

**Número especial sobre Hemostasia y Trombosis****Rol de las plaquetas en la formación de trampas de ADN derivadas de neutrófilos\****Role of platelets in the formation of neutrophil extracellular traps**Papel das plaquetas na formação de armadilhas de DNA derivadas de neutrófilos*

► Agostina Carestia<sup>1</sup>, Tomás Kaufman<sup>2</sup>, Mirta Schattner<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Lic. en Biotecnología.

<sup>2</sup> Lic. en Biología.

<sup>3</sup> Dra. de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

\* Laboratorio de Trombosis Experimental. Instituto de Medicina Experimental. Conicet. Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina. José Andrés Pacheco de Melo 3081, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Resumen**

Además de ser elementos clave en la hemostasia y trombosis, las plaquetas tienen un rol preponderante en la respuesta inflamatoria e inmune asociada con su capacidad para reconocer patógenos a través de la expresión de los receptores tipo Toll, la secreción de una amplia variedad de citoquinas, quemoquinas y factores de crecimiento almacenados en sus gránulos y por la expresión de moléculas de adhesión que permiten la interacción con otras células vasculares. Como parte de la primera línea de defensa, los neutrófilos controlan la infección por fagocitosis, liberación de proteínas antimicrobianas durante la degranulación o a través de la formación de estructuras tipo red, conocidas como trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). Estas están formadas por cromatina, proteasas y proteínas antimicrobianas cuya función principal es atrapar y eliminar bacterias, virus y hongos, impidiendo su diseminación. Además de microorganismos, la formación de NETs es gatillada por moléculas proinflamatorias y plaquetas. Su formación descontrolada puede ocasionar daño tisular y es considerada un mecanismo patogénico de eventos protrombóticos, inflamatorios y autoinmunes. En esta revisión se discute el rol de las plaquetas en la formación de NETs y se destacan los mediadores, estímulos y mecanismos moleculares participantes de este fenómeno, en humanos y modelos murinos.

**Palabras clave:** plaquetas \* trombosis \* sepsis \* neutrófilos \* bacterias

**Summary**

*In addition to being key elements in hemostasis and thrombosis, platelets have an important role in inflammatory and innate immune responses. This activity is associated with their capability to recognize pathogens through the expression of TLRs, the secretion of a wide variety of cytokines, chemokines and growth factors stored within their granules and cell adhesion molecule expression that enable interaction with other vascular cells. As part of the first line of defense, neutrophils control invading pathogens by phagocytosis, the release of antimicrobial proteins during degranulation or*

**Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

through the formation of web-like structures known as neutrophil extracellular traps (NETs). NETs are formed by chromatin, proteases and antimicrobial proteins and their main function is to trap and kill bacteria, virus and fungi, thus avoiding their dissemination. Besides microorganisms, NETs formation is also triggered by proinflammatory molecules, and platelets. The uncontrolled formation of NETs might exert tissue damage and has been involved as a pathogenic mechanism of autoimmune and prothrombotic events. In this review, the role of platelets in NET generation is discussed, highlighting the mediators, stimuli and molecular mechanisms involved in this phenomenon, both in human and murine models.

**Key words:** platelets \* thrombosis \* sepsis \* neutrophils \* bacteria

## Resumo

Além de serem elementos chave na hemostasia e trombose, as plaquetas têm um papel preponderante na resposta inflamatória e imune associada a sua capacidade para reconhecer patógenos através da expressão dos receptores tipo Toll, a secreção de uma ampla variedade de citocinas, quemoquinas e fatores de crescimento armazenados em seus grânulos e pela expressão de moléculas de adesão que permitem a interação com outras células vasculares. Como parte da primeira linha de defesa, os neutrófilos controlam a infecção por fagocitose, liberação de proteínas antimicrobianas durante a degranulação ou através da formação de estruturas tipo rede, conhecidas como armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Elas estão formadas por cromatina, proteases e proteínas antimicrobianas cuja função principal é prender e eliminar bactérias, vírus e fungos, impedindo sua disseminação. Além de microorganismos, a formação de NETs é disparada por moléculas pró-inflamatórias e plaquetas. Sua formação descontrolada pode provocar dano tissular e é considerada um mecanismo patogênico de eventos pró-trombóticos, inflamatórios e autoimunes. Nesta revisão é discutido o papel das plaquetas na formação de NETs, destacando os mediadores, estímulos e mecanismos moleculares participantes deste fenômeno, em humanos e modelos murídeos.

**Palavras-chave:** plaquetas \* trombose \* sepse \* neutrófilos \* bactérias

## Introducción

Si bien las plaquetas son tradicionalmente conocidas como mediadores primarios de la hemostasia, esta función también las asocia íntimamente con procesos inflamatorios y con la inmunidad innata(1). El papel de las plaquetas en estos procesos está asociado a varias características que incluyen la capacidad de almacenar en sus gránulos una gran variedad de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión que pueden ser liberadas a la circulación o translocarse a la superficie plaquetaria durante su activación, al reconocimiento de patógenos a través de la expresión en la membrana de los receptores tipo Toll (TLRs) y a las interacciones de las plaquetas con otras células, principalmente con células endoteliales y leucocitos(2).

En los últimos años, se ha descubierto que los neutrófilos poseen un nuevo mecanismo involucrado en la defensa del organismo contra patógenos y es la capacidad de formar trampas extracelulares de ADN o NETs (del inglés *Neutrophil extracellular traps*) (3). La formación de NETs es el resultado de un programa especial de muerte celular denominado NETosis. Las NETs son grandes redes de ADN decoradas con los cinco tipos de histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4) y con proteínas granulares de los neutrófilos con actividad microbicida, que in-

cluyen entre otras, elastasa, mieloperoxidasa (MPO) y la proteína que aumenta la permeabilidad bactericida (3). Si bien estas trampas de ADN resultan importantes como agentes antiinfecciosos en la respuesta inmune innata, las mismas pueden ser un arma de doble filo ya que, en exceso, pueden inducir daño tisular (4). En este sentido, la presencia de NETs se ha observado no solamente en procesos inflamatorios infecciosos sino también en diversas enfermedades inflamatorias estériles como la preeclampsia, vasculitis de pequeños vasos, lupus y trombosis.

En esta revisión se discute el rol de las plaquetas en la formación de NETs especificando cuáles son los estímulos, mediadores y mecanismos moleculares involucrados, tanto en humanos como en modelos murinos.

## NETs

La principal función de las NETs es eliminar patógenos. Una vez unidas a estas redes, las histonas y las proteínas antimicrobianas degradan factores de virulencia y matan a los microorganismos. La NET no sólo es una trampa que previene la propagación de patógenos desde el sitio inicial de la infección sino que al estar unida a estímulos nocivos también concentra proteínas

antimicrobianas en el sitio de la infección (3). Si bien originalmente la formación de NETs se asoció con patógenos que incluyen, bacterias, hongos, virus y parásitos (5–8), hoy se sabe que citoquinas y quimioquinas, agonistas plaquetarios y anticuerpos (9–13) también son capaces de gatillar este fenómeno.

Dependiendo de la localización de los neutrófilos al momento de ser estimulados, las NETs pueden esparcirse a través del intersticio de órganos específicos o liberarse en el lumen de los vasos sanguíneos.

La NETosis es iniciada por la activación de la enzima peptidil arginina deaminasa 4 (PAD4) que induce la citrulinación de las histonas 3 y 4 desmantelando el nucleosoma (14)(15). A su vez, la activación de la proteína quinasa C, del factor de transcripción NFκB (12) y la vía de señalización RAF/MEK/ERK (16) llevan a la fosforilación de diversas quinasas resultando en el ensamblaje del complejo funcional NADPH oxidasa para la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) (17). Las EROS gatillan la disociación de la elastasa de un complejo asociado a membrana facilitando su translocación al núcleo donde colabora con PAD4 para promover la decondensación de la cromatina a través del clivado de histonas (18)(19). La desintegración de la envoltura nuclear y la ruptura de la membrana citoplasmática permiten la liberación de las NETs.

Además de la generación de EROS, la autofagia también se requiere para la formación de NETs (20). Evidencias recientes también indican que la activación de canales de potasio SK3, mediada por influjo de calcio, representa un mecanismo alternativo de NETosis independiente de la NADPH oxidasa (21). Esta descripción del proceso de NETosis se conoce como NETosis “suicida”. Sin embargo, ha sido reportado que una fracción de los neutrófilos puede liberar NETs sin morir dejando citoplasma que continúa fagocitando microbios. Este proceso altamente eficiente es conocido como NETosis “vital” (22). El hecho de que defectos en la generación de NETs o la depleción experimental de las mismas incrementan la susceptibilidad ante diversos tipos de infecciones en ratones y humanos, apoya la noción de que la NETosis es un brazo importante en la actividad antimicrobiana de la inmunidad innata (23)(26).

## Plaquetas

Las plaquetas son células anucleadas derivadas de megacariocitos, las cuales juegan un rol crucial en la hemostasia y la trombosis (27). Bajo condiciones normales, las plaquetas circulantes no se adhieren a las paredes de los vasos sanguíneos, a los leucocitos o entre ellas debido a las propiedades antitrombóticas del endotelio vascular. Sin embargo, en casos de injuria o luego de la activación endotelial bajo condiciones inflamatorias, las plaquetas se adhieren a moléculas del su-

bendotelio como el colágeno y el Factor von Willebrand (FvW) gatillando así la activación inicial de plaquetas caracterizada por la liberación de mediadores solubles almacenados en sus gránulos como ADP y tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Estas moléculas actúan como activadores plaquetarios amplificando la activación celular de manera autócrina y parácrina permitiendo la activación de otras plaquetas circulantes, lo cual favorece la formación de agregados entre plaquetas.

La interacción entre plaquetas es denominada agregación y ocurre debido a la principal integrina de estas células, α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub>. Durante la activación plaquetaria, esta integrina cambia de una conformación cerrada a una α abierta permitiendo la unión del fibrinógeno que actúa como un puente entre las plaquetas. La amplificación de la estimulación plaquetaria conlleva a la generación de trombina y formación de un trombo (27).

## Moléculas de adhesión y mediadores solubles involucrados en la formación de NETs mediada por plaquetas

El rol de las plaquetas en la formación de trampas extracelulares de ADN fue descubierto por primera vez en 2007, cuando Clark *et al.* demostraron que, durante una septicemia, el lipopolisacárido (LPS, componente de la membrana externa de bacterias Gram negativas) se unía al TLR4 presente en la membrana plaquetaria permitiendo la unión de la plaqueta con el neutrófilo, desencadenando la formación de NETs (28). Sin embargo, estudios posteriores mostraron que la formación de NETs mediada por plaquetas no está restringida a la activación por componentes bacterianos sino que también ocurre en condiciones de inflamación estéril como por ejemplo, en el síndrome de distres respiratorio o durante la formación de trombos, y además, que la activación plaquetaria mediada por agonistas clásicos promueve la liberación de NETs (10)(11)(13)(29).

En general, la interacción de las plaquetas con los neutrófilos ocurre principalmente por la unión de la P-selectina con su receptor PSGL-1 (30). Sin embargo, diversos trabajos, que incluyen los de este grupo de trabajo, demostraron que la formación de NETs mediada por plaquetas en humanos es un mecanismo independiente de P-selectina ya que la estimulación de neutrófilos con P-selectina recombinante no induce NETosis y el bloqueo de la P-selectina durante la interacción plaqueta-neutrófilo no modifica la liberación de ADN gatillada por LPS o trombina (11)(13). Por el contrario, estudios en ratones demostraron que la formación de NETs inducida por sepsis o por injuria pulmonar aguda es dependiente de la presencia de plaquetas, PSGL-1 y de P-selectina (31)(32). Estas diferencias en el requerimiento del eje P-selectina/PSGL-1 en la NETosis po-

drían estar asociadas a un efecto *in vivo* de la P-selectina o al uso de diferentes especies en cada estudio.

La cooperación entre la integrina  $\beta_2$  (CD18) del neutrófilo y la glicoproteína Ib plaquetaria es considerada otro evento importante involucrado en la interacción plaqueta-neutrófilo (33) (34). Estudios *in vitro* utilizando células murinas de ratones *wild type* (WT) y ratones deficientes en CD18 y un modelo murino de sepsis, arrojaron evidencias de que la integrina  $\beta_2$  está involucrada en la NETosis mediada por plaquetas (35) (36). Estos datos fueron corroborados con células humanas, donde el bloqueo de CD18 disminuyó marcadamente la liberación de estas trampas de ADN (11) (36). Con respecto a la glicoproteína plaquetaria, su inhibición específica por delección genética (37) o bloqueo con un anticuerpo específico también afectó la formación de NETs, señalando su participación en este proceso (11).

La integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  también es responsable de la interacción de las plaquetas con otras células. Si bien en un modelo murino de injuria pulmonar el bloqueo de esta integrina disminuyó la formación de NETs y el daño tisular (10), su inhibición en plaquetas humanas no modificó la NETosis (11) (13). Al igual que con la P-selectina, estas variaciones pueden deberse a una diferencia entre especies o a la presencia de factores *in vivo* no involucrados en los estudios *in vitro*.

Luego de su activación, las plaquetas pueden expresar y/o secretar una gran cantidad de moléculas capaces de modular la activación de los neutrófilos (38). Una de ellas es la HMGB1 (del inglés, *high mobility group box 1*), proteína conocida como señal de daño liberada como consecuencia de la muerte celular y crucial en la respuesta inflamatoria al daño tisular (39). Recientemente, Maugeri *et al.* demostraron que las plaquetas activadas liberan HMGB1 que gatilla el proceso de autofagia en los neutrófilos inhibiendo la apoptosis y facilitando la NETosis (13).

Otras moléculas liberadas por las plaquetas que pueden actuar sobre los neutrófilos son las citoquinas RANTES (CCL5) y el factor plaquetario 4 (CXCL4, FP4) (40). El bloqueo de estas dos citoquinas o su heterodimerización inhibió la NETosis en un modelo de ratón de injuria pulmonar, sugiriendo que estas citoquinas tienen un rol en la NETosis mediada por plaquetas (36). Este grupo de trabajo confirmó la participación del FP4 en células humanas, ya que su bloqueo interfiere en la liberación de ADN y el FP4 recombinante es capaz de promover la formación de estas trampas de ADN (11). Estos estudios señalan que estas moléculas, además de ser relevantes por su actividad quimiotáctica, también son potentes inductoras de la formación de NETs.

Diversos estudios señalan que el FvW, una molécula liberada por las células endoteliales y las plaquetas y que es responsable de la adhesión de las plaquetas al subendotelio, también tiene un rol fundamental en diferentes estadios de la formación de NETs (41). En

un modelo murino de trombosis venosa profunda, se observó que la histona H3 citrulinada (H3cit) colocaliza con este factor sugiriendo que esta molécula y las NETs forman una red que contribuye a la activación del dominio A1 del FvW, ayudando al crecimiento y a la estabilización del trombo (42). Por otro lado, los estudios de los autores mostraron que el FvW liberado de las plaquetas también interviene en la formación de NETs (11). En conjunto, estos datos señalan que el FvW liberado tanto del endotelio como de las plaquetas es otra molécula relevante en el proceso de NETosis.

Por último, el rol del TXA en la formación de NETs mediada por plaquetas también ha sido estudiado. En estudios en los cuales se utilizó tanto un antagonista de su receptor como el ácido acetil salicílico la formación de NETs mediada por plaquetas se vio significativamente disminuida (10) (11) (29). Teniendo en cuenta que no se ha reportado la presencia del receptor de esta molécula en neutrófilos, la acción de esta molécula no es clara. Sin embargo, si se considera que el TXA<sub>2</sub> es un fuerte activador plaquetario es posible que el TXA<sub>2</sub> induzca la liberación del contenido de los gránulos plaquetarios, que incluyen HGMB1, RANTES, FP4 y FvW, que a su vez promueven la formación de NETs (11).

## Rol de las plaquetas y NETs en la enfermedad

### INFLAMACIÓN INFECCIOSA

#### Sepsis

Cada vez es más reconocido que las plaquetas desempeñan un papel importante en la defensa del huésped frente a patógenos. Varios mecanismos parecen ser responsables de esta respuesta que incluyen la capacidad de las plaquetas para reconocer directamente, secuestrar y matar los agentes patógenos así como también para reclutar leucocitos al sitio de la infección y activarlos, mejorando su capacidad de fagocitar y matar los agentes patógenos (43). Además, un estudio seminal de Clark *et al.* demostró que las plaquetas inducen respuestas efectoras únicas de neutrófilos tales como la generación de NETs (28). Durante una septicemia, inicialmente, el LPS se une al TLR4 presente en la membrana plaquetaria permitiendo la unión de la plaqueta al neutrófilo y desencadenando la formación de NETs. La depleción plaquetaria o la inhibición de la interacción plaqueta-neutrófilo no solo inhibe la formación de NETs, sino que también permite la diseminación de la bacteria (28), indicando que las plaquetas tienen un rol fundamental en la generación de NETs durante la sepsis. Estos hallazgos señalan que las plaquetas actúan como centinelas y tienen la capacidad de interactuar con moléculas bacterianas permitiendo la activación del sistema inmune innato durante la sepsis (28).

Curiosamente, recientemente se propuso que el vínculo entre la coagulación y la respuesta inmune innata puede constituir un mecanismo efector innato, llamado inmunotrombosis (44). Este proceso involucra el reconocimiento de los patógenos por las células dañadas e impide la difusión del patógeno y su supervivencia. Por lo tanto, la inmunotrombosis se considera un proceso fisiológico esencial para la inmunidad intravascular, mientras que la desregulación de la inmunotrombosis puede ser uno de los acontecimientos subyacentes que provocan trastornos tromboticos tales como, tromboembolia venosa y coagulación intravascular diseminada. Los neutrófilos son jugadores importantes en el desarrollo de inmunotrombosis a través de la liberación de NETs. Por otra parte, estas redes de ADN también pueden proporcionar un andamio para activar las plaquetas y estimular la formación de trombos (44). Varios estudios han indicado la relación entre la infección y la trombosis; sin embargo, el mecanismo patogénico no estaba claro. El descubrimiento de las NETs y la interacción bidireccional con plaquetas representa un vínculo entre estos fenómenos.

#### INFLAMACIÓN ESTÉRIL

##### *Injuria pulmonar aguda*

En un modelo murino de injuria pulmonar aguda relacionada a transfusión, se encontraron NETs en la microcirculación de los pulmones así como componentes de estas redes circulantes en plasma. La inhibición de la activación plaquetaria resultó en una disminución significativa del contenido de ADN indicando que las plaquetas son necesarias para la generación de NETs (10). Resultados similares se demostraron en un modelo murino de injuria pulmonar inducida por ventilación (36) reforzando la noción de que las plaquetas cumplen un papel relevante en el proceso de NETosis *in vivo*.

##### *Trombosis*

Tradicionalmente, el mecanismo patogénico de la enfermedad tromboembólica venosa (ETV), que incluye la trombosis venosa profunda (TVP) o embolia pulmonar (EP) fue considerado como el resultado de la reducción en el flujo sanguíneo, lesión en el endotelio vascular y un estado de hipercoagulabilidad (Triada de Virchow) (45). El descubrimiento de las NETs ofrece una explicación muy emocionante para los eventos celulares que desencadenan la ETV.

Estudios iniciales mostraron que las trampas de ADN, no solamente proporcionan un andamio para la formación del trombo sino también estimulan su crecimiento gracias a las histonas presentes en las mismas (46) (47). Las histonas son capaces de activar a las plaquetas promoviendo respuestas hemostáticas, inflamatorias y procoagulantes. Las NETs también reclutan glóbulos rojos y

promueven la deposición de FvW, fibrinógeno y fibrina induciendo la formación de un trombo rojo tal como es encontrado en las venas. La presencia de NETs fue demostrada tanto en un modelo de TVP en monos, como en trombos obtenidos de pacientes con tromboembolismo venoso (42).

##### *Trombosis arterial*

Niveles aumentados de nucleosomas y ADN libre han sido frecuentemente asociados con tejido infartado en pacientes con accidente cerebro vascular isquémico e infartos de miocardio. Sin embargo, debido a que estos biomarcadores nos son específicos para daño tisular, estos estudios no clarificaban si el ADN liberado provenía de tejido necrótico o de NETs. Más aún, la relación entre nucleosomas y ADN libre con los trombos no ha sido establecida. Recientemente se ha demostrado la presencia de H3cit en secciones de corazón y aumento de los niveles plasmáticos de nucleosomas en ratones sometidos a injuria por reperusión. También se observó que la terapia con ADNasa I disminuyó significativamente el número de neutrófilos infiltrados así como los niveles de nucleosomas plasmáticos reduciendo el área infartada y mejorando la función cardíaca (48). Estos datos indican no solo que las NETs son componentes del ambiente inflamatorio en el miocardio infartado, sino que también están involucradas directamente en la injuria cardíaca.

En un estudio prospectivo, observacional, transversal de una cohorte de 282 individuos con sospecha de enfermedad de arterias coronarias Borissoff *et al.* encontraron que marcadores de NETs, como complejos MPO-ADN, predecían el número de vasos coronarios ateroscleróticos, la presencia de un estado hipercoagulante y la ocurrencia de eventos cardíacos mayores (49). Más aún, también identificaron niveles elevados de nucleosomas como un marcador independiente de factor de riesgo de estenosis coronaria severa. Cabe destacar que este estudio solo encontró una leve correlación entre marcadores de activación plaquetaria (niveles plasmáticos de PF4) y los niveles de H4cit. Sin embargo, en otro estudio, Maugeri *et al.* demostraron que trombos de arterias coronarias obtenidos de pacientes con infarto agudo de miocardio estaban compuestos principalmente por plaquetas y neutrófilos y contenían grandes cantidades de hebras de ADN decoradas con histonas citrulinadas y proteínas granulares como mieloperoxidasa y pentraxinas; las plaquetas se encontraron localizadas próximas a las hebras de ADN (13). En concordancia con los hallazgos mencionados, H3cit se detectó en microtrombos cerebrales de pacientes con eventos isquémicos. Interesantemente, los pacientes presentaban una prevalencia inesperadamente superior de cáncer, la mitad de los cuales fueron detectados *post-mortem* (50). Más aún, los pacientes con cáncer presentaban marcadores plasmáticos de NETs aumentados, los cuales correlacionaban

positivamente con niveles de trombina-antitrombina y P-selectina soluble. Estos datos no solamente apoyan un nexo entre NETosis y trombosis sino también destacan la relevancia de la formación de NETs como biomarcadores para detectar cáncer en microtrombosis arteriales o viceversa.

## Conclusiones

Todos estos hallazgos indican que la activación de plaquetas por patógenos o agonistas clásicos gatilla la liberación NETs. Esta interacción entre plaquetas y neutrófilos puede ser beneficiosa cuando protege al huésped contra patógenos, pero si ocurre de manera descontrolada, induce daño tisular y falla de órganos.

Cabe destacar que mientras los experimentos realizados *in vitro* son convincentes al demostrar que la interacción plaqueta-neutrófilo puede inducir la formación de NETs, la relevancia de esta interacción *in vivo* aún contiene elementos ambiguos y conlleva a numerosas preguntas aún sin resolver, las cuales, a menudo, involucran diferencias en las vías de señalización tanto entre especies como en tipos celulares.

La interacción entre plaquetas y neutrófilos en la inducción de NETosis parece ser un mecanismo con relevancia en los mecanismos patogénicos en la trombosis venosa y arterial. Así, la prevención de la formación de NETs está siendo considerada como un potencial blanco para terapias antitrombóticas.

A pesar del gran avance del cual hemos sido testigos en la última década en la comprensión de la NETosis y del rol de las plaquetas en este proceso, quedan muchas preguntas aún por responder: ¿Son los nucleosomas circulantes y los neutrófilos activados los causantes de la formación de trombos, o una consecuencia de los mismos? ¿Hay algún grado de selectividad en la decondensación y liberación del ADN durante la NETosis mediada por plaquetas, tanto en condiciones estériles como infecciosas? ¿Hay alguna relación entre plaquetas y formación de NETs en la progresión de las placas ateroscleróticas? ¿Es necesaria la NETosis mediada por plaquetas para la hemostasia?

Ciertamente, la realización de más experimentos y estudios clínicos resulta crítica para lograr un entendimiento más profundo de la relevancia fisiopatológica de esta novedosa interacción entre plaquetas y neutrófilos.

### CORRESPONDENCIA

DRA. MIRTA SCHATTNER  
Laboratorio Trombosis Experimental  
Instituto de Medicina Experimental - CONICET  
Academia Nacional de Medicina.  
Pacheco de Melo 3081  
(1425) CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES, Argentina  
Tel.: (+54-11) 4805-5759 ext. 249  
E-mail: mschattner@hotmail.com

## Referencias bibliográficas

- Li C, Li J, Li Y, Lang S, Yougbare I, Zhu G, *et al.* Cross-talk between platelets and the immune system: Old systems with new discoveries. *Adv Hematol* 2012; 2012: 384685.
- Jenne CN, Urrutia R, Kuberski P. Platelets: Bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *Int J Lab Hematol* 2013; 35 (3): 254–61.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303 (5663): 1532–5.
- Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* 2012; 189 (6): 2689–95.
- Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* and hyphal forms. *Cell Microbiol* 2006; 8 (4): 668–76.
- 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; 176 (2): 231–41.
- Guimaraes-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceicao-Silva F, *et al.* Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106 (16): 6748–53.
- 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; 12 (1): 109–16.
- Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, *et al.* Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 2009; 15 (6): 623–5.
- Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, *et al.* Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 2012; 122 (7): 2661–71.
- Carestia A, Kaufman T, Rivadeneyra L, Landoni VI, Pozner RG, Negrotto S, *et al.* Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets. *J Leukoc Biol* 2016; 99(1): 153–62.
- Lapponi MJ, Carestia A, Landoni VI, Rivadeneyra L, Etulain J, Negrotto S, *et al.* Regulation of neutrophil extracellular trap formation by anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2013; 345 (3): 430–7.
- Maugeri N, Campana L, Gavina M, Covino C, De Metro M, Panciroli C, *et al.* Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J Thromb Haemost* 2014; 12 (12): 2074–88.
- Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, *et al.* Histone hyperacetylation mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol* 2009; 184 (2): 205–13.

15. Leshner M, Wang S, Lewis C, Zheng H, Chen XA, Santy L, *et al.* PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Front Immunol* 2012; 3: 307.
16. Hakkim A, Fuchs TA, Martinez NE, Hess S, Prinz H, Zychlinsky A, *et al.* Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol* 2011; 7 (2): 75-7.
17. Keshari RS, Verma A, Barthwal MK, Dikshit M. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *J Cell Biochem* 2013; 114 (3): 532-40.
18. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2010; 191 (3): 677-91.
19. Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V. Myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep* 2014; 8 (3): 883-96.
20. Remijsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, *et al.* Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res* 2011; 21 (2): 290-304.
21. Douda DN, Khan MA, Grasmann H, Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112 (9): 2817-22.
22. Pilszczek 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; 185 (12): 7413-25.
23. 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; 207 (9): 1853-62.
24. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, *et al.* Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood* 2011; 117 (3): 953-9.
25. Meng W, Paunel-Görgülü A, Flohé S, Hoffmann A, Witte I, MacKenzie C, *et al.* Depletion of neutrophil extracellular traps *in vivo* results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice. *Crit Care* 2012; 16 (4): R137.
26. Scharrig E, Carestia A, Ferrer MF, Cedola M, Pretre G, Drut R, *et al.* Neutrophil extracellular traps are involved in the innate immune response to infection with *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9 (7): e0003927.
27. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: Physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31 (4): 381-92.
28. 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; 13 (4): 463-9.
29. Mizurini DM, Aslan JS, Gomes T, Ma D, Francischetti IMB, Monteiro RQ. Salivary thromboxane  $\alpha_2$ -binding proteins from triatomine vectors of Chagas disease inhibit platelet-mediated neutrophil extracellular traps (NETs) formation and arterial thrombosis. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9 (6): e0003869.
30. Ghasemzadeh M, Hosseini E. Platelet-leukocyte cross-talk: Linking proinflammatory responses to procoagulant state. *Thromb Res* 2013 Mar; 131 (3): 191-7.
31. Sreeramkumar V, Adrover JM, Ballesteros I, Cuartero MI, Rossaint J, Bilbao I, *et al.* Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science* 2014; 346 (6214): 1234-8.
32. Etulain J, Martinod K, Wong SL, Cifuni SM, Schattner M, Wagner DD. P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood* 2015; 126 (2): 242-6.
33. Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong J, McIntire LV V, *et al.* Platelet glycoprotein I $\alpha$  is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med* 2000; 192 (2): 193-204.
34. Pluskota E, Woody NM, Szpak D, Ballantyne CM, Soloviev DA, Simon DI, *et al.* Expression, activation, and function of integrin  $\alpha$ M $\beta$ 2 (mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood* 2008; 112 (6): 2327-35.
35. McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, Jenne CN, Kubes P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe* 2012; 12 (3): 324-33.
36. Rossaint J, Herter JM, Van Aken H, Napirei M, Döring Y, Weber C, *et al.* Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation. *Blood* 2014; 123 (16): 2573-84.
37. 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; 209 (4): 819-35.
38. Smyth SS, Mcever RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, *et al.* Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (11): 1759-66.
39. Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol* 2011; 29 (1): 139-62.
40. Kasper B, Brandt E, Bulfone-Paus S, Petersen F. Platelet factor 4 (PF-4)-induced neutrophil adhesion is controlled by src-kinases, whereas PF-4-mediated exocytosis requires the additional activation of p38 MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Blood* 2004; 103 (5): 1602-10.
41. Bryckaert M, Rosa J-P, Denis C V, Lenting PJ. Of von Willebrand factor and platelets. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72 (2): 307-26.
42. 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; 10 (1): 136-44.
43. Jenne CN, Kubes P. Platelets in inflammation and infection. *Platelets* 2015 Jan; 26 (4): 286-92.

44. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013 Jan; 13 (1): 34–45.
45. Virchow R. Cellular-Pathologie. *Arch für Pathol Anat und Physiol und für Klin Med* 1855 Apr; 8 (1): 3–39.
46. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, *et al.* Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107 (36): 15880–5.
47. Semeraro F, Ammollo CT, Morrissey JH, Dale GL, Friese P, Esmon NL, *et al.* Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: Involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood* 2011;118 (7):1952–61.
48. Savchenko AS, Martinod K, Seidman MA, Wong SL, Borissoff JI, Piazza G, *et al.* Neutrophil extracellular traps form predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development. *J Thromb Haemost* 2014; 12 (6): 860-70.
49. Borissoff JI, Joosen IA, Versteylen 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 Biol* 2013; 33 (8): 2032-40.
50. Thålin C, Demers M, Blomgren B, Wong SL, von Arbin M, von Heijne A, *et al.* NETosis promotes cancer-associated arterial microthrombosis presenting as ischemic stroke with troponin elevation. *Thromb Res* 2016 Mar; 139: 56–64.

**Recibido: 18 de abril de 2016.**

**Aceptado: 13 de mayo de 2016.**