

ARTÍCULO ORIGINAL

ATRAPAR AL ENEMIGO: UNA CONSECUENCIA DEL PAPEL MULTIFACÉTICO DE LOS NEUTRÓFILOS

Catching the enemy: a consequence of the multifaceted role of neutrophils

M.^a Teresa Cutuli de Simón

Académica Correspondiente de la Sección de Veterinaria de la Real Academia de Doctores de España
mtcutuli@ucm.es

RESUMEN

Los neutrófilos son un grupo heterogéneo de células inmunitarias que ejercen múltiples funciones en la primera línea de defensa del hospedador, la remodelación tisular, la regulación de la inflamación y la regulación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Actúan mediante tres procesos principales: la fagocitosis, la degranulación del contenido de sus vesículas al exterior y, la extrusión de las llamadas trampas extracelulares (NETs).

Las NETs son estructuras similares a redes compuestas de, filamentos de ADN nuclear o mitocondrial recubiertos con histonas y proteínas granulares y citoplasmáticas, que son liberadas al medio extracelular donde atrapan, aíslan, inmovilizan y eliminan al invasor. Inicialmente, las NET solo se consideraban como una función compleja del sistema inmunitario innato para combatir microorganismos invasores. Posteriormente, se hizo evidente que la generación excesiva y la falta de mecanismos apropiados para eliminar las ya formadas, agravaba la inflamación y causaba daño orgánico. En la actualidad se reconoce que las NETs desempeñan un papel crucial en la fisiopatología de muchas enfermedades, como las enfermedades autoinmunes, las inflamatorias y el cáncer.

Esta revisión busca ofrecer una perspectiva actualizada sobre la biología de las NET, abarcando conocimientos sobre su formación, su papel de defensa antimicrobiana en la homeostasis y las estrategias de evasión de los patógenos.

PALABRAS CLAVE: Neutrófilos, trampas extracelulares de neutrófilos, NETs, inmunidad innata, evasión de patógenos.

ABSTRACT

Neutrophils are a heterogeneous group of immune cells that exert multiple functions in the host's first line of defense, tissue remodeling, inflammation regulation, and regulation of the innate and adaptive immune response. They act through three main processes: phagocytosis, the degranulation of the contents of their vesicles to the outside and the extrusion of the so-called extracellular traps (NETs).

NETs are network-like structures composed of strands of nuclear or mitochondrial DNA coated with histones and granular and cytoplasmic proteins, which are released into the extracellular medium where they trap, isolate, immobilize, and eliminate the invader. Initially, NETs were only considered as a complex function of the innate immune system to fight invading microorganisms. Subsequently, it became apparent that excessive generation, and the lack of appropriate mechanisms to eliminate those already formed, aggravated inflammation and caused organ damage. They are now recognized as playing a crucial role in the pathophysiology of many diseases, including autoimmune diseases, inflammatory diseases, and cancer.

This review seeks to offer an updated perspective on the biology of NETs, covering knowledge about their formation, their role as antimicrobial defense in homeostasis and pathogen avoidance strategies.

KEYWORDS: Neutrophils, Neutrophil Extracellular Traps, Nets, Innate Immunity, Microbial Evasion.

1. INTRODUCCIÓN

El hombre, los animales y las plantas deben detectar y eliminar a los invasores con la mayor rapidez y eficacia posibles. La realización inicial de esta misión de defensa está a cargo del sistema inmunitario innato, que consiste en un conjunto de actuaciones interactivas de células y moléculas. Entre los muchos tipos celulares que participan en la inmunidad innata se incluyen los neutrófilos (granulocitos polimorfonucleares, PMN), que son los primeros en ser reclutados a los focos de inflamación séptica o aséptica^{1,2,3} donde ejercen múltiples funciones en la defensa del hospedador, la remodelación tisular, la regulación de la inflamación y la regulación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa.

Tradicionalmente se consideraban como una población celular homogénea dedicada a la defensa inespecífica frente a la invasión de los microorganismos. Ahora bien, mediante la utilización de tecnología avanzadas de análisis de células individuales esta concepción ha sido reemplazada, actualmente se considera a los neutrófilos como una población heterogénea, compuesta por varios estados funcionales únicos capaces de realizar diferentes funciones efectoras en la salud y en la enfermedad^{4,5}.

Los neutrófilos constituyen entre el 50% y el 75% de los leucocitos sanguíneos en el hombre y la mayoría de los carnívoros, alrededor de un 50% en caballos, y del 20% - 30% en vacas, ovejas y roedores de laboratorio⁶. Tradicionalmente, se consideraba que en los tejidos sanos no había presencia de neutrófilos, sin embargo, diversas investigaciones han demostrado la existencia de neutrófilos en pulmón, hígado y bazo en condiciones homeostáticas^{7,8}, aunque los fenotipos y las funciones de estas células aún no se comprenden del todo.

Los neutrófilos se generan continuamente en la médula ósea a partir de células madre hematopoyéticas autorrenovables, que originan progenitores mieloides comunes que, a su vez, dan lugar a progenitores de granulocitos-monocitos, los cuales bajo el control del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) son la fuente de neutrófilos. El desarrollo del linaje de neutrófilos progresa a través de múltiples etapas de diferenciación sucesivas, desde precursores mitóticos proNE (promielocitos, mielocitos), pasando por precursores no mitóticos o neutrófilos inmaduros preNEU (metamielocitos y neutrófilos en banda) hasta neutrófilos maduros^{9,10,11}. La maduración de los neutrófilos se acompaña de una mayor expresión superficial de diversas moléculas que incluyen receptores de quimiocinas y quimioatrayentes acoplados a proteínas G, receptores Fc (fracción constante de los anticuerpos), receptores de adhesión como selectinas/ligandos de selectina e integrinas, diversos receptores de citocinas, así como receptores de inmunidad innata como los receptores tipo Toll (para el reconocimiento de moléculas de patógenos) y las lectinas de tipo C¹². Debemos añadir que, los neutrófilos maduros también contienen gránulos y vesículas secretoras que almacenan proteínas específicas relevantes para sus

funciones: 1) Gránulos azurófilos o primarios: contienen varias enzimas como mieloperoxidasa y elastasa, 2) Gránulos específicos o secundarios: contienen proteínas como lactoferrina, fosfatasa alcalina o lisozima, 3) Gránulos terciarios: contienen fosfatasa y metaloproteinasa^{13,14}.

De acuerdo con Fingerhut y colaboradores¹⁵, en la tabla 1 se describen comparativamente, la presencia de ciertos componentes de los gránulos presentes en los neutrófilos de los humanos y de diferentes especies animales.

	Humano	Vaca	Cerdo	Caballo	Perro	Gato	Aves	Ratón
<i>Mieloperoxidasa</i>	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Elastasa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactoferrina</i>	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Fosfatasa alcalina</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Metaloproteinasa</i>	+	+	+	+	+	ND	+	+

Tabla 1.- Esquema comparativo de la presencia de ciertos componentes en los gránulos de neutrófilos del hombre y de diferentes especies animales.

Terminada la maduración, los neutrófilos son liberados a la sangre y este proceso depende de la interacción de su receptor de quimiocina CXCR4 y las quimiocinas CXCL1 y CXL2 producidas por las células estromales en la médula ósea, así como del factor estimulante G-CSF^{16,17}. Hay que comentar que, se generan entre $1-2 \times 10^{11}$ células/día y que en condiciones de homeostasis, solo los neutrófilos maduros se liberan a la circulación sanguínea, denominados jóvenes, los cuales son reconocibles por presentar marcadores superficiales que los identifican, CXCR2⁺, CD62L⁺ y CXCR4⁻, en contraposición con los neutrófilos senescentes o envejecidos que tienen un núcleo hipersegmentado y presentan niveles altos de CXCR4 y bajos de CXCR2 y CD62L¹⁸.

La producción homeostática de células/día, puede incrementarse rápidamente en respuesta al estrés hematopoyético causado por amenazas inflamatorias, tanto microbianas como estériles, en un proceso denominado «granulopoyesis de emergencia», en donde el transporte de neutrófilos al torrente sanguíneo aumenta, y los neutrófilos inmaduros no proliferativos también pueden liberarse a la periferia. Esta capacidad de adaptación del sistema hematopoyético depende de procesos moleculares, celulares y espaciales que garantizan las exigencias de neutrófilos y permiten la restauración de los niveles basales una vez que disminuyen dichas necesidades⁵. En la figura 1 se esquematiza el origen, producción, desarrollo y actuación de los neutrófilos.

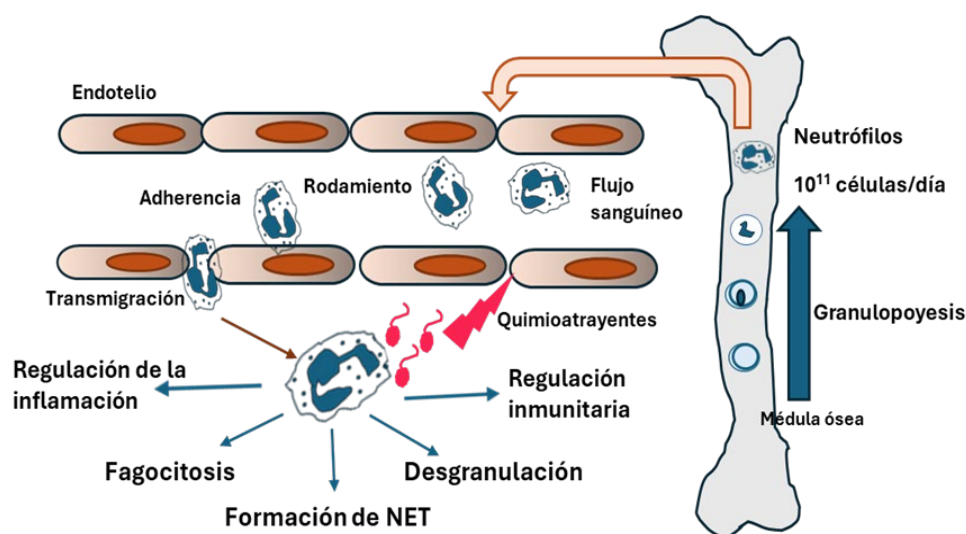


Fig. 1.- Esquema de la producción, desarrollo y actuación de los neutrófilos. Los neutrófilos se producen en la médula ósea mediante un proceso denominado granulopoyesis y se liberan a la circulación sanguínea. En respuesta a los quimioatrayentes, experimentan una cascada de reclutamiento y migran a diferentes tejidos. En el lugar de la inflamación o lesión, ejercen sus múltiples funciones efectoras.

Se considera que, la vida útil de los neutrófilos es corta y altamente dinámica, regulada por una combinación de señales microambientales, programas intrínsecos de la célula y estados patológicos. Los tiempos de supervivencia varían desde unas pocas horas (6-18 horas) en homeostasis, hasta unos pocos días en estados inflamatorios (3-5 días)^{19,20}. Al final de su vida, tanto si han intervenido en respuestas inmunitarias o no, los neutrófilos sufren muerte programada, por diversos mecanismos como son apoptosis, necroptosis, piroptosis, autofagia, NETosis y necrosis²¹. Los neutrófilos muertos son eliminados principalmente por macrófagos, lo que induce a los macrófagos a liberar señales antiinflamatorias, logrando una resolución oportuna de la inflamación, ya que, además de detener el reclutamiento de neutrófilos, es necesario desactivar y eliminar a los neutrófilos presentes en el lugar afectado²².

2. FUNCIONES EFECTORAS DE LOS NEUTRÓFILOS

En condiciones de homeostasis, los neutrófilos no permanecen inactivos, sino que realizan activamente funciones de inmunovigilancia. Mantienen la homeostasis tisular monitorizando de forma dinámica el microambiente tisular y la eliminación de posibles amenazas. Patrullan continuamente la circulación y diversos tejidos, reconociendo patrones moleculares presentes en los patógenos (PAMPs) o patrones asociados a daño tisular (DAMPs), a través de receptores expresados en su superficie (PRR). Tras la unión con las estructuras microbianas o de lesión, los receptores activan diversos mecanismos de transducción de señales, coordinando una variedad de vías celulares que inician la respuesta antimicrobiana, la regulación de la inflamación y la remodelación tisular^{23,24,25}.

Las tres funciones efectoras clásicas de los neutrófilos incluyen: la fagocitosis, la degranulación y la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET).

El concepto de fagocitosis como un mecanismo fundamental de defensa innata fue introducido por Elie Metchnikoff en 1882, y se trata de un proceso en el que los neutrófilos detectan y engullen partículas (patógenos, células muertas y restos celulares) en orgánulos especializados denominados fagosomas, los cuales se fusionan con los gránulos presentes en el citoplasma, quedando la partícula fagocitada expuesta a pépticos antimicrobianos, proteasas, y a especies reactivas de oxígeno (ROS). Las principales proteínas granulares implicadas en la eliminación microbiana son las α -defensinas, las lisozimas, la elastasa de neutrófilos (EN), la catepsina G (CatG) y la proteinasa-3 (PR-3). Durante el proceso también se induce el ensamblaje del complejo multiprotéico de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa. Esta NADPH oxidasa convierte el oxígeno en superóxido (O_2^-), que produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Tanto el O_2^- como el H_2O_2 pueden generar otros compuestos que presentan alta capacidad tóxica como el peroxinitrito o el ácido hipocloroso (HClO). En la fagocitosis, la acción y los efectos de estas sustancias se ejercen en el interior celular y, por tanto, en el exterior del neutrófilo se limitan los efectos nocivos asociados²⁴⁻²⁷.

La degranulación se produce cuando el neutrófilo se encuentra en un microambiente inflamatorio y tiene la posibilidad de liberar al espacio exterior el contenido, previamente mencionado, de los gránulos de su citoplasma. Este proceso favorece el avance de los neutrófilos a través de la matriz liberada y el reclutamiento de otras células del sistema inmunitario, siendo muy útil la capacidad de defensa antimicrobiana del contenido exocitado, que elimina y previene la diseminación del invasor. Ahora bien, dado que es un proceso extracelular, los efectos de la acción de las diversas sustancias, anteriormente comentadas en la fagocitosis, pueden producir daño tisular²⁴⁻²⁷.

La tercera forma de actuación de los neutrófilos es la producción y liberación de las llamadas trampas extracelulares (NETs) al espacio extracelular. Las NETs son estructuras similares a redes compuestas de filamentos de ADN bicatenario nuclear o mitocondrial, recubiertas con histonas y proteínas granulares y citoplasmáticas. Se considera que son una estrategia eficaz para capturar y eliminar microorganismos, ya que proporcionan una alta concentración de sustancias antimicrobianas a nivel local, marcan la zona y actúan como una barrera física que impide la propagación del invasor. Así mismo, se reconoce su importancia de dar forma al entorno inflamatorio al ejercer efectos inmunomoduladores, mediante la activación y diferenciación de macrófagos, células dendríticas y linfocitos B y T²⁷⁻³⁰.

3. TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETS)

La primera descripción de las trampas extracelulares de neutrófilos fue realizada en 1996 por Takei y colaboradores³¹, los cuales estudiando una aceleración de la muerte de los neutrófilos tras la estimulación con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), observaron un tipo de muerte celular distinta a la apoptosis y a la necrosis. Utilizando microscopía electrónica determinaron que la muerte inducida por PMA implicaba la fusión de los lóbulos nucleares, seguida por una hinchazón nuclear y una reducción de la compacidad de la cromatina. La envoltura nuclear se descomponía, permitiendo la mezcla del nucleoplasma con el contenido citoplasmático y de los gránulos, finalmente la membrana plasmática se rompía y el contenido amalgamado se liberaba al medio extracelular.

Posteriormente en 2004 Brinkmann y colaboradores³², a quienes se atribuye el descubrimiento de las NETs, estudiaron con profundidad este tipo de muerte de los neutrófilos. Mediante la utilización de microscopía electrónica de barrido y de transmisión de alta resolución, caracterizaron las propiedades morfológicas únicas del complejo liberado extracelularmente al que denominaron NET y a su proceso de formación NETosis. Empleando analíticas en las que utilizaron tinciones, aplicación de DNAsas y realización de pruebas de inmunofluorescencia, determinaron la composición química del complejo NET. Además, pudieron comprobar que estas estructuras presentaban alta capacidad de unión y eliminación de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri*.

Hemos de comentar que, la formación y el uso de NETs es un mecanismo innato de defensa que se conserva evolutivamente dentro del reino animal y del reino vegetal. Se han descrito en diferentes especies de mamíferos, entre ellos animales de producción: vacas, ovejas y cabras³³, cerdos³⁴ y caballos³⁵, y de compañía: perros y gatos³⁶. También se han identificado en aves, peces e invertebrados³⁷.

Las NETs están compuestas por una estructura base de ADN bicatenario nuclear o mitocondrial con una disposición similar a una red. El ADN que se extruye de los NETs con fines de defensa tiene propiedades antimicrobianas y proinflamatorias en todas las respuestas inmunitarias, puesto que altas concentraciones de ADN pueden quelar cationes metálicos divalentes, presentando la capacidad de destruir las membranas de las bacterias. La estructura en red de ADN sirve de andamiaje para diversas proteínas, siendo el componente fundamental las histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4, que representan aproximadamente el 70% de las proteínas presentes. Estas histonas están a menudo modificadas (p. ej., mediante citrulinación), y muestran características inmunofisiológicas que facilitan la captura de patógenos, la citotoxicidad y la inmunomodulación. En las redes de NET también se encuentran proteínas antimicrobianas como la elastasa de neutrófilos (EN), la mieloperoxidasa (MPO), la catepsina G (CG), la lactoferrina, la pentraxina 3, la gelatinasa,

la proteínasa 3 (PR3), la proteína de alta movilidad del grupo 1 (HMGB1) y la LL-37. Así mismo, se hallan presentes proteínas citosólicas, como las proteínas de unión al calcio (calprotectinas) S100 A8, A9 y A12, la actina y la α -actinina.

En relación con la composición exacta de las NETs, hay que destacar que los primeros estudios realizados se identificaron 24 proteínas distintas, cuyo número fue ampliándose según el estímulo y modelos usados para inducir la NETosis. Más actualmente, en estudios como los realizados por Scieszka y colaboradores³⁸ utilizando espectrometría de masas de alto rendimiento, se han logrado identificar más de 330 proteínas variables según las condiciones de inducción, siendo 74 comunes en todas las preparaciones de NET. Esta variedad está corroborada por estudios realizados mediante el análisis proteómico que indican que, las NET inducidas por diferentes estímulos son heterogéneas tanto en composición proteica como en modificaciones postraduccionales, no dependiendo del estado biológico de los neutrófilos, este hecho sugiere que las NET inducidas en diferentes condiciones podrían tener diferentes efectos biológicos³⁹⁻⁴¹.

4. TIPOS Y MECANISMOS DE FORMACIÓN DE NETS

La formación de NETs, se origina por una amplia gama de estímulos que abarcan componentes microbianos, activadores farmacológicos y señales inflamatorias o tumorales derivadas del huésped.

Antes de describir los procesos de formación de NET comentaremos que, en el año 2018 el Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular (NCCD) realizó una revisión del concepto y el término "NETosis", ya que inicialmente se empleaba para la descripción de todos los tipos y mecanismos de formación de NETs. En dicha revisión se clarificó que la muerte celular que libera trampas extracelulares de neutrófilos debe entenderse más como un proceso de formación de NET, destacando el resultado funcional del proceso y reconociendo que la liberación de ADN puede ocurrir independientemente de la muerte de los neutrófilos⁴².

La formación de NET se rige por tres vías reguladoras principales, cada una controlada por mecanismos moleculares y señales contextuales distintos: 1) La vía inicial, denominada "Formación (o NETosis) suicida o lítica", comienza con la desintegración de la membrana nuclear, seguida de la disolución de la polaridad celular, la descondensación de la cromatina nuclear y, finalmente, la ruptura de la membrana celular, lo que conduce a la muerte celular. 2) Una segunda vía, identificada como "Formación (o NETosis) vital o no lítica", implica la encapsulación de la cromatina nuclear descondensada en vesículas que se expulsan de la célula, este proceso no implica la muerte celular. 3) El mecanismo final es la formación de NET dependiente del ADN mitocondrial, que, al igual que la denominada formación viable,

no se asocia con la muerte celular. En la figura 2 se esquematiza los tres procesos de formación de NETs.

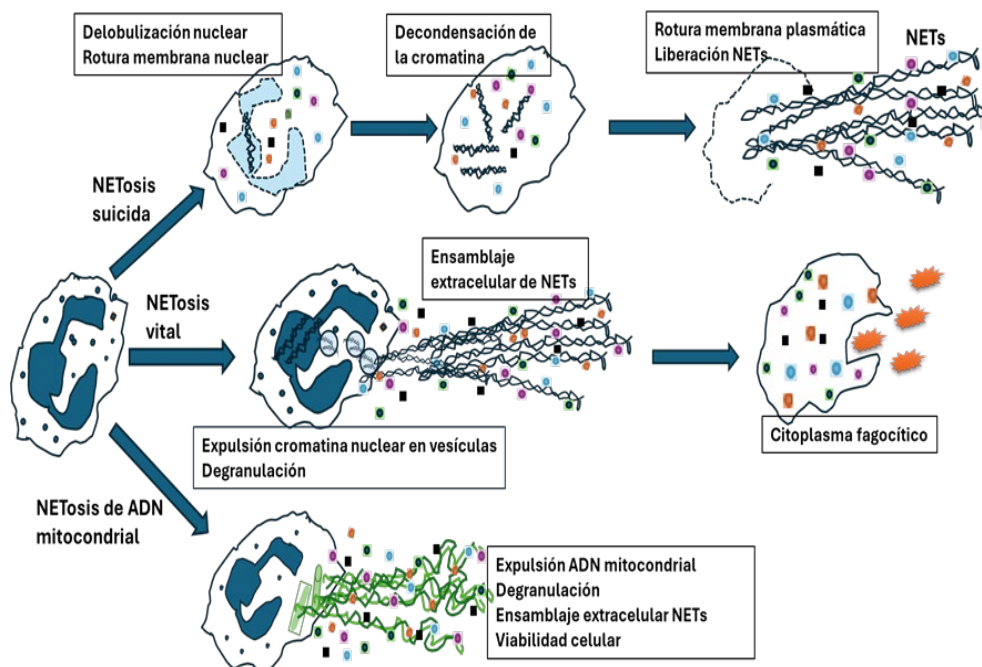


Fig. 2.- Tres procesos de formación (NETosis) de NETs. El primero es la formación clásica suicida o lítica de NETs caracterizada por decondensación de la cromatina nuclear, rotura de membranas, liberación de NETs al exterior y muerte celular. El segundo es la formación vital o no lítica, en la que se libera cromatina nuclear en vesículas y el contenido de las vesículas granulares al exterior celular, donde se ensamblan las NETs, dando lugar a citoplasmas fagocíticos. Y el tercero es la formación de NET a partir de ADN mitocondrial, no requiere lisis del neutrófilo el cual permanece prácticamente intacto y viable.

A nivel molecular, la formación de NETs o NETosis se desarrolla a través de eventos intracelulares altamente orquestados que difieren según la vía reguladora^{26,41,43,44,45}.

1.- Formación (o NETosis) suicida o lítica

La formación (o NETosis) suicida o lítica es la primera y mejor caracterizada vía de formación de NET y, en casi totalidad de los casos se trata de un mecanismo dependiente de la NADPH oxidasa (NOX). Se inicia tras la activación de los receptores de la superficie celular de los neutrófilos por estímulos externos, esta activación conduce a un aumento de los niveles de calcio citoplasmático. Los iones de calcio liberados del retículo endoplásmico activan las cascadas de señalización de la proteína quinasa C (PKC) y la de RAF-MEK-ERK, las cuales contribuyen al ensamblaje y activación del complejo NADPH oxidasa (NOX) de la membrana celular, que genera rápidamente una explosión de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS promueven la translocación de la elastasa de neutrófilos (EN) y la mieloperoxidasa (MPO) desde los gránulos azurófilos al núcleo, donde EN degrada las histonas y MPO facilita la relajación de la cromatina. Al mismo tiempo, los elevados niveles

de calcio en el citoplasma activan a la enzima peptidil arginina deiminasa 4 (PAD4) que cataliza la citrulinación de las histonas nucleares, promoviendo así una relajación adicional de la cromatina. Después de la ruptura de la envoltura nuclear, las histonas citrulinadas y el ADN son expulsados al citoplasma, donde son modificados por proteínas derivadas de gránulos y enzimas citoplasmáticas para formar NET maduros. En las etapas finales, la EN escinde la gasdermina D (GSDMD) proteína que desempeña un papel crucial en la creación de poros en la membrana plasmática, lo que provoca la ruptura de la membrana y la lisis celular con la expulsión extracelular de los NETs, que suele ocurrir entre 2 y 8 horas después del estímulo inicial.

2.- Formación (o NETosis) vital o no lítica

En el año 2010, Pilszczel y colaboradores⁴⁶ descubrieron una nueva forma más rápida de liberación de NETs tras la estimulación de neutrófilos con la bacteria *Staphylococcus aureus*. Esta vía se produce independientemente de NOX y de ROS, dependiendo de la activación directa de PAD4, por diversos estímulos, como microorganismos, las plaquetas activadas, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), los complejos inmunitarios, etc. Se inicia a los pocos minutos del estímulo y en el proceso, a pesar de la extrusión de NETs, se mantiene la integridad de la membrana plasmática, dando como resultado formas celulares anucleadas de neutrófilos, los cuales conservan la capacidad de fagocitar y migrar a través de la señalización de quimiocinas, participando en la vigilancia y defensa inmunitaria. A esta vía se la denominó Formación (o NETosis) vital o no lítica de NETs, e implica el empaquetamiento de la cromatina descondensada en vesículas, que junto con vesículas granulares, se fusionan con la membrana plasmática, de tal forma que se libera el contenido al exterior celular donde se ensamblan las NETs.

3.- Formación (o NETosis) a partir de ADN mitocondrial

Un tercer mecanismo distinto de formación de NETs fue descrito por primera vez en 2009 por Yousefi y colaboradores⁴⁷, que implica la liberación de ADN mitocondrial en lugar de ADN nuclear, y que da como resultado neutrófilos sin mitocondrias, pero que mantienen la integridad nuclear. El proceso se observó cuando los neutrófilos fueron preestimulados con GM-CSF durante 20 minutos, y posteriormente activados con componente 5a del complemento (C5a) y con lipopolisacárido bacteriano (LPS) durante 15 minutos. Este tipo de estimulación, eleva el nivel de calcio citosólico, actuando sobre los canales SK (Small Conductance Potassium Channels) de las mitocondrias, abriéndolos y provocando la generación de ROS mitocondrial (mtROS), que induce a los neutrófilos a liberar rápidamente ADN mitocondrial. Además, se ha demostrado que la atrofia óptica 1 (OPA1), proteína de la membrana interna mitocondrial, está involucrada en la producción de ATP a través de la glucólisis, hecho que facilita la reorganización de la red de microtúbulos y la

posterior liberación de NETs mitocondriales⁴⁸. Aunque este tipo de formación (o NETosis) inducida por mtROS se conoce como independiente de la NADPH-oxidasa, ya se ha demostrado la interacción con la NADPH-oxidasa para producir ROS adicionales⁴⁹. Debemos comentar que, el ADN mitocondrial, además de su función estructural en estas NETs, tiene potentes propiedades proinflamatorias y estimuladoras del interferón tipo I, activando la respuesta inmunitaria innata, y se ha vinculado a la patogénesis de enfermedades autoinmunes.

Como resumen, en la tabla 2 se presenta un esquema comparativo de las características principales de distintos tipos y mecanismos de formación (NETosis) de NETs descritos anteriormente.

Características	NETosis suicida	NETosis vital	NETosis mitocondrial
Duración	2-20 horas	10-60 minutos	15-20 minutos
Composición de ADN	Nuclear	Nuclear	Mitocondrial
ROS	Dependiente	Independiente	Dependiente
PDA4	Independiente	Dependiente	Por identificar
MPO	Dependiente	Por identificar	Por identificar
Membrana nuclear	Rotura	Intacta	Intacta
Membrana celular	Rotura	Intacta	Intacta
Supervivencia	Muerte	Supervivencia	Supervivencia

Tabla 2.- Esquema comparativo de los tipos y mecanismos de formación (NETosis) de NETs. ROS: especies reactivas de oxígeno. PDA4: enzima peptidil-arginina-deiminasa 4. MPO: mieloperoxidasa

5. FUNCIONES DE LAS NETS EN CONDICIONES DE HOMEOSTASIS

Las NETs son capaces de atrapar, aislar, inmovilizar y eliminar patógenos microbianos (bacterias, hongos, virus y parásitos), por lo que desempeñan un papel crucial en la actividad de defensa antimicrobiana del sistema inmunitario del hospedador. Además, las NETs modulan las respuestas de diversas células del sistema inmunitario tanto innato como adaptativo, y en condiciones estrictamente reguladas contribuyen a la reparación y remodelación tisular. En la figura 3 se representa un resumen del papel principal de las NETs en condiciones de homeostasis.

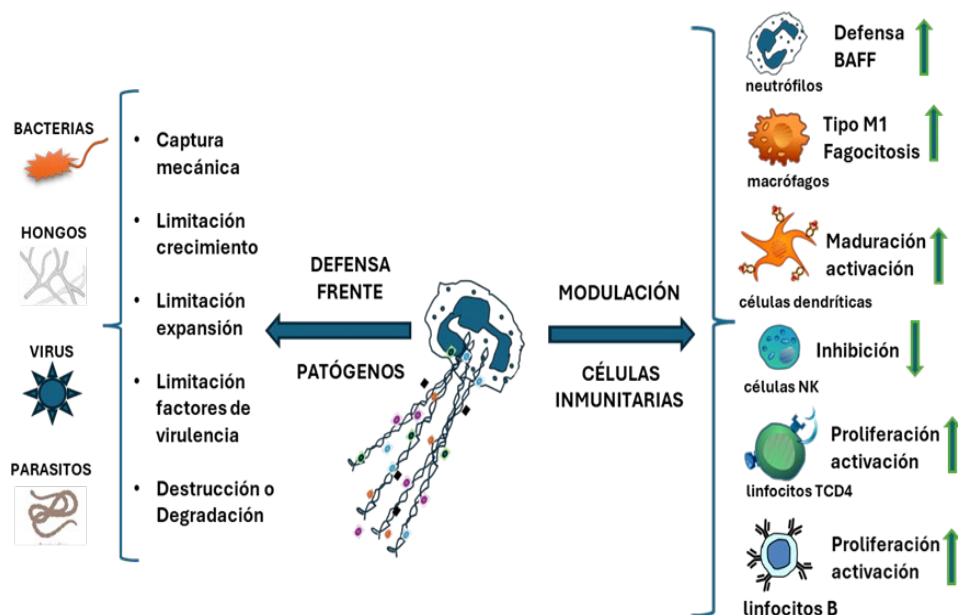


Fig. 3.- Esquema de las principales funciones efectoras de las NETs en condiciones homeostáticas. Defensa frente a los patógenos y modulación de diversas células del sistema inmunitario innato y adaptativo.

A. Función de defensa frente a patógenos

La señal que incita a que los neutrófilos “elijan” como tipo de defensa frente a la invasión de patógenos la formación y liberación de NETs, es una de las preguntas planteadas y debatidas por la comunidad científica.

Inicialmente diversos investigadores, entre ellos el grupo de Brazk y colaboradores⁵⁰, planteaban la hipótesis de que el tamaño del microorganismo patógeno es un factor importante para la liberación de NETs. Dicha hipótesis expone que, se produce una competencia entre la fagocitosis y las NETs para acceder a la elastasa (EN) de los gránulos; los patógenos más pequeños son fácilmente fagocitados en fagosomas que se unen a los gránulos azurófilos, secuestrando la EN, evitando la degradación de histonas y la descondensación de la cromatina. Por el contrario, si el patógeno presenta un tamaño grande su fagocitosis se ve dificultada, provocando que los neutrófilos emprendan un programa de defensa diferente en el que se liberan preferentemente NETs. Sin embargo, está más que demostrado que la liberación de NETs se producen frente a muchos tipos de patógenos extracelulares e intracelulares de muy diverso tamaño, por lo que, se planteó la virulencia de los patógenos como factor discriminante que determina la inducción de NETs⁵¹. Más recientemente, el modelo denominado “desarme del proteoma” clarificó que el proteoma de los neutrófilos se modifica a través de un programa intrínseco celular, que reduce la magnitud del proceso de inflamación e influye en la capacidad de formar NETs. Este programa está controlado por el receptor de neutrófilos CXCR2 y reguladores del reloj circadiano biológico (hipotálamo), que determinan una pérdida diurna progresiva del

contenido de los gránulos y de la capacidad de formar y liberar de NETs en los tejidos⁵². Según todo lo anterior, hay que comentar que actualmente y en general, se apuesta por que los diferentes subconjuntos de neutrófilos, definidos por su estado de activación, contenido proteico y/o ritmo circadiano, son los que presentan diferentes inclinaciones y capacidades para liberar NETs⁵³.

NETs en la defensa frente a bacterias patógenas.

Se ha demostrado que numerosos grupos de bacterias patógenas desencadena la formación de NETs, incluyendo géneros de bacterias Gram positivas (ejemplos, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Propionibacterium*), Gram negativas (ejemplos, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*) y ácido-alcohol resistentes (ejemplo, *Mycobacterium*). Las propiedades antibacterianas de las NETs se deben fundamentalmente al papel que, por su forma en red, efectúan en el atrapamiento e inmovilización del patógeno y a la posterior acción de sus componentes químicos sobre los invasores atrapados^{54,55,56}.

En primer lugar, el entramado de las NETs ocupa entre tres a cinco veces el volumen de la cromatina condensada dentro del neutrófilo que, unido a la naturaleza pegajosa de la red, facilita la captura y neutralización del invasor, impidiendo su propagación en el hospedador. Se considera que los microbios quedan atrapados debido a las interacciones electrostáticas entre la superficie de las bacterias, con carga positiva, y las fibrillas de cromatina, con carga negativa. Posteriormente, el ADN actúa como quelante de cationes que se encuentran unidos a las superficies de las membranas de las bacterias, alterando su integridad⁵⁷. Las histonas, componentes más abundantes de las NETs, poseen propiedades antimicrobianas distintivas inherentes a sus subunidades individuales, en concreto, la intervención combinada de la histona H2A con el péptido LL-37 da lugar a la formación de poros en las membranas y la entrada de H2A en el citoplasma bacteriano induce una reorganización cromosómica y una represión transcripcional⁵⁸.

Como se indicó en apartados anteriores, las redes NETs incluyen una gran cantidad de proteínas antimicrobianas de los gránulos y del citoplasma. La EN elimina eficazmente bacterias al escindir proteínas de la membrana externa y dirigirse a factores de virulencia, por ejemplo, en el caso de *Shigella* actúa sobre el factor IpsB fundamental para la invasión, y sobre el factor IcsA que permite la movilidad intracelular bacteriana. La MPO ayuda a crear un entorno oxidativo muy tóxico que, facilita la degradación del patógeno atrapado mediante la generación de ROS, ácido hipocloroso y cloruro de nitrilo. La lisozima y la alfa-defensina inhiben la producción de hemolisinas y superantígenos esenciales para la infección por *Staphylococcus aureus*. La catepsina G y la PR3 son proteasas granulares que, junto a la elastasa, degradan proteínas presentes en el invasor. Así, la acumulación local y la

respuesta coordinada de varios componentes contribuyen a la eficacia de NETs en la defensa del hospedador.

NETs en la defensa frente a hongos patógenos.

En las infecciones fúngicas o micosis los neutrófilos juegan un papel importantísimo en la defensa del hospedador, y es bien conocido que las afecciones de neutropenia o de deficiencias en las respuestas de los neutrófilos, son factores de riesgo importantes para el desarrollo de micosis sistémicas graves. Por otro lado, los hongos presentan una gran variedad de formas, desde pequeñas levaduras a grandes hifas y biopelículas, lo que requiere diferentes mecanismos de respuesta por parte de los neutrófilos, siendo una buena estrategia la formación de NETs capaces de atrapar al hongo patógeno impidiendo su diseminación y mediante su acción antimicrobiana conseguir su eliminación⁵⁹⁻⁶¹.

Se ha descrito la formación de NETs en muy diversas micosis producidas por hongos patógenos como son *Candida albicans* y otras especies de *Candida spp*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* y *Scedosporium apiospermum*. Las NETs pueden ser inducidas por diversos componentes fúngicos y proteínas secretadas por los hongos, en general, se describen diversos componentes de las paredes celulares fúngicas, el manano, los beta-glucanos y la quitina, como los patrones moleculares asociados a patógenos reconocibles por los neutrófilos.

Diversos estudios han identificado a la calprotectina como un importante efector antifúngico presente en las NETs. Se trata de un complejo proteico en el citoplasma de los neutrófilos compuesto por subunidades S100A8 y S100A9, que se libera como componente de NETs, cuya función consiste en la quelación de micronutrientes Mn^{2+} y Zn^{2+} esenciales para el crecimiento fúngico. Hay que añadir que, en la acción antifúngica de las NETs los compuestos EN, MPO y lactoferrina juegan un papel importante ya que, colectivamente alteran las membranas fúngicas aumentando la permeabilidad de las mismas y, en última instancia, provocando la muerte del patógeno^{62,63}.

NETs en la defensa frente a parásitos.

Las primeras investigaciones realizadas sobre la inducción de la formación de NETs se centraron en los protozoos *Leishmania*, *Toxoplasma*, *Plasmodium* y el nematodo *Strongyloides*, mientras que las más actuales incluyen a los protozoos *Eimeria* y *Trypanosoma*, y al nematodo *Trichinella*. En general el papel protector defensivo de las NETs sigue siendo poco conocido, la mayoría de los parásitos son capturados restringiendo su transmisión, pero no se erradican por completo⁶⁴⁻⁶⁶.

NETs en la defensa frente a virus.

La capacidad que muestran muchos virus para desencadenar un fuerte reclutamiento de neutrófilos sugiere que los NET probablemente presentan una intervención destacable en

la defensa antivírica. Se ha informado la actuación de los NET contra patógenos como el virus de la influenza A (IAV), el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), el virus respiratorio sincitial (RSV), virus Zika (ZIKV), virus de la varicela-zóster (VZV), coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS.CoV-2), Hantavirus (HTNV), virus de la hepatitis B (HBV), virus del Dengue (DV) y parvovirus B19 (B19V). Además, se ha indicado que son diversas las moléculas virales implicadas en el reconocimiento de los virus por parte de los neutrófilos y, por tanto, en la formación de NETs, entre los que se encuentran proteínas estructurales de la cápside (N), de las espículas (S) o de la envoltura (F), y genomas víricos, como es el caso de los ARN monocatenarios (ARNss).

Estudios recientes han demostrado que, como en otros patógenos, las NETs pueden unirse mecánicamente y atrapar virus, como consecuencia del andamiaje de ADN altamente viscoso de la red. El efecto directo de eliminación de las NETs sobre los virus se lleva a cargo fundamentalmente por las histonas H3 y H4 ricas en arginina que muestra una buena actividad de agregación y neutralización vírica. Por otro lado, las histonas H1 y H2A, junto con la alfa-defensina y la MPO son capaces de alterar las envolturas víricas e inhibir procesos de transcripción del genoma del patógeno. Además, y en concreto, las serinas proteasas pueden reconocer, unirse y escindir sitios críticos de la proteína F de la envoltura, bloqueando así la fusión del virus con las membranas de la célula hospedadora^{55,67,68,69}.

B. Función de modulación células inmunitarias

Más allá de su función de defensa antimicrobiana directa, las NET ejercen una profunda influencia en la regulación de la inmunidad innata y adaptativa, ya que diversos componentes como, el ADN, la proteína de alta movilidad tipo 1 (HMGB1), el péptido LL-37 y las alfa-defensinas, poseen una potente actividad biológica y funcionan como una señal de peligro clásica. Dichas señales son reconocidas por células inmunitarias vecinas o distantes, incluyendo otros neutrófilos, macrófagos, células asesinas naturales (NK), células dendríticas (DC) y linfocitos B y T. Estas células inmunitarias poseen receptores endosomales y citosólicos capaces de iniciar respuestas inmunitarias, de esta forma se evidencia el papel significativo de las NETs en el impulso de la inflamación y la orquestación de respuestas inmunitarias adaptativas⁷⁰⁻⁷⁴.

- En relación con los neutrófilos, las NETs son capaces de activar varias funciones de estas células, como son la exocitosis de gránulos, la generación de ROS y de la NADPH oxidasa y el aumento de la fagocitosis, por lo que se refuerza la erradicación de patógenos microbianos. Además, las NETs poseen la capacidad de conectar la respuesta innata y la adaptativa a través de la secreción de la citoquina BAFF (factor activador de los linfocitos B) por parte de los neutrófilos, la cual promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación de los linfocitos B.

- Las investigaciones actuales indican que los neutrófilos formadores de NETs pueden activar macrófagos a través de vías de señalización en las primeras etapas de la inflamación multicelular. El ADN de las NETs contribuye a la activación y polarización de los macrófagos al tipo M1 proinflamatorios, a través de la vía de señalización TLR9/NF- κ B. Además, el ADN activa a la enzima guanosina monofosfato cíclica-adenosina monofosfato sintasa (cGAS), hecho que conlleva la producción de interferones tipo I (IFN-I) y la liberación de citoquinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8, etc.) por parte del macrófago, amplificando el reclutamiento de células inmunitarias. Igualmente, se ha demostrado que las NETs facilitan la fagocitosis de los macrófagos, al funcionar como pseudoopsoninas y al tener la capacidad de transferir péptidos antimicrobianos específicos (AMP) de los neutrófilos a los macrófagos.
- Las células NK son un subconjunto significativo de células inmunitarias innatas citotóxicas que actúan frente a células tumorales y células infectadas por patógenos intracelulares (ejemplo COVID-19). Se ha demostrado que la función de las NK es principalmente inhibida por las NETs mediante la molécula de adhesión celular relacionada con la molécula antígeno carcinoembrionario 1, que es un regulador negativo de las células NK⁷⁵.
- Las NETs tienen un doble impacto en la función de las células dendríticas (DC). Por un lado, interfieren en el proceso de diferenciación de los monocitos en células dendríticas, reprogramando el desarrollo de células dendríticas derivadas de monocitos en un fenotipo de macrófago antiinflamatorio. Por otro lado, las moléculas MPO, LL37 y la proteína de alta movilidad del grupo 1 (HMGB1) presentes en las NETs promueven la captación y el reconocimiento del ADN propio por las células dendríticas plasmocitoides (pDC) activando la producción y liberación de interferón-1 (IFN-I). La activación de pDC influye en su capacidad de inducir la diferenciación de linfocitos TCD4+ vírgenes en subconjuntos de linfocitos Th17 y Th1, que coordinan respuestas frente a patógenos extracelulares e intracelulares respectivamente.
- Los linfocitos B al reconocer un antígeno específico mediante su receptor BCR, experimentan una rápida proliferación y un gran grupo de ellos se diferencian en células plasmáticas generadoras de anticuerpos. Las NETs son capaces de activar a los linfocitos B mediante la acción de las histonas citrulinadas, componentes fundamentales de la red, que son reconocidas como un antígeno clásico, mejorando así las capacidades de defensa inmunitaria. Además, los complejos LL-37-ADN en las NETs poseen la capacidad distintiva de localizarse en los compartimentos endosomales de los linfocitos B e inducir la activación de células B policlonales, así como de amplificar selectivamente las células B memoria autorreactivas. Por tanto, las NETs juegan un importante papel en la mediación de las respuestas inmunes humorales,

- Diversas investigaciones han demostrado que las NETs pueden regular significativamente la función de los linfocitos T a través de mecanismos directos e indirectos, que promueven la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos T. Las NETs intervienen en la diferenciación de los linfocitos T CD4+ vírgenes promoviendo la diferenciación hacia linfocitos T reguladores (Tregs), pudiendo suprimir la respuesta inmune. Además, las NETs pueden reducir directamente el umbral de activación de las células T CD4+ a través de una vía mediada por su receptor TCR, mejorando así su respuesta a estímulos antigénicos subóptimos y promoviendo respuestas inmunitarias específicas de antígeno. Por otro lado, las histonas presentes en las NETs pueden activar directamente a los linfocitos TCD4+ y potenciar específicamente la diferenciación de células Th17 (productoras de IL-17), lo cual está ligado a la autoinmunidad. Hay que añadir que, en el microambiente tumoral, las NETs promueven la disfunción y el agotamiento de los linfocitos TCD8+ citotóxicos, a través de una interacción multifacética de desregulación metabólica (reducción de la actividad mitocondrial y captación de glucosa), activación de puntos de control inmunitarios y barreras físicas que restringen la infiltración de linfocitos T.

6. ESTRATEGIAS DE EVASIÓN DE LAS NETS POR LOS PATÓGENOS

Aunque la formación de NETs por los neutrófilos permite contener y eliminar patógenos ejerciendo un importante papel de defensa en el hospedador, los patógenos, a su vez, han desarrollado diferentes estrategias de evasión a la acción de este tipo de inmunidad innata. Sin duda es una estrategia de supervivencia generalizada que permite a los patógenos proliferar y propagarse, y muchos de ellos comparten características comunes en la forma en que modulan tanto la liberación como la actividad de las NETs^{56,61,65,69}. Según las investigaciones realizadas podemos dividir estas tácticas en tres categorías principales: inhibición de la formación y liberación de las NETs por los neutrófilos, mecanismos de resistencia a la acción de las NETs, y degradación de la estructura y componentes de las NETs^{75,76,77,78,79}. Hemos de hacer constar la importancia de dilucidar estos mecanismos de escape, ya nos proporciona conocimientos sobre el desarrollo de terapias antimicrobianas dirigidas a la regulación de la formación (NETosis) de las NETs.

A. Inhibición de la formación y liberación de las NETs

Se han detectado diversas estrategias empleadas por los microorganismos capaces de inhibir la liberación de las NETs (Figura 4):

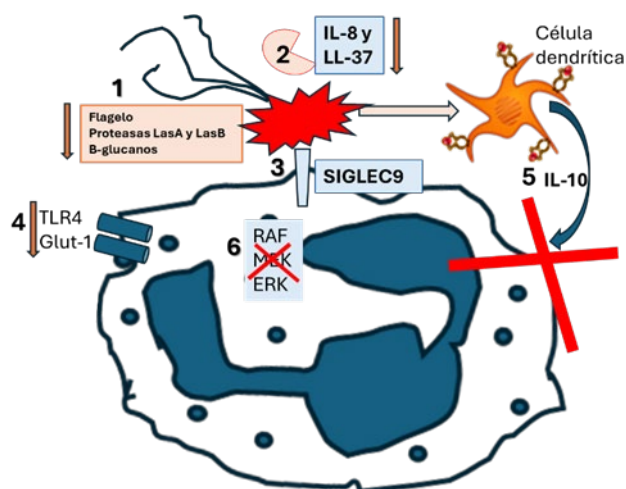


Fig. 4.- Esquema de las estrategias de los patógenos para inhibir la formación de NETs. 1) Regulación de fenotipos microbianos. 2) Degradación de moléculas estimulantes de NETs. 3) Estimulación de receptores supresores de NETs. 4) Inhibición de señales implicadas en la formación de NETs. 5) Interacción con otras células inmunitarias supresoras de NETs. 6) Inhibición de la cascada RAF-MEK-ERK generadora de ROS.

A.1. Una estrategia simple es la regularización negativa los fenotipos microbianos que están asociados a la estimulación, como es el caso de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* que pierde su capacidad de motilidad por flagelos durante la colonización pulmonar, o que presenta la posibilidad de regular la expresión de las proteasas LasA y LasB, ambas capacidades promueven la disminución de la formación de NETs; igualmente se ha demostrado en el caso de la levadura *Candida albicans* que muestra la facultad de modificar su superficie reduciendo la disponibilidad de presentar β -glucanos, conocidos inductores moleculares de NETs.

A.2. Inhibición de moléculas estimulantes de las NETs como son la interleuquina IL-8 y el péptido antimicrobiano LL37. La IL-8 es un importante quimioatrayente y activador de neutrófilos, sin embargo, los estreptococos del grupo A (GAS) pueden secretar la proteasa SpyCEP capaz de escindir la IL-8, o también producir la toxina denominada estreptolisina O (SLO) que impide la liberación de IL-8 y de elastasa de los neutrófilos. En el caso de *Streptococcus suis* se ha detectado la producción de la proteasa ApdS que al actuar sobre la molécula de LL-37 separa los aminoácidos N-terminales escindiendo la molécula.

A.3. Estimulación de ciertos receptores presentes en los neutrófilos que regulan la formación de NETs, siendo los estreptococos del grupo B (GBS) un ejemplo de estrategia ya que en su cápsula contienen un polisacárido sialilado que puede unirse al receptor SIGLEC9 del neutrófilo, dicha unión conduce a la supresión de la producción de ROS y de la liberación de NETs. También se ha demostrado que el receptor SIGLEC9 se puede unir a moléculas de ácido hialurónico de alto peso molecular, como es el HMW-HA presente en las cápsulas de GAS, la interacción conduce como en el caso anterior a una menor producción de ROS y de NETs

A.4. Inhibición de señales y componentes implicados en la formación de NETs, en concreto, se ha comprobado que cepas de *Escherichia coli* uropatógenas secretan la proteína TcpC que, reduce las concentraciones de transcripción y proteína en neutrófilos como el receptor Toll 4 (TLR4), la mioeloperoxidasa (MPO) y el factor de necrosis tumoral (TNF), moléculas impulsoras de la producción de NETs. Además, esta proteína TcpC funciona como una enzima que promueve la degradación de PAD4, molécula fundamental para la citrulinación de histonas paso necesario para la formación de NETs. Hay que añadir, que la formación de NETs requiere requisitos energéticos, presencia de glucosa y la glucólisis, de forma que durante la producción de NETs aumenta la expresión del transportador de glucosa GLUT-1, en este sentido se ha comprobado que el serotipo 2 del virus del Dengue (DENV) inhibe la expresión de Glut-1 y por tanto la captación de glucosa necesaria por los neutrófilos para la formación de NETs.

A.5. Interacciones complejas del patógeno que involucran otras células inmunitarias e interleuquinas. En el contexto de las infecciones virales se ha demostrado con bastante frecuencia que varios virus evaden la formación de NETs a través de IL-10. En concreto, el virus de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1) mediante la glicoproteína de su envoltura se une a las células dendríticas estimulando a que produzcan IL-10, citoquina que inhibe el ensamblaje de la NADPH, la producción de ROS y la translocación de la elastasa de los neutrófilos al núcleo, inmunosuprimiendo la formación de NETs. De la misma forma actúa el herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) que codifica el antígeno nuclear asociado a latencia 1, este antígeno estimula la expresión de IL-8 celular. En otro sentido, se ha comprobado en el genoma de algunos virus de ADNbc, citomegalovirus humano (HCMV) o virus de Epstein-Barr (EBV), la existencia de homólogos de IL-10 que también pueden modular la formación de NETs de forma similar a la IL-10 del hospedador. Además, otras investigaciones han demostrado que las vesículas extracelulares liberadas por el parásito platelminto *Schistosoma japonicum* presentan una elevada expresión de la molécula Sja-miR-71a capaz de inducir la sobreexpresión de IL-10 inhibiendo la formación de NETs.

A.6. Inhibición de la producción de ROS por los neutrófilos formadores de NETs. En apartados anteriores se explicó la importancia de la generación de ROS citosólica o mitocondrial para la generación de NETs, por tanto, es evidente que los patógenos emplean estrategias para inhibir la elaboración de ROS. En bacterias tenemos como ejemplo la táctica de *Bordetella pertussis* que produce la toxina adenilato ciclasa (ACT), que puede unirse a los neutrófilos translocando su dominio catalítico e inhibiendo la activación de la cascada de quinasas RAF-MEK-ERK y, por tanto, inhibiendo la generación de ROS. Análogamente, el virus de la hepatitis B (VHB), en particular sus proteínas HBVC y HBVE, reduce la producción de ROS y la posterior liberación de NET al inhibir las vías de señalización de ERK, p38 y MAPK.

B. Mecanismos de resistencia a la acción de las NETs.

Numerosas investigaciones han descrito distintos mecanismos de resistencia a la acción de las NETs, elaborados por algunos microorganismos patógenos, fundamentalmente bacterias y hongos, una vez que se encuentran en el entorno de acción de estas redes de defensa (Figura 5).

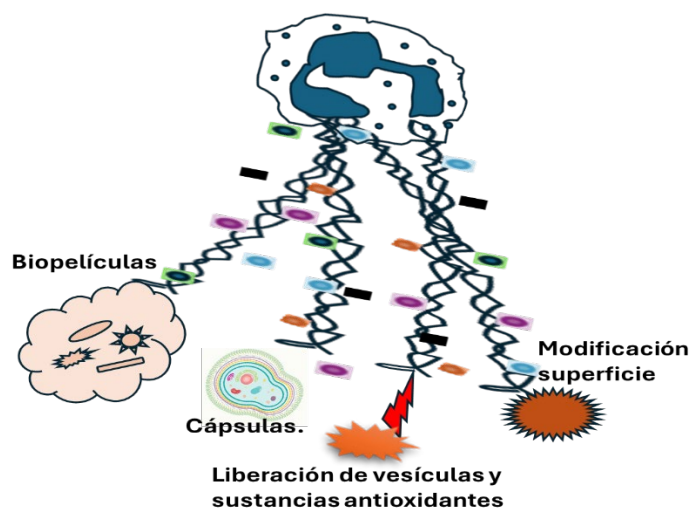


Fig. 5.- Esquema de mecanismos de los patógenos para resistir la acción de las redes NETs. Los mecanismos más conocidos son: la formación de biopelículas (biofilms), la encapsulación, la liberación de vesículas o de sustancias antioxidantes y la modificación de la composición y carga de la superficie microbiana.

B.1. Formación de biopelículas. Las biopelículas son comunidades microbianas (bacterias o hongos) que crecen agregadas e incrustadas en una matriz extracelular de polisacáridos producida por ellas mismas, la cual favorece la adhesión covalente sobre superficies inerte y vivas, además de servir para crear un ambiente protector que permite el crecimiento, la colonización y la evasión a la acción del sistema inmunitario. La resistencia a la acción de NETs se ha demostrado en biopelículas de bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, en cuya matriz incorpora ADN de las NETs, generando tolerancia a los péptidos antimicrobianos de la red. También se ha comprobado en *Haemophilus influenzae*, cuyas biopelículas contienen glicoformas de lipoolisacáridos sialilados que permiten la evasión en la red de NETs. Igualmente se ha publicado que, el serotipo 2 de *Streptococcus suis* inhibe la liberación de NET a través de la matriz extracelular de la producción de biopelícula.

Este mecanismo de resistencia a las NETs también se ha verificado en las biopelículas producidas por la levadura *Candida albicans* compuestas por mananos ramificados asociados con β -1,6 glucanos que, junto a la secreción de adhesinas, adsorben las proteínas de NETs.

B.2. Formación de cápsula como estructura más externa de microorganismo. Las cápsulas sirven como factores de virulencia en ciertos microorganismos que permiten evitar la

respuesta inmunitaria. La composición, el grosor y las propiedades físicas participan en la evasión de los patógenos tras su captura por las NETs. En el caso de la levadura *Cryptococcus neoformans* el componente glucoronoxil manano de su cápsula es esencial para inhibir las NETs y bloquear la producción de ROS. Se ha indicado que en la neumonía primaria inducida por *Streptococcus pneumoniae* (serotipos 1, 2, 4 y 9V), la resistencia a la captura y eliminación por NETs está estrechamente correlacionada con el grosor de la cápsula bacteriana y es proporcional a la gravedad de la enfermedad.

B.3. Liberación de vesículas o sustancias antioxidantes. Es el caso de las cepas citotóxicas de *Pseudomonas aeruginosa* que presentan la capacidad de exportar al exterior de la bacteria vesículas de membrana externa (VME) que sirven como un señuelo para la captura realizada por NETs. Esta estrategia también se ha detectado en *Neisseria meningitidis*. En otro sentido, se ha demostrado que en *Haemophilus influenzae* produce enzimas antioxidantes como la peroxirredoxina-glutarredoxina y la catalasa (codificada por el gen *hktE*). Estas enzimas confieren resistencia a la acción del peróxido de hidrógeno y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) presentes en las NETs.

B.4. Modificaciones de la carga y composición de la superficie bacteriana. Las redes de NETs se adhieren a fosfolípidos cargados negativamente en la membrana de los patógenos a través de afinidad electrostática. Sin embargo, ciertas bacterias pueden modificar su superficie celular con el objeto de disminuir la afinidad de unión por las proteínas antimicrobianas liberadas por las NETs. Esta estrategia se observa comúnmente en varias bacterias grampositivas, como GAS, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Listeria monocytogenes*. Estas bacterias activan operones específicos que incorporan D-alanina en su peptidoglicano, disminuyendo así la carga negativa de la pared celular.

Otra posibilidad es la de modificar la composición de la superficie recubriéndola con proteínas u otras moléculas capaces de resistir las acciones de NETs. Este mecanismo se ha descrito en algunas cepas de GAS que pueden recubrirse con una proteína llamada M1 que las protege de la acción del péptido antimicrobiano LL-37. *Staphylococcus aureus* también codifica una proteína, FnBPB, que se ancla a la pared celular capaz de unirse a las histonas de NETs protegiendo al patógeno. Los galactosaminogalactanos (GAG) unidos a la pared celular del hongo *Aspergillus fumigatus* le hacen resistente a las NETs, ya que GAG puede sufrir desacetilación, lo que le hace capaz de repeler proteínas catiónicas de NETs. Por otro lado, se sabe que RodA es el principal componente proteico de la superficie de los conidios de *Aspergillus fumigatus*, no presente en las hifas, esta molécula (RodA) en los conidios actúa como un factor fundamental en la inhibición de la formación de NETs. En el caso de los parásitos, los promastigotes de *Leishmania* pueden recubrir su superficie con lipofosfoglicanos (LPG) que funcionan como una barrera física que permite resistir la acción de las NETs.

C. Degradación de la estructura y componentes de las NETs

C.1. Degradación del ADN. Como bien sabemos el esqueleto principal de las redes de las NETs son los filamentos de ADN nuclear o mitocondrial, por lo que una importante estrategia de evasión de los patógenos es tratar de degradar ese esqueleto de ADN. Las nucleasas (ADNasas y ARNasas) son enzimas responsables de escindir los enlaces fosfodiéster que unen los nucleótidos de los ácidos nucleicos y, un gran número de investigaciones han demostrado la producción de ADNasas por muchos y diversos grupos microbianos, siendo un factor anti-NETs altamente conservado en los patógenos. Podemos señalar que, en los parásitos *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma evansi* se han identificado dos DNasas TatD, que permiten la ruptura de las redes de las NETs. También, se ha comprobado en los promastigotes de *Leishmania infantum* la expresión de la enzima 3'-nucleotidasa/nucleasa (3'NT/NU), capaz de escindir las trampas NETs liberadas. Esta misma enzima 3'NT/NU es producida por las levaduras *Candida albicans* y *Candida glabrata*, permitiendo que estos microorganismos puedan escapar de su atrapamiento en las NETs.

En consonancia con esta estrategia, bacterias como estreptococos del grupo A (*Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae* y *S. suis serotipo 2*) secretan las endonucleasas Sda1, EndA y SSnA que promueven la degradación de NETs. En otros casos, se ha detectado actividades nucleasas dependientes de la presencia de los cofactores Ca²⁺ y Mg²⁺, como es el de *Neisseria gonorrhoeae* que expresa la termonucleasa Nuc, o el de *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma bovis* que utilizan las nucleasas Mpn491 y MnuA respectivamente. Particular interés presentan algunas bacterias que, tras la degradación de las NETs por las nucleasas, son capaces de utilizar los grupos fosfato liberados para su nutrición y proliferación. Este mecanismo se ha comprobado en *Staphylococcus aureus* que expresa la nucleasa Nuc que facilita la ingestión del ADN de las NETs. Nucleasas similares son las secretadas por *Vibrio cholerae* (Dns y Xds) y por *Pseudomonas aeruginosa* (EddB) que degradan el ADN extracelular sirviendo, así como recurso nutricional para el crecimiento bacteriano.

En el caso de los virus se ha indicado que pueden codificar y expresar proteínas que presentan actividad nucleasa, entre ellos se ha señalado la proteína no estructural nsp14 del SARS-CoV-2, la proteína Vhs componente del tegumento del virus del herpes simple (VHS), la proteína PA-X del virus de la influenza aviar (IVA) y la proteína SOX del virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (VHSK), todas ellas con actividad endonucleasa pudiendo influir en la alteración de la estructura de las NETS.

C.2. Degradación de algunas proteínas antimicrobianas presentes en las NETs. Estrategia demostrada en *Streptococcus suis* y derivada de la acción de su proteasa ApdS que escinde eficazmente la proteína LL-37 con actividad antimicrobiana dentro de la red de NETs.

C.3. Degradación de histonas. La enzima peptidil-arginina-deiminasa 4 (PAD4) de los neutrófilos formadores de NETs, cataliza la citrulinación de las histonas nucleares siendo, por tanto, esencial para la actividad antimicrobiana de las NETs. En este sentido se ha señalado que las bacterias pueden secretar su propia arginina deaminasa (PAD), que modifica histonas citrulinadas secretadas induciendo a que tengan menor carga positiva, desfavoreciendo la interacción con la membrana bacteriana, mecanismo mostrado por la bacteria *Porphyromonas gingivalis*.

7. ELIMINACIÓN DE LAS NETS POR EL SISTEMA INMUNITARIO

El control de la formación y eliminación de las NETs por el sistema inmunitario es inevitable para mantener la homeostasis tisular, ya que es bien conocido el potencial que presentan las NETs para exacerbar el daño tisular en condiciones de inflamación sostenida o estímulos persistentes.

En general, la eliminación de las NETs en condiciones homeostáticas se considera como un proceso realizado en dos pasos en el que, en primer lugar, las NETs se fragmentan y posteriormente se realiza la eliminación de los fragmentos o restos de NETs por células fagocíticas^{45, 54, 63, 80-83}. En la figura 6 se esquematiza el proceso de eliminación de las NETs en condiciones de homeostasis.

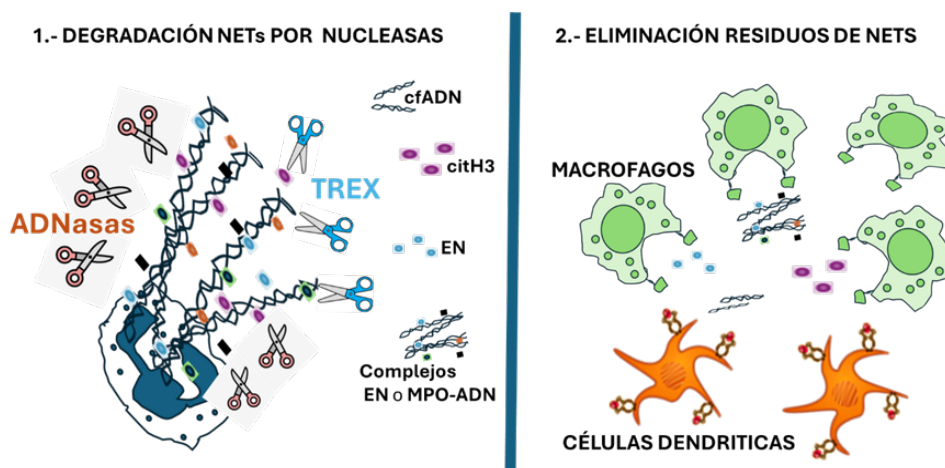


Fig. 6.- Esquema del proceso de eliminación de las NETs en homeostasis. Los pasos son: 1.- Fragmentación de la red de NETs por nucleasas (ADNasas y TREX) liberando productos de degradación, como el ADN libre de células (cfADN), histona 3 citrulinada (citH3), elastasa (EN) y complejos EN-ADN o mieloperoxidasa (MPO)-ADN. 2.- Eliminación de los residuos por parte de macrófagos y células dendríticas.

1. Fragmentación de la red de las NETs. Sin duda, las ADNasas desempeñan un papel central en la degradación de las NET, que se logra mediante la actuación de las ADNasas de la familia I producidas principalmente por el páncreas y los riñones y que están presentes en fluidos

corporales, siendo particularmente importantes en este contexto la ADNasa1 y la ADNasa1L3.

Las enzimas de la familia de las 3'-exonucleasas (TREX1 y TREX2) también contribuyen a la degradación de las NET. Un papel relevante de la familia TREX en el proceso de degradación de las NET está relacionado con su potencial para destruir el ADN oxidado que es resistente a las ADNasas. Debemos recordar que el estrés oxidativo es un mecanismo importante en el proceso de formación de las NET, por eso, la forma oxidada del ADN está presente y expuesta en las NET.

2. Eliminación de los remanentes de las NETs. Tras la fragmentación de la red de las NETs, en el paso anterior, quedan libres remanentes o residuos de los componentes de dicha red, tales como, moléculas pequeñas de ADN libre de células (cfADN), histona H3 citulinada (citH3), elastasa de neutrófilos (EN) y complejos EN-ADN o de mieloperoxidasa (MPO)-ADN. Estos restos también deben ser eliminados, acción llevada a cabo principalmente por macrófagos y células dendríticas a través de un proceso cooperativo.

El principal mecanismo lo realizan los macrófagos, tanto macrófagos M2 (tipo antiinflamatorio) como M1 (tipo proinflamatorio), siendo más eficientes el tipo M2. Su actuación se ve facilitada por la opsonización de los fragmentos de las NETs por el factor del complemento C1q, que marca dichas moléculas para su reconocimiento por receptores de los macrófagos. Una vez que los residuos son internalizados en el fagosoma de los macrófagos, se fusionan con lisosomas y en el interior del fagosoma son degradados por ADNasas ácidos y catepsinas, actuando preferentemente TREX1. Hay que añadir que suele ser un proceso no inflamatorio diseñado para no causar daño adicional.

En el caso de las células dendríticas (CDs), el proceso es similar al realizado por los macrófagos siendo las CDs inmaduras las que pueden fagocitar material resultante de la fragmentación de NETs a través de sus receptores tipo toll (TLR9) y, estas CDs suelen participar especialmente en ganglios linfáticos o tejidos conectivos.

8. OBSERVACIONES FINALES

Desde el descubrimiento inicial de las trampas extracelulares de los neutrófilos (NETs) se han logrado significativos avances en la comprensión de la formación, composición y funciones de las NETs, tanto mediante investigaciones de laboratorio como por observaciones clínicas. Ambos procedimientos, han revelado su papel fundamental en la defensa llevada a cabo por el sistema inmunitario innato, así como que este papel se extiende más allá de la defensa innata, ya que influyen en el inicio y regulación de la

inmunidad adaptativa. Sin embargo, actualmente hay numerosas evidencias de que las NETs presentan un arma de doble filo, ya que son capaces de promover el daño tisular y la inflamación en muchas enfermedades, bien por una deficiente eliminación o por una sobreexpresión. Es evidente que se debe continuar el trabajo que nos permita un mayor conocimiento de la regulación de los niveles de formación y eliminación de las NETs, que ayudará a formular estrategias de investigación futura para el mantenimiento de la homeostasis y para el tratamiento clínico de enfermedades asociadas a la acción no controlada de las NETs.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Borregaard N. (2010) **Neutrophils from marrow to microbes**. *Immunity* 33. November 24:657-670. doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.011
2. Malech HL, DeLeo FR, Quinn MT. (2014) **The Role of neutrophils in the immune system: An overview**. *Methods Mol Biol.* 1124: 3–10. doi:10.1007/978-1-62703-845-4_1.
3. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. (2014) **The multifaceted functions of neutrophils**. *Annu Rev Pathol* 9: 181–218. doi: 10.1146/annurev-pathol-020712-164023
4. Shafqat A, Khan JA, Alkachem AY, Sabur H, Alkattan K, Yaqinuddin A, Sing GK. (2023) **How neutrophils shape the immune response: Reassessing their multifaceted role in health and disease**. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 17583. <https://doi.org/10.3390/ijms242417583>
5. Hageb A, Farjia M, Osei-Sarpong C, Silvestre-Roig C (2025) **Ontogenetic drivers of neutrophil heterogeneity**. *Experimental Hematology* November 151: 104863. doi: 10.1016/j.exphem.2025.104863.
6. Tizard I, (2024) **Cellular innate immunity: Leukocytes**. Chapter n.6. Pag:43-53 In: *Veterinary Immunology*. Eleventh Edition. ISBN-13: 978-043109751.
7. Silvestre-Roig C, Fridlender ZG, Glogauer M, Scapi P. (2019) **Neutrophil diversity in health and disease**. *Trends Immunol.* 40 :565–83. doi: 10.1016/j.it.2019.04.012.
8. Juzenaite G, Secklehner J, Vuononvirta J, Helbawi Y, Mackey JBG, Dean C, Harker JA, Carlin LM, Rankin S, De Filippo K. (2021) **Lung marginated and splenic murine resident neutrophils constitute pioneers in tissue-defense during systemic E. coli challenge**. *Front Immunol* 12: 597595. doi:10.3389/fimmu.2021.597595.
9. Aroca-Creviller A, Vicanto T, Ovodias S, Hidalgo A. (2024) **Neutrophils in physiology and pathology**. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 19:227-259. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-051222-015009.
10. Rosales C (2018) **Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types?** *Front. Physiol.* 9:113. doi: 10.3389/fphys.2018.0011.
11. Hidalgo A, Chilvers ER, Summers C, Koenderman L. (2019) **The Neutrophil life cycle**. *Trends Immunol.* 40 (7), 584–597. doi: 10.1016/j.it.2019.04.013.
12. Futosi K, Fodor S, Mocsai A. (2013) **Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways**. *Internacional Immunofarmacol.* 17(3):638–650. doi: 10.1016/j.intimp.2013.06.034.
13. Häger M, Cowland JB, Borregaard, N (2010) **Neutrophil granules in health and disease**. *J. Intern. Med.* 268, 25–34. doi: 10.1111/j.1365-2796.2010.02237.x.

14. Kolaczowska E, y Kubers P. (2013) **Neutrophil recruitment and function in health and inflammation**. Nat. Rev. Immunol. 13, 159–175. doi: 10.1038/nri3399.
15. Fingerhut L, Dolz G, de Buhr N. (2020) **What is the evolutionary fingerprint in neutrophil granulocytes?** Int.J. Mol. Sci 21, 453. doi: 10.3390/ijms21124523.
16. Semerad CL, Liu F, Gregory AD, Stumpf K, Link DC. (2002) **G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood**. Immunity 17: 413–423. doi:10.1016/S1074-7613(02) 00424-7.
17. Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. (2010) **CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow**. J Clin Invest 120: 2423–2431, 2010. doi:10.1172/JCI41649.
18. Garley M, Jabłonska E. (2018) **Heterogeneity among neutrophils**. Arch. Immunol. Ther. Exp. 66:21–30 <https://doi.org/10.1007/s00005-017-0476-4>.
19. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. (2010) **Neutrophil kinetics in health and disease**. Trends Immunol 31: 318–324. doi:10.1016/j.it. 2010.05.006.
20. Liew PX, Kubers P. (2019) **The Neutrophil's role during health and disease**. Physiol. Rev 99: 1223–1248. doi:10.1152/physrev.00012. 2018
21. Pérez-Figueroa E, Álvarez-Carrasco P, Ortega E, Maldonado-Bernal C. (2021) **Neutrophils: many ways to die**. Front. Immunol. 12:631821. doi: 10.3389/fimmu.2021.631821.
22. Filep JG. (2022) **Targeting neutrophils for promoting the resolution of inflammation**. Front. Immunol. 13:866747. doi: 10.3389/fimmu.2022.866747.
23. Kraus RF and Gruber MA (2021) **Neutrophils—from bone marrow to first-line defense of the innate immune system**. Front. Immunol. 12:767175. doi: 10.3389/fimmu.2021.767175.
24. Burn GL, Foti A, Marsman G, Patel Df, Zychlinsky A (2021) **The neutrophil**. Immunity 54 (7): 1377-1391. doi: 10.1016/j.immuni.2021.09.0
25. Lee M, Lee SY, Bae Y-S (2022) **Emerging roles of neutrophils in immune homeostasis**. BMBReports 55 (10): 473-480. doi: 10.5483/BMBRep.2022.55.10.115.
26. Zhang F, Xia Y, Su J, Quan F, Zhou H, Li Q, Feng Q, Lin CH, Wang D, Jiang Z. (2024) **Neutrophil diversity and function in health and disease**. Signal Transduction and Targeted Therapy 9:343. doi. 10.1038/s41392-024-02049-y.
27. Chang X, Liu Y, Qiu J, Hua K. (2025) **Role of neutrophils in homeostasis and diseases**. Med. Comm. 6: e70390. doi: 10.1002/mco2.7039.
28. Delgado-Rizo V, Martínez-Guzmán MA, Iñiguez-Gutierrez L, García-Orozco A, Alvarado-Navarro A, Fafutis-Morris M (2017) **Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: An overview**. Front. Immunol. 8:81. doi: 10.3389/fimmu.2017.0008.
29. Brinkmann V. (2018) **Neutrophil extracellular traps in the second decade**. J Innate Immunity 10 (5-6): 414–421. doi: 10.1159/000489829
30. Burgener SS, Schroder K (2020) **Neutrophil extracellular traps in host defense**. Cold Spring HarbPerspectBiol. 12a037028. doi: 10.1101/cshperspect. a037028.
31. Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F. (1996) **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. 59:229–40. doi: 10.1002/jlb.59.2.229.
32. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. (2004) **Neutrophil extracellular traps kill bacteria**. Science. 303:1532–1535. doi: 10.1126/science.1092385.

33. Worku M, Rehrah D, Ismail HD, Asiamah E, Adjei-Fremah SA. (2021) **Review of the neutrophil extracellular traps (NETs) from cow, sheep and goat models.** *Int. J. Mol. Sci.* 22, 8046. doi:10.3390/ijms22158046
34. Bonilla MC, Quiros ON, Wendt M, Hennig-Pauka I, Mörgelin M, von Köckritz-Blickwede M, de Buhr N. (2022) **New insights into neutrophil extracellular trap (NETs) formation from porcine neutrophils in response to bacterial infections.** *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 8953. doi:10.3390/ijms23168953
35. Sheahan BJ, Schubert AG, Schubert W, Sheats MK, Schnabel LV, Gilbertie JM (2025) **Equine neutrophils selectively release neutrophil extracellular traps in response to chemical and bacterial agonists.** *Front. Vet. Sci.* 12:1512343. doi: 10.3389/fvets.2025.1512343.
36. Goggs R, Jeffery U, LeVine DN, Li RHL. (2020) **Neutrophil-extracellular traps, cell-free DNA, and immunothrombosis in companion animals: a review.** *Vet. Pathol.* 57 (1), 6–23. doi: 10.1177/0300985819861721.
37. Ramos-Martínez E, Hernández-González L, Ramos-Martínez I, Pérez-Campos Mayoral L, López-Cortés GI, Pérez-Campos E, Mayoral Andrade G, Hernández-Huerta MT and José MV (2021) **Multiple origins of extracellular DNA traps.** *Front. Immunol.* 12:621311. doi: 10.3389/fimmu.2021.621311.
38. Scieszka D, Lin YH, Li W, Choudhury S, Yu Y, Freire M. (2020) **NETome: The molecular characterization of neutrophil extracellular traps (NETs).** *bioRxiv.*2020.05.18.102772.doi: 10.1101/2020.05.18.102772.
39. Petretto A., Bruschi M., Pratesi F., Croia C., Candiano G., Ghiggeri G., Migliorini P. (2019) **Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli: A comparative proteomic analysis.** *PLoS ONE.*14: e0218946. doi: 10.1371/journal.pone.0218946
40. Chapman EA, Lyon M, Simpson D, Mason D, Beynon RJ, Moots RJ, Wright HL (2019) **Caught in a trap? Proteomic analysis of neutrophil extracellular traps in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.** *Front. Immunol.* 10:423. doi: 10.3389/fimmu.2019.00423.
41. Wang Y, DuC, Zhang Y, Zhu L. (2024) **Composition and function of neutrophil extracellular traps.** *Biomolecules* 14, 416. doi:10.3390/biom14040416.
42. Galluzzi L, Vitale I et al. (2018) **Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018.** *Cell Death & Differentiation* 25:486–54 doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
43. Zhang Z, Niu R, Zhao L, Wang Y, Liu G. (2023) **Mechanisms of neutrophil extracellular traps formation and regulation in cancers.** *Int. J. Mol. Sci.* 24, 10265. doi: 10.3390/ijms241210265.
44. Poli V, Zononi I (2023) **Neutrophil intrinsic and extrinsic regulation of NETosis in health and disease.** *Trends Microbiol.* March. 32(3):280-293. doi: 10.1016/j.tim.2022.10.002.
45. Gao F, Peng H, Gou R, Zhou Y, Ren S, Li F. (2025) **Exploring neutrophil extracellular traps: mechanisms of immune regulation and future therapeutic potential.** *Experim. Hematology and Oncology* 14: 80-99. doi: 10.1186/s40164-025-00670-3.
46. Pilszczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, Robbins SM, Green FH, Surette MG, Sugai M, Bowden MG, Hussain M, Zhang K, Kuber P. (2010). **A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus.** *J. Immunol.* 185, 7413–7425.doi: 10.4049/jimmunol.1000675.
47. Yousefi S, Mihalache C, Kozłowski E, Schmid I, Simon HU. (2009) **Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps.** *Cell Death Differ.* 16, 1438–1444. doi: 10.1038/cdd.2009.96.
48. Amini P, Stojkov D, Felser A, Jackson CB, Courage C, Schaller A, Gelman L, Soriano ME, Nuoffer JM, Scorrano L, et al. (2018). **Neutrophil extracellular trap formation requires OPA1-**

- dependent glycolytic ATP production.** Nat. Commun. 9, 2958. doi: 10.1038/s41467-018-05387-y.
49. Douda DN, Khan MA, Grasemann H, Palaniyar N (2015). **Sk3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx.** Proc Natl Acad Sci 112(9):2817–22. doi: 10.1073/pnas.1414055112.
50. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, Papayannopoulos V. (2014). **Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens.** Nat Immunol. 15:1017–1025. doi: 10.1038/ni.2987.
51. Papayannopoulos V. (2018). **Neutrophil extracellular traps in immunity and disease.** Nat Rev Immunol. 8:134–147. Doi: 10.1038/nri.2017.105.
52. Adrover JM, Aroca-Crevillen A, Crainiciuc G, Ostos F, Rojas-Vega Y, Rubio-Ponce A, Cilloniz C, Bonzon-Kulichenko E, Calvo E, Rico D, et al. (2020). **Programmed “disarming” of the neutrophil proteome reduces the magnitude of inflammation.** Nat Immunol. 21:135–144. doi: 10.1038/s41590-019-0571-2.
53. Poli V, Zanoni I. (2023) **Neutrophil intrinsic and extrinsic regulation of NETosis in health and disease.** Trends Microbio. 31 (3): 280-293. Doi: 10.1016/j.tim.2022.10.002
54. Delgado-Rizo V, Martínez Guzmán MA, Iñiguez-Gutierrez L, García-Orozco A, Alvarado-Navarro A and Fafutis-Morris M (2017) **Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: An Overview.** Front. Immunol. 8:81. doi: 10.3389/fimmu.2017.00081.
55. Schultz BM, Acevedo OA, Kalergis AM and Bueno SM (2022) **Role of extracellular trap release during bacterial and viral infection.** Front. Microbiol. 13:798853. doi: 10.3389/fmicb.2022.798853.
56. Baz AA, Hao H, lan S, Li Z, Chen S, Chu Y. (2024) **Neutrophil extracellular traps in bacterial infections and evasion strategies.** Front. Immunol. 15: 1357967. doi: 10.3389/fimmu.2024.135767.
57. Halverson TW, Wilton M, Poon KK, Petri B, Lewenza S. (2015) **DNA is an antimicrobial component of neutrophil extracellular traps.** PLoS Pathog.11, e1004593. doi: 10.1371/journal.ppat.1004593.
58. Allam R, Kumar SV, Darisipudi MN, Anders HJ. (2014). **Extracellular histones in tissue injury and inflammation.** J. Mol. Med. 92 (5): 465–472. doi: 10.1007/s00109-014-1148-z.
59. Silva JC, Thompson-Souza GA, Barroso MV, Neves JS and Figueiredo RT (2021) **Neutrophil and Eosinophil DNA extracellular trap formation: Lessons from pathogenic fungi.** Front. Microbiol. 12:634043. doi: 10.3389/fmicb.2021.634043.
60. Liang C, Lian N and Li M (2022) **The emerging role of neutrophil extracellular traps in fungal infection.** Front. Cell. Infect. Microbiol. 12:900895. doi: 10.3389/fcimb.2022.900895.
61. Zhong H, Lu R-Y and Wang Y (2022) **Neutrophil extracellular traps in fungal infections: A seesaw battle in hosts.** Front. Immunol. 13:977493. doi: 10.3389/fimmu.2022.977493.
62. Fang X, Lian H, Liu S, Dong J, Hua X, Li W, Liao C, Yuan X. (2023). **A positive feedback cycle between the alarmin S100A8/A9 and NLRP3 inflammasome-GSDMD signalling reinforces the innate immune response in *Candida albicans* keratitis.** Inflamm. Res 72:1485–1500. doi:10.1007/s00011-023-01757-5.
63. Shahzad A, Ni Y, Yang Y, Liu W, Teng Z, Bai H, Liu X, Sun Y, Xia J, Cui K, Duan Q, Xu Z, Zhang J, Yang Z, Zhang Q. (2025) **Neutrophil extracellular traps (NETs) in health and disease.** Mol Biomed. 2025 Dec 3;6(1):130. doi: 10.1186/s43556-025-00337-9.
64. Zhang J, Sun Y and Zheng J (2021) **The state of art of extracellular traps in protozoan infections (Review).** Front. Immunol. 12:770246. doi: 10.3389/fimmu.2021.770246.

65. Omar M, Abdelal H. (2023). **NETosis in parasitic infections: a puzzle that remains unsolved.** *Int. J Mol Sci* 24:8975. doi: 10.3390/ijms24 108975.
66. Porfírio do Nascimento PR, Mendes-Aguiar CO, Morais IC, Rodrigues Neto JF, Wilson ME, Jerônimo SMB.(2025). **Neutrophil-Leishmania infantum interaction induces neutrophil extracellular traps, DAMPs, and inflammatory molecule release.** *ACS Infect Dis.* 11(2):483-492. doi: 10.1021/acsinfectdis.4c00820.
67. Youn YJ, Lee YB, Kim SH, Jin HK, Bae J, Hong CW. (2021). **Nucleocapsid and spike proteins of SARS-CoV-2 drive neutrophil extracellular trap formation.** *Immune Netw.* 21(2): e16. doi: 10.4110/en.2021.21.e16.
68. Diniz LFA, Matsuba BK, Souza PSS, Lopes BRP, Kubo LH, Oliveira J, Toledo KA. (2023). **Effects of neutrophil extracellular traps during human respiratory syncytial virus infection in vitro.** *Braz. J. Biol.* 83: e248717. doi: 10.1590/ 1519-6984.248717.
69. Chen J, He R, Luo J, Yan S, Zhu W, Liu S. (2025). **Neutrophil extracellular traps in viral infections.** *Pathogens* 14: 1018. doi: 10.3390/ pathogens14101018.
70. Wang H, Kim SJ, Lei Y, Wang Sh, Wang H, Huang H, Zhang H, Allan Tsung A. (2024). **Neutrophil extracellular traps in homeostasis and disease.** *Sig. Transduct.Target. Therapy.* 9:235. doi: 10.1038/s41392-024-01933-x.
71. Gao F, Peng H, Gou R, Zhou Y, Ren S, Li F. (2025). **Exploring neutrophil extracellular traps: mechanisms of immune regulation and future therapeutic potential.** *Exp. Hematol. Oncol.* May 29; 14(1):80. doi: 10.1186/s40164-025-00670-3.
72. Liao F, Fan J, Wang R, Xu Zh, Li Q, Bi W, Deng J, Jiang J, Wang Zh, Zeng L. (2025). **Neutrophil extracellular traps in sepsis: trade-off between pros and cons.** *Burns & Trauma*, 13, tkaf046. doi:10.1093/burnst/tkaf046.
73. Liu Q, Chen R, Zhang Z, Sha Z, Wu H. (2025). **Mechanisms and immune crosstalk of neutrophil extracellular traps in response to infection.** *mBio.* May 14;16(5): e0018925. doi: 10.1128/mbio.00189-25.
74. Shahzad A, Ni Y, Yang Y, Liu W, Teng Z, Bai H, Liu X, Sun Y, Xia J, Cui K, Duan Q, Xu Z, Zhang J, Yang Z, Zhang Q. (2025). **Neutrophil extracellular traps (NETs) in health and disease.** *Mol Biomed.* Dec 3; 6(1):130. doi: 10.1186/s43556-025-00337-9.
75. Storisteanu DML, Pocock JM, Cowburn AS, Juss JK, Nadesalingam A, Nizet V, Chilvers ER. (2017) **Evasion of neutrophil extracellular traps by respiratory pathogens.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 56 (4): 423–431. doi: 10.1165/rcmb.2016-0193PS.
76. Ríos-López AL, González GM, Hernández-Bello R, Sánchez-González A. (2021) **Avoiding the trap: Mechanisms developed by pathogens to escape neutrophil extracellular traps.** *Microbiological Research* 243:126644. doi: 10.1016/j.micres.2020.126644.
77. Janssen L, Herick Muller HS, Martins VP. (2022) **Unweaving the NET: Microbial strategies for neutrophil extracellular trap evasion.** *Microbial Pathogenesis* 171: 105728. doi: 10.1016/j.micpath.2022.105728.
78. Aziz W, Sultana H, Kumar V, Tyagi A. (2025). **The relationship between NETosis and biofilm formation in chronic infections.** *Biomolecules* 15, 1692. doi: 10.3390/ biom15121692
79. Filipczak N, Yalamarty SSK, Li X, Pathrikar TV, Pinapati R, Vanjara B, Torchilin VJ. (2025) **Neutrophil extracellular traps: Formation, pathological roles, and nanoparticle-based therapeutic targeting strategies.** *J. Control Release.* 387:114220. doi: 10.1016/j.jconrel.2025.114220.
80. Santocki M, Kolaczowska E. (2020) **On neutrophil extracellular trap (NET) removal: What we know thus far and why so little.** *Cells* 9, 2079; doi:10.3390/cells9092079

81. Demkow U. (2023) **Molecular mechanisms of neutrophil extracellular trap (NETs) degradation.** Int J Mol Sci. 24 (5): 4896. doi: 10.3390/ijms24054896.
82. Juha M, Molnár A, Jakus Z, Ledó N. (2023) **NETosis: an emerging therapeutic target in renal diseases.** Front Immunol.14:1253667. doi: 10.3389/fimmu.2023.1253667.
83. Schoen J, Muñoz-Becerra M, Knopf J, Ndukwe F, Leppkes M, Roth D, Zeitler A, Frings VG, Hohberger B, Zeisberg V, Muñoz LE, Schett G, Herrmann M and Schauer C (2024) **The chronicles of inflammation: uncovering of distinct patterns of NET degradation products.** Front. Drug Discov. 4:1404103. doi: 10.3389/fddsv.2024.1404103.