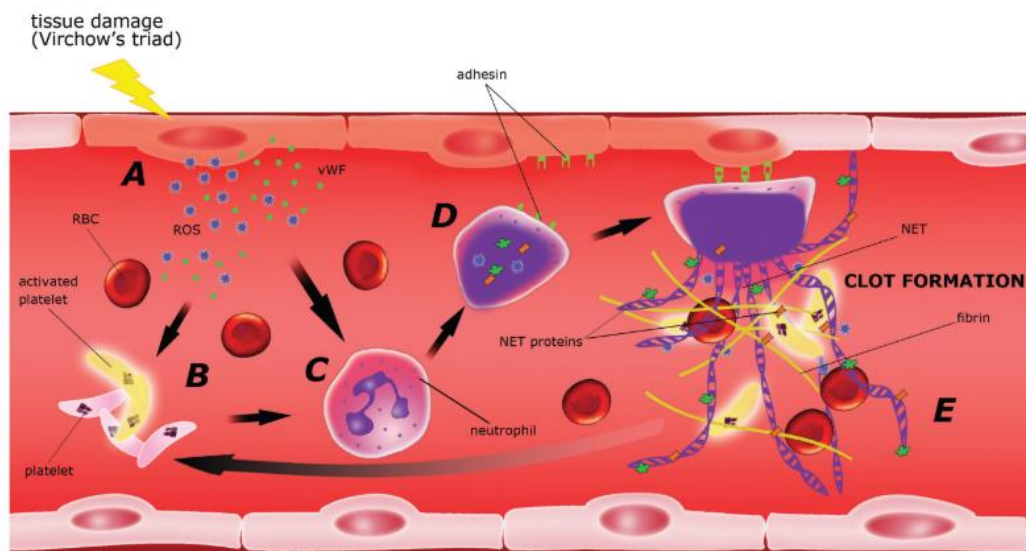


Figura 7. Proceso de formación de trombosis venosa. J Clin Invest. 2004;114 (12): 1693-6⁽⁴⁵⁾

Otro componente presente en la interacción de los neutrófilos y las plaquetas es la β -defensina-humana 1, un componente plaquetario antimicrobiano que actúa como inductor de la NETosis y por lo tanto perpetuando la trombosis y el daño tisular.⁽⁶⁾⁽²⁹⁾

La trombosis también puede originarse por el estímulo de la liberación de factor tisular (FT) y citocinas producidos durante procesos inflamatorios en relación con infecciones, enfermedades autoinmunes y cáncer.⁽¹⁰⁰⁾ El factor tisular se une al factor VII formando el complejo FT-FVIIa, capaz de activar la cascada de la coagulación y de formar un trombo.⁽¹⁰¹⁾ La evidencia de la relación entre inflamación y trombosis podría residir en

las NETs, ya que, según estudios, el factor tisular podría ser producido por los neutrófilos y liberado a los vasos durante la NETosis (por ejemplo en procesos inflamatorios).⁽¹⁰²⁾

Las NETs, gracias al ADN y las histonas también se unen al factor XII, estimulando la formación de fibrina a través de la vía intrínseca de la coagulación.⁽¹⁰²⁾

Se han realizado estudios en ratones en los que ha quedado evidenciado que aquellos con neutropenia no desarrollaban trombos o estos eran mucho más pequeños en comparación con los ratones controles (no neutropénicos).⁽¹⁰²⁾ Esto apoya claramente la tesis de que existe una relación directa entre la hipoxia endotelial, los neutrófilos (y las NETs) y la aparición de trombosis venosa.

Engelmann et al⁽¹⁰³⁾ proponen la formación de microtrombos en vasos pequeños como una herramienta del sistema inmune para eliminar microorganismos o al menos evitar su extensión a zonas vecinas a través de las NETs. Dado que este tipo de trombosis se limita a un pequeño porcentaje de microvasos, la función del conjunto del órgano queda preservada.⁽⁴¹⁾

A su vez, las NETs servirían como **biomarcadores** de la enfermedad, prediciendo la gravedad de la aterosclerosis y el riesgo de accidentes cardiovasculares futuros.⁽¹⁰⁴⁾

PAPEL DE LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN EL CÁNCER

Numerosos han sido los estudios en los que se ha investigado la relación de las NETs con el cáncer, demostrando que tienen una función protumoral y capacidad de incrementar la diseminación metastásica. Parece ser que existen diversos tipos de estímulos de NETs en el cáncer. G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos), citocinas tumorales como la IL-8, estados de hipoxia (zonas o tejidos menos oxigenados), la exposición de neutrófilos al plasma o a plaquetas de individuos con tumores.⁽¹⁰⁵⁾ A continuación vamos a exponer algunos ejemplos de relaciones demostradas de las NETs con diversos tumores.

En ensayos en ratones con cáncer se observó que cuando las NETs eran estimuladas por una infección bacteriana y circulaban por la sangre, estas facilitaban la diseminación de metástasis en hígado y pulmón, pues las trazas de ADN atrapaban a las células cancerígenas pero no eran capaces de eliminarlas. La presencia de NETs en el compartimento intravascular aumenta la permeabilidad, lo cual dota a las células metastáticas de capacidad para extravasarse y asentar en diversos tejidos.⁽¹⁰⁶⁾

En tumores pulmonares, los NETs son capaces de atrapar células neoplásicas a través de la expresión de la β -1 integrina y diseminarlas generando metástasis.

Otro estudio ha demostrado que en pacientes con cáncer colorrectal los niveles de NETs en suero son más altos que en los controles sanos.⁽¹⁰⁷⁾

Se observó ADN extracelular en la superficie de células pancreáticas cancerígenas, lo cual aumentaba la síntesis de CXCL8, un factor quimiotáctico mediador de la respuesta inflamatoria y facilitador de la angiogénesis. Al reducir los niveles de ADN extracelular lo hacía también la CXCL8, reduciendo así la inflamación y la diseminación de células metastásicas. ⁽¹⁰⁶⁾

Las NETs, como hemos explicado anteriormente, tienen efectos procoagulantes y activadores de plaquetas, induciendo trombosis. Se comprobó que pacientes con cáncer gástrico eran más propensos a llevar a cabo NETosis que los controles sanos, y que existía una correlación entre el nivel de NETs y el estado de hipercoagulabilidad del paciente. ⁽¹⁰⁵⁾ Otro estudio demostró que las NETs alteraban la vascularización de órganos previamente sanos en pacientes con cáncer y provocaban inflamación renal. Al ser tratados con DNasa I, mejoraban estos dos aspectos. Se cree que las NETs podrían estar relacionadas con la insuficiencia renal y fallos orgánicos que sufren muchos de los pacientes oncológicos. ⁽¹⁰⁵⁾

Una vez más, las NETs constituyen un interesante marcador pronóstico de la enfermedad y una diana terapéutica.

MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE NETS. LAS NETS COMO BIOMARCADORES DE ENFERMEDAD.

Como hemos descrito anteriormente, aunque las NETs desempeñan un papel esencial en la eliminación de microorganismos, la excesiva formación de NETs, se ha visto implicada en una gran variedad de patologías, por lo que se ha sugerido que su determinación podría ser útil para establecer el pronóstico o incluso ayudar al diagnóstico de dichas enfermedades. Es por tanto prioritario el desarrollo de técnicas de detección y cuantificación de NETs que puedan ser aplicados en la práctica clínica. Se han desarrollado diversos métodos para la detección y cuantificación de NETs, sin que ninguno resulte ser el gold standard hasta el momento. ⁽¹⁰⁸⁾ ⁽¹⁰⁹⁾. Marcadores de NETosis:

- Co-localización de proteínas derivadas de neutrófilos y ADN extracelular. El método más generalizado para la detección de NETs *in vitro* es la observación microscópica de los neutrófilos después de realizar una tinción inmunohistoquímica de proteínas derivadas del neutrófilo como la MPO o la proteinasa-3 y tinción simultánea de ADN extracelular. La co-localización de estos dos componentes sugiere la presencia de NETs. Mediante este método se ha demostrado la presencia de NETs a nivel tisular. Así, por ejemplo, se han encontrado NETs en los glomérulos y a nivel de trombos en pacientes con vasculitis asociadas a ANCA. ⁽¹¹⁰⁾ Aunque es un método sencillo de realizar, su principal inconveniente es la falta de objetividad, ya que es el operador el que debe evaluar si estos componentes se encuentran a nivel intra o extracelular. Otro inconveniente es la dificultad para cuantificar las NETs. A este respecto, *Rebernick et al* ⁽¹¹¹⁾ han desarrollado recientemente un programa para

cuantificar los NETs a partir de imágenes de microscopía de fluorescencia de neutrófilos teñidos con Sytox. Este método que denominan **DANA** (DNA Area and NETosis Analysis), opera mediante dos componentes, Image J y Java. Utilizando este sistema los investigadores detectaron una mayor cantidad de NETs y mayor área de ADN en neutrófilos de sujetos con artritis reumatoide que en un grupo control. **NETQUANT** es otro método automatizado para cuantificar NETs a partir de imágenes de fluorescencia ⁽¹¹²⁾ que caracteriza a estos en función de 3 parámetros biológicos como el área celular, la deformación del ADN y el ratio ADN/NET.

- Histonas citrulinadas. Dado que la presencia de histonas citrulinadas por vía de la PAD4 es necesaria para la descondensación de la cromatina y consiguiente formación de NETs, la detección de estas constituiría otro posible marcador de NETosis. Esta se ha llevado a cabo tanto *in vitro* como *in vivo*. La detección mediante tinción inmunohistoquímica (NE y cH3) y de ADN ha permitido identificar NETs en aspirados bronquiales de pacientes con infección respiratoria aguda intubados en una unidad de cuidados intensivos⁽¹¹³⁾. De todas formas, este método plantea los mismos problemas tanto de objetividad como de cuantificación que el anterior.
- Restos de NETs:
 - o ADN libre: Una forma de detección de NETosis es la localización de ADN extracelular utilizando **Pico Green®** (si bien en ocasiones es difícil determinar si ciertas trazas de ADN provienen de la NETosis o de cualquier célula muerta).
 - o Complejos de ADN y proteínas derivadas de neutrófilos: a través de técnicas ELISA se puede determinar la presencia de estos complejos en muestras de fluidos. Esta prueba parece ser, hasta la fecha, la más específica, objetiva y con capacidad cuantitativa para la detección de NETosis.
 - o Detección de NETosis mediante citometría de flujo: con citometría de flujo es posible detectar los cambios del núcleo a nivel morfológico que tienen lugar durante la NETosis. *Zhao et al* ⁽¹¹⁴⁾ han desarrollado un método de citometría de flujo de imagen multiespectral mediante el análisis del aumento del área nuclear, la dispersión de la luz y la distribución de MPO. Este método resulta ser específico y permite también la cuantificación. Otros grupos, como el de Gavillet ⁽¹¹⁵⁾ han desarrollado métodos de cuantificación basados en la detección de MPO e histonas citrulinadas en la superficie del neutrófilo. *Masuda et al* proponen un método de citometría de flujo que utiliza una tinción impermeable a la membrana celular que marca al ADN uniéndose a él, llamado **SYTOX GREEN®**.⁽¹⁰⁸⁾

LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NUTRÓFILOS COMO DIANA TERAPÉUTICA

Resulta evidente plantearse las NETs como una posible diana terapéutica. Se han llevado a cabo numerosos estudios con relación a ello, pero no se han obtenido todavía resultados demasiado concluyentes acerca de la utilización de ciertos fármacos sobre la NETosis, siendo sólo, en su mayoría, probados *in vitro* o en ratones. Aún así, en la actualidad, existen registrados en *clinicaltrials.gov* 17 ensayos clínicos que se están llevando a cabo o han finalizado recientemente con relación a los NET y la NETosis. Se estudian las relaciones de estos con el aborto inducido por anticuerpos antifosfolípido,, la trombolisis en el infarto agudo, la esclerosis sistémica, la quimioterapia, sepsis neonatal, etc.

TRATAMIENTO CON DNASAS

El primer ejemplo es la **DNasa I**. Se trata de una endonucleasa que en el espacio extracelular degrada el DNA allí localizado ⁽¹¹⁶⁾ (lo degrada, no impide su formación). ⁽¹¹⁷⁾ Se ha observado *in vitro* que la DNasa I es útil para el inicio de la degradación de NETs y que les facilita a los macrófagos la fagocitosis de los mismos. ⁽¹¹⁸⁾ El aporte de DNasa exógena podría contribuir a agilizar y hacer más efectivo este proceso.

En pacientes con **LES** los niveles de esta enzima están disminuidos, lo que contribuye a una menor eliminación del DNA (y por lo tanto de las NETs) y el mayor efecto perjudicial (inflamación y daño tisular) de estos en los pacientes.⁽⁴⁾

Macanovic et al realizaron un estudio en ratones. Seleccionaron tres grupos a los que administraron respectivamente DNasa, dexametasona y suero salino. Es preciso señalar que el efecto inmunosupresor de los corticoides en ratones es mucho más efectivo y menos tóxico en ratones que en humanos. Observaron que en aquellos tratados con dexametasona, se erradicaba el rastro de la enfermedad por completo, midiendo parámetros tales como inmunocomplejos, Ig séricas, ANAs, Ac anticardiolipina, biopsia renal, etc. Por otro lado, en aquellos ratones tratados con DNasa, se posponía el desarrollo de la enfermedad y aumentaba la supervivencia un 30%. A su vez objetivaron un descenso de las cifras de creatinina sérica y que la histopatología era mucho menos severa que en el grupo control. Finalmente concluyeron que sería interesante probar este tratamiento también en humanos con lupus. ⁽¹¹⁹⁾

El tratamiento con DNAsas también es efectivo en la inhibición de la liberación de NETS y disminución de la inflamación vascular en vasculitis autoinmunes. ⁽⁸¹⁾

En lo que al tratamiento de **la trombosis venosa profunda** se refiere, las **DNAsas** servirían para disolver el trombo, al igual que lo hace la **heparina**, rompiendo la unión de las histonas y la cromatina. ⁽⁹⁵⁾⁽⁴⁸⁾

Es lógico pensar que si el ADN de las NETs está implicado en la patogenia de la viscosidad mucosa de los pacientes de la **fibrosis quística**, este ADN constituye una diana terapéutica. Para reducir, por tanto, la viscosidad, se han propuesto tratamientos con DNAasa 1 inhalada, la cual reduce la viscosidad del moco, favorece su eliminación y

mejora la función pulmonar. *Rozov et al* ⁽¹²⁰⁾ proponen como posible diana terapéutica la regulación de la activación de neutrófilos y la eliminación de NETs cuando estos se encuentran en cantidades excesivas en la vía aérea. Llevaron a cabo un estudio administrando DNasa dornasa α , que resultó ser ventajoso en la mejora del FEV1 y en la clínica en sujetos con fibrosis quística.

TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE LA PAD-4

Otra posible diana es la **PAD-4**, implicada en la formación de NETs. Se realizó un estudio por el cual se proporcionaron inhibidores de este PAD-4 a ratones con **lupus**, ya que con la acción del PAD-4 las NETs no pueden generarse, observándose que disminuía la respuesta autoinmune, había un menor daño vascular ⁽¹²¹⁾ y en cuanto a la glomerulonefritis, disminuía también los depósitos de inmunocomplejos y la proteinuria. ⁽¹⁹⁾

Se han llevado a cabo estudios sobre cómo tratar la **aterosclerosis** a través de la vía de las NETs. *Knight et al* ⁽¹⁹⁾ han comprobado en ratones que **inhibiendo la PAD4** con cloramidina disminuye el tamaño de la placa de ateroma, ya que se retrasa el reclutamiento de neutrófilos y monocitos, y por lo tanto la enfermedad aterotrombótica. Sin embargo, este tratamiento podría tener importantes efectos adversos que necesitan ser estudiados con mayor profundidad. ⁽¹²²⁾

TRATAMIENTO CON ECULIZUMAB

Por otro lado el sistema del **complemento** también está vinculado a las NETs. Las diferentes fracciones del complemento se unen a las NETs e impiden su degradación. ⁽⁴⁾ El eculizumab es un anticuerpo monoclonal que actúa como inhibidor del complemento y se utiliza en pacientes con **hemoglobinuria paroxística nocturna**. *Zeerleder et al* ⁽¹²³⁾ realizaron un estudio *in vivo* en el que concluyeron que poseía un efecto inhibidor sobre la formación de NETs en estos pacientes. Este fármaco se une a la fracción C5 e inhibe la división de C5 a C5a, lo cual previene la formación del complejo del complemento. Por lo tanto, si no se forma el complejo final del complemento, este tampoco se fijará a las NETs, evitando el efecto de estos en los pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna. ⁽¹²³⁾

TRATAMIENTO CON NADPH OXIDASA

Diversos estudios han puesto de manifiesto que los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, los cuales no expresan la NADPH oxidasa (y por tanto incapaces de formar ROS), no pueden llevar a cabo la NETosis en respuesta a determinados estímulos como mitógenos y microorganismos y llegan incluso a fallecer a causa de infecciones por microorganismos como *Aspergillus nidulans*. La NADPH oxidasa en estos pacientes supone una diana terapéutica, pues corrigiendo este defecto enzimático se comprobó una menor incidencia de infecciones fúngicas y una mayor capacidad de formar NETs. ⁽¹²⁴⁾

TRATAMIENTO CON CALCITRIOL

En otro estudio se objetivó al proporcionar **calcitriol** a pacientes con niveles bajos de vitamina D y diagnosticados de **LES** que se reducía la formación de NETs a partir de los

neutrófilos. A su vez la vitamina D disminuía la proporción de células apoptóticas del endotelio y por consiguiente el daño endotelial. ⁽¹²⁵⁾⁽¹²⁶⁾

TRATAMIENTO CON HIDROCLOROQUINA

La **hidrocloroquina (HCQ)**, antipalúdico que forma parte del tratamiento del **lupus**, también es una diana potencial para el tratamiento de estas enfermedades. Evita la formación de NETs a través de los receptores toll-like (TLR) de las células dendríticas. Estos efectos, por el momento, solo se han estudiado *in vitro*. ⁽¹²⁷⁾

TRATAMIENTO CONTRA IL-7 y TNF

En pacientes con **artritis reumatoide**, el **IL-17 y el TNF** estimulan los neutrófilos para que liberen NETs. Bloqueándolos podríamos conseguir la menor formación de NETs y por lo tanto la disminución de la inflamación mediada por ellos. De todas formas, el efecto beneficioso no estaría claro si sería debido al bloqueo específico de la formación de NETs o al de los mismos IL-17 y TNF que producen inflamación también por otras vías distintas a las de las NETs. ⁽¹¹⁷⁾

TRATAMIENTO CONTRA LA P-SELECTINA

Otra posible diana es la p-selectina⁽¹¹⁸⁾, una proteína secretada por los cuerpos de Weibel–Palade del endotelio. Se han llevado a cabo estudios en los que se ha comprobado que inhibiendo su acción se frena el reclutamiento de neutrófilos (y por tanto la NETosis), la activación plaquetaria (efecto antiagregante) y demás cascada de activación.

TRATAMIENTO CON HEPARINA

Según *Martinod et al* la heparina impide la unión de las histonas con plaquetas y deshace las NETs, y por tanto la posibilidad de que estos formen parte de las placas de aterosclerosis.

TRATAMIENTO CONTRA LA MPO

La inhibición de la **MPO** supone otra diana terapéutica, por ejemplo gracias a la acción del ácido 4-aminobenzoico, que reduce la liberación de NETs. ⁽¹²⁸⁾

CONCLUSIONES

1. Las NETs, así como sus precursores, los neutrófilos, constituyen la primera barrera de defensa inmune del organismo. Son entramados de ADN y proteínas neutrofílicas cuyo objetivo es frenar la invasión de microorganismos causantes de infección.
2. Los neutrófilos expulsan al exterior estas trampas de ADN a través de dos tipos de mecanismos: NETosis vital y suicida, dependiendo de si el neutrófilo resulta destruido completamente o vivo, pero anucleado.
3. Las NETs juegan un papel importante en los procesos infecciosos destruyendo o inhibiendo la reproducción de numerosos organismos, aunque una parte de ellos evaden este sistema neutrofílico por medio de reacciones enzimáticas o la producción de biofilms.
4. Las NETs participan en la patogenia de numerosas enfermedades autoinmunes y de carácter inflamatorio. El aumento de la NETosis se ha relacionado con un empeoramiento de la clínica y un incremento de la actividad de la enfermedad.
5. Las NETs ejercen efectos citotóxicos y protrombóticos, induciendo la activación plaquetaria, la coagulación y la formación de trombos.
6. La formación de NETs es inducida en los procesos tumorales contribuyendo al crecimiento, diseminación metastásica, y trombosis asociada.
7. En enfermedades inflamatorias de la vía aérea tales como fibrosis quística, asma o EPOC, la NETosis juega un papel fundamental, perpetuando el estado de inflamación y favoreciendo la viscosidad mucosa.
8. La cuantificación de NETs en tejido, sangre u otros fluidos biológicos podría ser útil para establecer el pronóstico de las enfermedades en las que están involucrados.
9. Las NETs constituyen una diana terapéutica para aquellas patologías en las que intervienen. A este respecto, se están evaluando diversos agentes como antioxidantes, DNAsas, inhibidores de PAD-4, vitamina D o anticuerpos monoclonales, si bien es necesaria la realización de ensayos clínicos adicionales que determinen su eficacia en diferentes tipos de enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol [Internet]*. 2014 ;9:181–218.
2. Delgado-Rizo V, Martínez-Guzmán MA, Iñiguez-Gutierrez L, García-Orozco A, Alvarado-Navarro A, Fafutis-Morris M. Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. *Front Immunol*. 2017 Feb 6;8.
3. Adrover JM, Nicolás-Ávila JA, Hidalgo A. Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils. *Trends Immunol*. 2016 May;37(5):334–45.
4. Barnado A, Crofford LJ, Oates JC. At the Bedside: Neutrophil extracellular traps (NETs) as targets for biomarkers and therapies in autoimmune diseases. *J Leukoc Biol*. 2016;
5. Sollberger G, Tilley DO, Zychlinsky A. Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization. *Developmental Cell*. 2018. *Dev Cell*. 2018 Mar 12;44(5):542-553
6. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps (NETs): Double-edged swords of innate immunity1. *J Immunol*. 2012 Sep 15;189(6):2689-95
7. Sousa-Rocha D, Thomaz-Tobias M, Diniz LFA, Souza PSS, Pinge-Filho P, Toledo KA. Trypanosoma cruzi and Its Soluble Antigens Induce NET Release by Stimulating Toll-Like Receptors. *PLoS One*. 2015;10(10):e0139569.
8. Camicia G, de Larrañaga G. Trampas extracelulares de neutrófilos: un mecanismo de defensa con dos caras. *Med Clin (Barc)*. 2013 Jan;140(2):70–5.
9. Rosales C. Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front Physiol*. 2018;9:113.
10. Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J Leukoc Biol*. 1996 Feb 1;59(2):229–40.
11. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.
12. Döring Y, Soehnlein O, Weber C. Neutrophil extracellular traps in atherosclerosis and atherothrombosis. *Circulation Research*. 2017.
13. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med*. 2008 Sep 10;14(9):949–53.
14. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against Candida albicans. *PLoS Pathog*. 2009; PLoS

- Pathog. 2009 Oct;5(10):e1000639
15. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*. 2009 Jun;15(6):623–5.
 16. Lee D-Y, Huang C-M, Nakatsuji T, Thiboutot D, Kang S-A, Monestier M, et al. Histone H4 Is a Major Component of the Antimicrobial Action of Human Sebocytes. *J Invest Dermatol*. 2009 Oct;129(10):2489–96.
 17. Wang Y, Chen Y, Xin L, Beverley SM, Carlsen ED, Popov V, et al. Differential microbicidal effects of human histone proteins H2A and H2B on *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Infect Immun*. 2011 Mar;79(3):1124–33.
 18. Dwivedi N, Neeli I, Schall N, Wan H, Desiderio DM, Csernok E, et al. Deimination of linker histones links neutrophil extracellular trap release with autoantibodies in systemic autoimmunity. *FASEB J*. 2014 Jul;28(7):2840–51.
 19. Knight JS, Subramanian V, O'Dell AA, Yalavarthi S, Zhao W, Smith CK, et al. Peptidylarginine deiminase inhibition disrupts NET formation and protects against kidney, skin and vascular disease in lupus-prone MRL/lpr mice. *Ann Rheum Dis*. 2015 Dec;74(12):2199–206.
 20. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med*. 2010 Aug 30 ;207(9):1853–62.
 21. Lewis HD, Liddle J, Coote JE, Atkinson SJ, Barker MD, Bax BD, et al. Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nat Chem Biol*. 2015 Mar;11(3):189–91.
 22. Wildhagen KCAA, García de Frutos P, Reutelingsperger CP, Schrijver R, Aresté C, Ortega-Gómez A, et al. Nonanticoagulant heparin prevents histone-mediated cytotoxicity in vitro and improves survival in sepsis. *Blood*. 2014 Feb 13;123(7):1098–101.
 23. Singh RK, Liang D, Gajjalaiahvari UR, Kabbaj MHM, Paik J, Gunjan A. Excess histone levels mediate cytotoxicity via multiple mechanisms. *Cell Cycle*. 2010 Oct 15;9(20):4236–44.
 24. Silk E, Zhao H, Weng H, Ma D. The role of extracellular histone in organ injury. *2017 Cell Death Dis*. 2017 May 25;8(5):e2812
 25. Van Avondt K, Hartl D. Mechanisms and disease relevance of neutrophil extracellular trap formation. *European Journal of Clinical Investigation*. 2018. *Eur J Clin Invest*. 2018 Nov;48 Suppl 2:e12919
 26. Pilsczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*. 2010 Dec 15;185(12):7413–25.
 27. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN V, Zbytnuik LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo.

- Nat Med . 2012 Sep 26;18(9):1386–93.
28. Byrd AS, O'Brien XM, Johnson CM, Lavigne LM, Reichner JS. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *J Immunol*. 2013 Apr 15;190(8):4136–48.
 29. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 2007 Apr 25;13(4):463–9.
 30. Honda M, Kubes P. Neutrophils and neutrophil extracellular traps in the liver and gastrointestinal system. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(4):206–21.
 31. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007 Jan 15;176(2):231–41.
 32. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. Levitz SM, editor. *PLoS Pathog*. 2009 Oct 30;5(10):e1000639.
 33. Rochael NC, Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, DeSouza-Vieira TS, Oliveira MP, Garcia e Souza LF, et al. Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by *Leishmania* parasites. *Sci Rep*. 2015 Dec 17;5:18302.
 34. Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T, et al. Neutrophil Extracellular Traps Mediate a Host Defense Response to Human Immunodeficiency Virus-1. *Cell Host Microbe*. 2012 Jul 19;12(1):109–16.
 35. Yousefi S, Mihalache C, Kozłowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*. 2009 Nov 17;16(11):1438–44.
 36. Mitroulis I, Kambas K, Chrysanthopoulou A, Skendros P, Apostolidou E, Kourtzelis I, et al. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 β and autophagy-related signaling in gout. *PLoS One*. 2011;6(12):e29318.
 37. Qiu S-L, Zhang H, Tang Q, Bai J, He Z-Y, Zhang J-Q, et al. Neutrophil extracellular traps induced by cigarette smoke activate plasmacytoid dendritic cells. *Thorax*. 2017 Dec;72(12):1084–93.
 38. Martinelli S, Urosevic M, Daryadel A, Oberholzer PA, Baumann C, Fey MF, et al. Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation. *J Biol Chem*. 2004 Oct 15; 279(42):44123–32.
 39. Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* (80-). 2015 Jul 17;349(6245):316–20.
 40. Yost CC, Cody MJ, Harris ES, Thornton NL, McInturff AM, Martinez ML, et al. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune

- deficiency of human neonates. *Blood*. 2009 Jun 18;113(25):6419–27.
41. Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade. *J Innate Immun*. 2018;10(5-6):414-421
 42. Schilcher K, Andreoni F, Uchiyama S, Ogawa T, Schuepbach RA, Zinkernagel AS. Increased neutrophil extracellular trap-mediated *Staphylococcus aureus* clearance through inhibition of nuclease activity by clindamycin and immunoglobulin. *J Infect Dis*. 2014 Aug 1;210(3):473–82.
 43. Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, et al. DNase Expression Allows the Pathogen Group A *Streptococcus* to Escape Killing in Neutrophil Extracellular Traps. *Curr Biol*. 2006 Feb;16(4):396–400.
 44. Parker H, Winterbourn CC. Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Front Immunol*. 2013 Jan 21;3:424
 45. Zawrotniak M, Rapala-Kozik M. Neutrophil extracellular traps (NETs)-formation and implications *Acta Biochim Pol*. 2013;60(3):277-84
 46. Foster TJ. The *Staphylococcus aureus* “superbug.” *J Clin Invest* [Internet]. 2004 Dec 15 ;114(12):1693–6.
 47. Thammavongsa V, Missiakas DM, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* Degrades Neutrophil Extracellular Traps to Promote Immune Cell Death. *Science* (80-). 2013 Nov 15;342(6160):863–6.
 48. Möllerherm H, Neumann A, Schilcher K, Blodkamp S, Zeitouni NE, Dersch P, et al. *Yersinia enterocolitica* -mediated degradation of neutrophil extracellular traps (NETs). Schwarz S, editor. *FEMS Microbiol Lett*. 2015 Dec 1;362(23):fnnv192.
 49. Kambas K, Mitroulis I, Apostolidou E, Girod A, Chrysanthopoulou A, Pneumatikos I, et al. Autophagy Mediates the Delivery of Thrombogenic Tissue Factor to Neutrophil Extracellular Traps in Human Sepsis. Benarafa C, editor. *PLoS One*. 2012 Sep 19;7(9):e45427.
 50. Storisteanu DML, Pocock JM, Cowburn AS, Juss JK, Nadesalingam A, Nizet V, et al. Evasion of Neutrophil Extracellular Traps by Respiratory Pathogens. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017 ;56(4):423–31.
 51. Nusrat A, von Eichel-Streiber C, Turner JR, Verkade P, Madara JL, Parkos CA. *Clostridium difficile* Toxins Disrupt Epithelial Barrier Function by Altering Membrane Microdomain Localization of Tight Junction Proteins. *Infect Immun*. 2001 Mar 1;69(3):1329–36.
 52. Zemljic M, Rupnik M, Scarpa M, Anderluh G, Palù G, Castagliuolo I. Repetitive domain of *Clostridium difficile* toxin B exhibits cytotoxic effects on human intestinal epithelial cells and decreases epithelial barrier function. *Anaerobe* 2010 Oct;16(5):527–32.
 53. Khoruts A, Sadowsky MJ. Understanding the mechanisms of faecal microbiota transplantation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016 Sep 22;13(9):508–16.
 54. Hering NA, Fromm A, Kikhney J, Lee I-FM, Moter A, Schulzke JD, et al. *Yersinia*

- enterocolitica* Affects Intestinal Barrier Function in the Colon. J Infect Dis. 2016 Apr 1 ;213(7):1157–62.
55. Griffin AJ, McSorley SJ. Development of protective immunity to Salmonella, a mucosal pathogen with a systemic agenda. Mucosal Immunol. 2011 Jul 9;4(4):371–82
 56. Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. Science. 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.
 57. Phalipon A, Sansonetti PJ. *Shigella's* ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival? Immunol Cell Biol. 2007 Feb;85(2):119–29.
 58. Eilers B, Mayer-Scholl A, Walker T, Tang C, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil antimicrobial proteins enhance *Shigella flexneri* adhesion and invasion. Cell Microbiol. 2010 Aug 1;12(8):1134–43.
 59. Ramos-Kichik V, Mondragón-Flores R, Mondragón-Castelán M, Gonzalez-Pozos S, Muñiz-Hernandez S, Rojas-Espinosa O, et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis. 2009;89(1):29–37.
 60. Uppot RN, Lally J. Fast imaging techniques for body magnetic resonance imaging. Curr Med Imaging Rev. 2009;3(2):91–107
 61. Reidl J, Klose KE. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. FEMS Microbiol Rev. 2002 Jun 1 ;26(2):125–39.
 62. Seper A, Hosseinzadeh A, Gorkiewicz G, Lichtenegger S, Roier S, Leitner DR, et al. *Vibrio cholerae* evades neutrophil extracellular traps by the activity of two extracellular nucleases. PLoS Pathog. 20139(9):e1003614.
 63. Moreno-Altamirano MMB, Rodríguez-Espinosa O, Rojas-Espinosa O, Pliego-Rivero B, Sánchez-García FJ. Dengue Virus Serotype-2 Interferes with the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. Intervirology. 2015;58(4):250–9.
 64. Doron S, Snyderman DR, Gorbach SL. Lactobacillus GG: Bacteriology and Clinical Applications. Gastroenterol Clin North Am. 2005 Sep;34(3):483–98.
 65. I ZP, E M V, P AY. Probiotics and remission of ulcerative colitis: a systematic review Neth J Med. 2007 Dec;65(11):411–8.
 66. Vong L, Lorentz RJ, Assa A, Glogauer M, Sherman PM. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Inhibits the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. J Immunol. 2014 Feb 15;192(4):1870–7.
 67. Tripathi S, Verma A, Kim E-J, White MR, Hartshorn KL. LL-37 modulates human neutrophil responses to influenza A virus. J Leukoc Biol. 2014 Nov; 96(5):931–8.
 68. Funchal GA, Jaeger N, Czepielewski RS, Machado MS, Muraro SP, Stein RT, et al. Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Promotes TLR-4–Dependent Neutrophil Extracellular Trap Formation by Human Neutrophils. Tripp R, editor. PLoS One. 2015 Apr 9; 10(4):e0124082.

69. Cortjens B, de Boer OJ, de Jong R, Antonis AF, Sabogal Piñeros YS, Lutter R, et al. Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease. *J Pathol*. 2016 Feb 1;238(3):401–11.
70. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013 Feb 15;4(2):119–28.
71. Netea MG, Joosten LAB, van der Meer JWM, Kullberg B-J, van de Veerdonk FL. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2015 Oct 21;15(10):630–42.
72. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol*. 2006 Apr;8(4):668–76.
73. Reyes-García AM de L, Aroca A, Arroyo AB, García-Barbera N, Vicente V, González-Conejero R, et al. Neutrophil extracellular trap components increase the expression of coagulation factors. *Biomed reports*. 2019 Mar; 10(3):195–201.
74. Michał M, Pruchniak P, Pruchniak MP, Kotuła I, Manda-Handzlik A. Neutrophil extracellular traps (Nets) impact upon autoimmune disorders. *Cent Eur J Immunol*. 2015;40(2):217–24.
75. Wu J-F, Yang Y-H, Wang L-C, Lee J-H, Shen E-Y, Chiang B-L. Antinucleosome antibodies correlate with the disease severity in children with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun*. 2006 Sep;27(2):119–24.
76. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med*. 2011 Mar 9;3(73):73ra19.
77. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, et al. Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol*. 2011 Jul 1;187(1):538–52.
78. Leffler J, Martin M, Gullstrand B, Tyden H, Lood C, Truedsson L, et al. Neutrophil Extracellular Traps That Are Not Degraded in Systemic Lupus Erythematosus Activate Complement Exacerbating the Disease. *J Immunol*. 2012 Apr 1;188(7):3522–31.
79. Yeh T-M, Chang H-C, Liang C-C, Wu J-J, Liu M-F. Deoxyribonuclease-Inhibitory Antibodies in Systemic Lupus erythematosus. *J Biomed Sci*. 2003;10(5):544–51.
80. Guiducci C, Tripodo C, Gong M, Sangaletti S, Colombo MP, Coffman RL, et al. Autoimmune skin inflammation is dependent on plasmacytoid dendritic cell activation by nucleic acids via TLR7 and TLR9. *J Exp Med*. 2010 Dec 20;207(13):2931–42.
81. Sangaletti S, Tripodo C, Chiodoni C, Guarnotta C, Cappetti B, Casalini P, et al. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated

- autoimmunity. *Blood*. 2012 Oct 11;120(15):3007–18.
82. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018 Feb;18(2):134-147
 83. Tsokos GC. Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med*. 2011 Dec;365(22):2110–21.
 84. Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 May 25;107(21):9813–8.
 85. Schellekens GA, Visser H, De Jong BAW, Van Den Hoogen FHJ, Hazes JMW, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum*. 2000 Jan 1;43(1):155–63.
 86. Kambas K, Chrysanthopoulou A, Vassilopoulos D, Apostolidou E, Skendros P, Girod A, et al. Tissue factor expression in neutrophil extracellular traps and neutrophil derived microparticles in antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis may promote thromboinflammation and the thrombophilic state associated with the disease. *Ann Rheum Dis*. 2014 Oct ;73(10):1854–63.
 87. HOLDENRIEDER S, EICHHORN P, BEUERS U, SAMTLEBEN W, SCHOENERMARCK U, ZACHOVAL R, et al. Nucleosomal DNA Fragments in Autoimmune Diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Sep 1;1075(1):318–27.
 88. Stassen PM, Derks RPH, Kallenberg CGM, Stegeman CA. Venous thromboembolism in ANCA-associated vasculitis--incidence and risk factors. *Rheumatology* . 2007 Dec 18;47(4):530–4.
 89. Stakos DA, Kambas K, Konstantinidis T, Mitroulis I, Apostolidou E, Arelaki S, et al. Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction. *Eur Heart J* . 2015 Jun 7;36(22):1405–14.
 90. Nakazawa D, Tomaru U, Yamamoto C, Jodo S, Ishizu A. Abundant neutrophil extracellular traps in thrombus of patient with microscopic polyangiitis. *Front Immunol*. 2012;3:333.
 91. Wright TK, Gibson PG, Simpson JL, McDonald VM, Wood LG, Baines KJ. Neutrophil extracellular traps are associated with inflammation in chronic airway disease. *Respirology*. 2016 Apr 1;21(3):467–75.
 92. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One*. 2012;7(2):e32366.
 93. Douda DN, Jackson R, Grasemann H, Palaniyar N. Innate Immune Collectin Surfactant Protein D Simultaneously Binds Both Neutrophil Extracellular Traps and Carbohydrate Ligands and Promotes Bacterial Trapping. *J Immunol*. 2011 Aug 15;187(4):1856–65.
 94. Finn A V., Nakano M, Narula J, Kolodgie FD, Virmani R. Concept of

- Vulnerable/Unstable Plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010 Jul 1;30(7):1282–92.
95. Carmona-Rivera C, Zhao W, Yalavarthi S, Kaplan MJ. Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2. *Ann Rheum Dis*. 2015 Jul;74(7):1417–24.
 96. Döring Y, Manthey HD, Drechsler M, Lievens D, Megens RTA, Soehnlein O, et al. Auto-Antigenic Protein-DNA Complexes Stimulate Plasmacytoid Dendritic Cells to Promote Atherosclerosis. *Circulation*. 2012 Apr 3;125(13):1673–83.
 97. Horne BD, Anderson JL, John JM, Weaver A, Bair TL, Jensen KR, et al. Which White Blood Cell Subtypes Predict Increased Cardiovascular Risk? *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1638–43.
 98. Line BR. Pathophysiology and diagnosis of deep venous thrombosis. *Semin Nucl Med*. 2001 Apr 1 ;31(2):90–101.
 99. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci*. 2010 Sep 7 ;107(36):15880–5.
 100. BRILL A, FUCHS TA, SAVCHENKO AS, THOMAS GM, MARTINOD K, DE MEYER SF, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost*. 2012 Jan 1;10(1):136–44.
 101. Wolberg AS, Aleman MM, Leiderman K, Machlus KR. Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow’s triad revisited. *Anesth Analg*. 2012 Feb;114(2):275–85.
 102. von Brühl M-L, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 2012 Apr 9 ;209(4):819–35.
 103. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Jan 7 ;13(1):34–45.
 104. Borissoff JI, Joosen IA, Versteijlen MO, Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, et al. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*. 2013 Aug;33(8):2032–40.
 105. Cedervall J, Olsson A-K. Immunity Gone Astray – NETs in Cancer. *Trends in Cancer*. 5003;2(11):633–4.
 106. Al-Haidari AA, Algethami N, Lepsenyi M, Rahman M, Syk I, Thorlacius H, et al. Neutrophil extracellular traps promote peritoneal metastasis of colon cancer cells. *Oncotarget*. 2019 Feb 8;10(12):1238–49.
 107. Wu L, Saxena S, Awaji M, Singh RK, Wu L, Saxena S, et al. Tumor-Associated Neutrophils in Cancer: Going Pro. *Cancers (Basel)*. 2019;11(4):564.
 108. Masuda S, Shimizu S, Matsuo J, Nishibata Y, Kusunoki Y, Hattanda F, et al.

- Measurement of NET formation in vitro and in vivo by flow cytometry. *Cytom Part A*. 2017;91(8):822–9.
109. Masuda S, Nakazawa D, Shida H, Miyoshi A, Kusunoki Y, Tomaru U, et al. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin Chim Acta*. 2016;459:89–93.
 110. Masuda S, Nakazawa D, Shida H, Miyoshi A, Kusunoki Y, Tomaru U, et al. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin Chim Acta*. 2016 Aug 1;459:89–93.
 111. Rebernick R, Fahmy L, Glover C, Bawadekar M, Shim D, Holmes CL, et al. DNA Area and NETosis Analysis (DANA): A High-Throughput Method to Quantify Neutrophil Extracellular Traps in Fluorescent Microscope Images. *Biol Proced Online*. 2018;20(1):1–9.
 112. Mohanty T, Sørensen OE, Nordenfelt P. NETQUANT: Automated quantification of neutrophil extracellular traps. *Front Immunol*. 2018;8(JAN):1–10.
 113. Hamaguchi S, Hirose T, Matsumoto N, Akeda Y, Irisawa T, Seki M, et al. Neutrophil extracellular traps in bronchial aspirates: A quantitative analysis. *Eur Respir J*. 2014;43(6):1709–18.
 114. Zhao W, Fogg DK, Kaplan MJ. A novel image-based quantitative method for the characterization of NETosis. *J Immunol Methods*. 2015 Aug;423:104–10.
 115. M. G, K. M, R. R, C. H, N.I. S, D.D. W, et al. Flow cytometric assay for direct quantification of neutrophil extracellular traps in blood samples. *Am J Hematol*. 2015;90(12):1155–8.
 116. Frese S, Diamond B. Structural modification of DNA—a therapeutic option in SLE? *Nat Rev Rheumatol*. 2011 Dec 18;7(12):733–8.
 117. Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med*. 2017 Mar 7;23(3):279–287.
 118. Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: Tangled up in NETs. *Blood*. 2014;123(18):2768–76.
 119. MACANOVIC M, SINICROPI D, SHAK S, BAUGHMAN S, THIRU S, LACHMANN PJ. The treatment of systemic lupus erythematosus (SLE) in NZB/W F1 hybrid mice; studies with recombinant murine DNase and with dexamethasone. *Clin Exp Immunol*. 1996 Nov 1;106(2):243–52.
 120. A first-year dornase alfa treatment impact on clinical parameters of patients with cystic fibrosis: the Brazilian cystic fibrosis multicenter study. *Rev Paul Pediatr*. 2013 Dec;31(4):420–30.
 121. Knight JS, Zhao W, Luo W, Subramanian V, O’dell AA, Yalavarthi S, et al. Peptidylarginine deiminase inhibition is immunomodulatory and vasculoprotective in murine lupus. *J Clin Invest*. 2013;123.
 122. Van Avondt K, Maegdefessel L, Soehnlein O. Therapeutic Targeting of Neutrophil Extracellular Traps in Atherogenic Inflammation. *Thromb Haemost*. 2019

Apr;119(4):542-552

123. van Bijnen S, Wouters D, van Mierlo GJ, Muus P. Neutrophil Extracellular Trap Formation In PNH Patients With and Without a History Of Thrombosis - Effects Of Eculizumab. *Blood*. 2013;122(21).
124. Bianchi M, Niemiec MJ, Siler U, Urban CF, Reichenbach J. Restoration of anti-*Aspergillus* defense by neutrophil extracellular traps in human chronic granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-dependent. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 May 1;127(5):1243-1252.e7.
125. Reynolds J, Ray D, Alexander Y, Bruce I. Role of vitamin D in endothelial function and endothelial repair in clinically stable systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 2015 Feb 26;385 Suppl 1:S83
126. Wahono CS, Rusmini H, Soelistyoningsih D, Hakim R, Handono K, Endharti AT, et al. Effects of 1,25(OH)₂D₃ in immune response regulation of systemic lupus erithematosus (SLE) patient with hypovitamin D. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(1):22–31.
127. Smith CK, Vivekanandan-Giri A, Tang C, Knight JS, Mathew A, Padilla RL, et al. Neutrophil extracellular trap-derived enzymes oxidize high-density lipoprotein: an additional proatherogenic mechanism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)* . 2014 Sep;66(9):2532–44.
128. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2010 Nov 1;191(3):677–91.

ANEXOS

ANEXO 1: GLOSARIO

- NETs: Trampas extracelulares de neutrófilos
- PMN: Polimorfonucleares
- TLR: Receptor Toll-like
- PMA: forbol-12-miristato-13-acetato
- MNDA: Antígeno de diferenciación de la célula mieloide
- NE: Elastasa neutrofílica
- LTF: Lactotransferrina
- CG: Catepsina G
- MPO: Mieloperoxidasa
- PR3: Proteinasa leucocitaria 3
- AZU 1: Azurocidina
- Lys C: Lisozima C
- DEFA-1 y -3: Defensina neutrofílica 1 y 3
- MyD88: factor de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88
- ROS: especies reactivas de oxígeno
- PKC: Protein kinasa c
- Gp91phox: subunidad de la NADPH
- PAD 4: peptidilarginín deaminasa 4
- End A: endonucleasa A
- SodCl: Superóxido dismutasa
- NF-κB: Factor nuclear kappa B
- PKC: Protein kinasa C
- AMPs: Péptido Anti Microbiano
- VRS: Virus respiratorio sincitial
- LES: Lupus Eritematoso Sistémico
- AR: Artritis reumatoide
- ANCA vasculitis: Vasculitis asociadas con anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos
- Anticuerpos anti dsDNA: Anti ADN bicatenario
- TNF: Factor de necrosis tumoral
- FR: Factor reumatoide
- Anti-CCP: Anticuerpos anti-péptidos citrulinados cíclico
- PAM: Poliangeítis microscópica
- FT: Factor tisular
- DANA: DNA Area and NETosis Analysis

ANEXO 2: ENSAYOS CLÍNICOS DESARROLLADOS ACTUALMENTE SEGÚN
clinicaltrials.gov

NÚMERO	ESTADO	OBJETO DE ESTUDIO	CONDICIONES	INTERVENCIÓN	LOCALIZACIÓN
1	Reclutando	Relación de las NETs con el aborto en el síndrome antifosfolípido	Aborto inducido por el síndrome antifosfolípido		Shanghai, China
2	Completado	Relación de las NETs con la trombolisis en el infarto agudo	Infarto agudo	Muestra de sangre	París, Francia
3	Reclutando	Impacto de las NETs en la trombolisis en la fase aguda de la isquemia cerebral	Infarto cerebral		Suresnes, Francia
4	Reclutando	NETs en la esclerosis sistémica	LES, esclerosis sistémica	Muestra de sangre	Reims, Francia
5	Desconocido	Formación de NETs post trasplante de progenitores hematopoyéticos	Cáncer infantil		Tel-Aviv, Israel
6	Desconocido	Relación de las NETs con la quimioterapia y la actividad antitumoral	Enfermedades pediátricas de órgano sólido y hematológicas		Tel-Aviv
7	Reclutando	NETs y sepsis neonatal y pediátrica	Sepsis	Marcadores de formación de NETs	Hamburgo, Alemania
8	Completado	NETs y trasplante de médula ósea	Trasplante de médula ósea		Salt Lake City, Uta, EEUU
9	Finalizado	Citocinas inflamatorias relacionadas con la transfusión y cuantificación de NETs en neonatos	Anemia del prematuro y enterocolitis necrotizante		Salt Lake City, Utah, EEUU
10	Finalizado	Efecto de la danirixina en los NETs en EPOC	EPOC	Danirixina, Placebo, Medicación de rescate, Medicación inhalada de rescate para la EPOC	Dundee, Reino Unido
11	No	Anemia de células	Anemia de células		

	reclutado todavía	falciformes y NETs	falciformes		
12	Retirado	NETs y la trombolisis inducida por el factor activador de plasminógeno en pacientes con IAM	Infarto agudo		París, Francia
13	Completado	NETs y fibrosis quística	Fibrosis quística		Tours, Francia
14	Desconocido	NETs e infecciones piógenas recurrentes	Infecciones piógenas		Kfar Saba, Israel
15	Completado	NETs y anafilaxias en agentes bloqueantes neuromusculares	Shock anafiláctico por agentes bloqueantes musculares	Volumen de sangre recogida para este estudio	París, Francia
16	No reclutado todavía	Dornasa alfa inhalada para reducir la insuficiencia respiratoria después de un traumatismo severo	Trauma múltiple. Distrés respiratorio del adulto	Solución inhalada de dornasa alfa, Placebo	
17	Reclutando	Identificación de biomarcadores para el diagnóstico de cáncer oculto en pacientes con tromboembolismos venosos.	Cáncer. Tromboembolismo venoso		Estocolmo, Suecia