
El papel de la NETosis en procesos inflamatorios: una revisión sobre la relación con preeclampsia

*Andrés Calderón-Obando**

Resumen:

El fenómeno de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) es un mecanismo de respuesta de la inmunidad innata descrito primeramente en procesos de infección por microorganismos, el cual involucra la liberación de una malla de ADN que encierra histonas y proteínas, entre estas varias enzimas y moléculas con potencial tóxico liberadas al espacio extracelular. Recientemente, se ha visto que este mecanismo conocido como netosis participa también en procesos inflamatorios como la preeclampsia, grave afección que puede ocurrir durante el embarazo. Se llevó a cabo una revisión exhaustiva del papel de este fenómeno, identificando las posibles formas de activación de los neutrófilos así como las posibles consecuencias en la patogénesis de la enfermedad.

Palabras clave: NETs - NEUTRÓFILOS - PREECLAMPSIA - EMBARAZO

* Lic. en Medicina General. Hospital de San Carlos, Hospital Max Peralta, Hospital Nacional Psiquiátrico, Clínica Clorito Picado. Manejo MEDISS, CTAS: Agudeza de Triage canadiense, EISS (Hospital San Juan de Dios). dr.calderon28@gmail.com . Tel.8889 1712

Abstract:

The phenomenon of neutrophil extracellular traps (NETs) is a response mechanism of the innate immunity described first in processes of infection by microorganisms, which involves the release of a DNA mesh that encloses histones and proteins, among these several enzymes and molecules with toxic potential released into the extracellular space. Recently, it has been seen that this mechanism known as netosis also participates in inflammatory processes such as preeclampsia, a serious condition that can occur during pregnancy. A thorough review of the role of this phenomenon was carried out, identifying possible forms of neutrophil activation as well as possible consequences in the pathogenesis of the disease.

Key words: NETs - NEUTROPHILS - PREECLAMPSIA - PREGNANCY.

Recibido: 31 de marzo de 2017

Aceptado: 19 de abril de 2017

Las trampas extracelulares de neutrófilos, conocidas como NETs, consisten en un mecanismo desplegado por los neutrófilos que implica, además, la muerte del mismo. Consisten en una malla de ADN que encierra histonas y proteínas entre estas varias enzimas liberadas al espacio extracelular para inmovilizar a microorganismos en muchos casos, atrapándolos entre agentes antimicrobianos e incluso facilitando su muerte (Yam-Puc et al., 2012). En este fenómeno biológico, el núcleo de estas células del sistema inmunológico innato pierde su arquitectura lobulada característica, la eucromatina y la heterocromatina se homogenizan, hay ruptura de su membrana nuclear y disolución de los gránulos citoplásmicos, permitiendo que los componentes celulares y nucleares se mezclen para, finalmente, producir ruptura de la membrana celular y poder ser liberados al medio extracelular.

Este proceso es irreversible y dependiente de especies de oxígeno reactivo (ROS) tales como superóxido que es generado por la NADPH oxidasa Nox2, y como consecuencia se da la muerte del neutrófilo. A este mecanismo se le conoce como netosis (Yam-Puc et al., 2012; Branzk & Papayannopoulos, 2013; Camicia & de Larrañaga, 2013).

Como parte del estudio de este fenómeno, algunos autores han identificado diferentes inductores de la netosis, ya sea agentes químicos o biológicos. De forma *in vitro*, se ha evidenciado que la producción de NET ocurre entre 5 minutos y 4 horas posteriores al estímulo, y de forma *in vivo* se han identificado diversos lugares anatómicos (Yam-Puc et al., 2012; Yipp et al., 2012). Entre agentes químicos se pueden citar algunos como el *phorbol myristate acetate* (PMA, activador específico de la Proteína Quinasa C, potente estimulador de la NADPH oxidasa y producción de especies reactivas del oxígeno), la IL-8, el H₂O₂, el factor activador de plaquetas y el óxido nítrico, el cual, según se ha descrito *in vitro* media la generación de radicales libres en los neutrófilos induciendo así la liberación de NET (Yam-Puc et al., 2012). En la Figura 1, se puede apreciar este fenómeno en neutrófilos humanos.

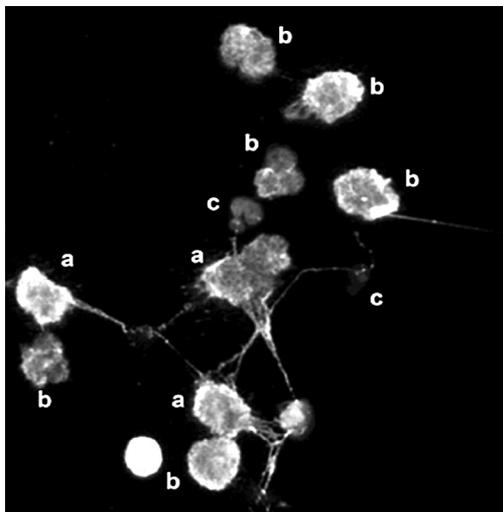


Figura 1. Micrografía de fluorescencia que muestra neutrófilos humanos sometidos a NETosis. Activación realizada con *Phorbol Myristate Acetate* (PMA). El ADN está teñido con el colorante nuclear DAPI y los residuos de histona citrulinados de Histona H3 con anticuerpos policlonales y Alexa Flour 488. Los NETs que contienen tanto ADN como residuos de histonas citrulinados se tiñen de color verde, a: neutrófilos que presentan NETosis, b: células en estadios de NETosis y c: muestra de neutrófilos No-NETosis intacta, con la morfología nuclear multilobulada. Fuente: tomado de Nel et al., (2016).

Entre los agentes inductores de NET biológicos que afectan animales o humanos, se pueden mencionar: las plaquetas activadas, diversas bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycobacterium tuberculosis*), hongos (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*), parásitos (*Plasmodium falciparum*, *Leishmania amazonensis*, *Eimeria bovis*, *Eimeria arloingi*, *Toxoplasma gondii*), inclusive virus. También algunas moléculas purificadas como LPS de *Escherichia coli*, la LPG de *Leishmania amazonensis*, la proteína M1 de *Streptococcus pyogenes*, entre otros (AbiAbdallah & Denkers, 2012; Yipp et al.,

2012, Silva et al., 2014). Además, investigadores han caracterizado los componentes de los NETs, así como los mecanismos de formación de los mismos, con el objetivo de conocer más a fondo sobre la complejidad de este importante fenómeno. Algunos de los componentes se detallan en el cuadro 1:

Cuadro 1. Principales componentes identificados en el fenómeno de netosis.
Fuente: elaboración propia con base en información extraída de Brinkmann & Zychlinsky (2007), Urban et al. (2009), Yam-Puc et al., (2012), Branzk & Papayannopoulos, (2013) y Nel et al., (2016).

Componente	Localización intracelular en neutrófilos
ADN	Núcleo y mitocondria
Histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4)	Núcleo
Actina, miosina-9, calprotectina	Citoesqueleto
Enzimas: elastasa, mieloperoxidasa, lisozima C, catepsina G, gelatinasa	Gránulos
Catalasa	Peroxisomas
Proteína globular antimicrobiana: lactoferrina	Gránulos
Azurocidina (péptido catiónico antimicrobiano)	Gránulos

En cuanto al mecanismo de acción de los NETs, autores señalan que lo primero que ocurre es la desintegración de la membrana nuclear, tanto la interna como la externa, y la formación de vesículas con membrana íntegra que contienen ADN, las cuales se encuentran inicialmente en el citoplasma, posteriormente son liberadas al espacio extracelular y, una vez fuera, las vesículas se rompen y el ADN es liberado, lo que le permite formar la red y atrapar a los microorganismos o inductores en ese microambiente. La estructura fibrosa de las NET es necesaria para ejercer el secuestro. Además del rol en la inmunidad en cuanto a protección por agentes infecciosos, los NETs también han sido implicados en enfermedades autoinmunes y procesos inflamatorios como la preeclampsia (Branzk & Papayannopoulos, 2013, Nel et al., 2016).

Dado que estudios recientes sostienen que el sistema inmune innato está involucrado en la patogénesis de la preeclampsia, el éxito de cualquier embarazo depende de que la madre pueda “abrazar” a su feto inmunológicamente en lugar de atacarlo. El cuerpo de la madre puede atacar el feto dado que solo la mitad del acervo genético le pertenece a esta; el restante al padre. El ataque puede generar todo un espectro de trastornos que pueden conducir al nacimiento prematuro por preeclampsia; en la patogénesis de esta afección se ha descubierto la formación de NETs (Gupta et al., 2007).

Con respecto a la preeclampsia, conocida como una afección grave que puede ocurrir durante el embarazo, de un 5-7% de frecuencia, mayormente en mujeres jóvenes y nulíparas. En embarazos normales, se asocia con una menor sensibilidad materna a los vasopresores endógenos, lo cual en etapas tempranas de la gestación conduce a la expansión del espacio intravascular de la madre y reducción de la presión arterial. Las mujeres con preeclampsia no exhiben la capacidad refractaria normal a los vasopresores endógenos y en consecuencia no ocurre la expansión normal del espacio intravascular. Los fundamentos para el diagnóstico son: elevación de la presión arterial sistólica de ≥ 140 mm Hg o diastólica ≥ 90 mm Hg materna en dos ocasiones con seis

horas de diferencia y proteinuria ≥ 300 mg en muestra de orina de 24 horas. Entre las complicaciones de la preeclampsia se incluyen: parto prematuro, desprendimiento de placenta, restricción del crecimiento intrauterino, edema pulmonar materno y eclampsia que puede poner en peligro la vida de madre y el feto (DeCherney et al., 2013).

El tratamiento es el parto prematuro, siendo en casos de prematuridad extrema el manejo expectante según el estudio de cada caso. Aunque la placenta desempeña un papel central en la etiología, esta afección está asociada con un daño endoscópico del endotelio materno y anomalías de la respuesta inflamatoria, mediada en parte por el arrendamiento de micro-debris placentarios por el sincitio trofoblasto placentario, en otras palabras, con la abundancia de micro-debris placentario en circulación sanguínea materna. Se ha demostrado que estos micro-debris dependientes de la dosis pueden activar neutrófilos y estimular la liberación de NETs. También se piensa que los niveles elevados de la citosina IL-8 (otro factor derivado placentario) e interacción con micro-debris podrían estar implicados en la activación de neutrófilos y por ende el fenómeno de netosis (Hahn, 2012; Branzk & Papayannopoulos, 2013, DeCherney et al., 2013). La figura 2 muestra la ocurrencia de NET en preeclampsia:

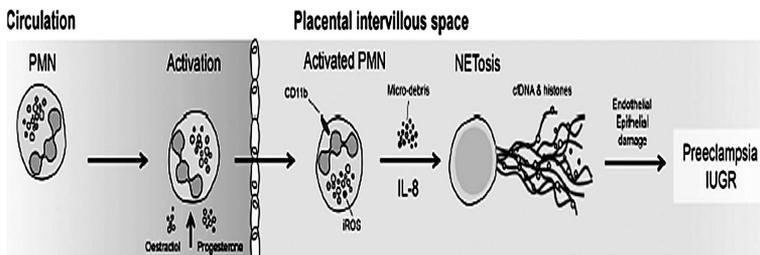


Figura 2. Ocurrencia de NET en la preeclampsia. Se han detectado NETs directamente en el espacio intervilloso de las placentas preeclámpicas. Estas NETs parecen ser desencadenadas por la liberación elevada de micro-debris placentarios altamente inflamatorios. Fuente: tomado de Hahn et al., (2012).

Gupta et al. (2005), en su publicación, titulada y traducida al español: "Inducción de ADN extracelular de neutrófilos por micropartículas placentales y IL-8 y su presencia en la preeclampsia" probaron si los factores derivados de la placenta activaron neutrófilos periféricos para generar NET, y si la formación de NET se incrementó en la placenta preecláptica. Los autores informan en sus resultados que tanto al IL-8 derivada de placenta y el STBM (micropartículas inflamatorias de sincitiotrofoblasto) activaron eficientemente los neutrófilos y desencadenaron la formación de NET. Detectaron gran número de NET en el espacio intervelloso de las placentas preeclápticas, por tanto sugieren que la NETosis parece ser una parte integral de la activación de neutrófilos, y su mayor presencia en preeclampsia sugiere la posibilidad de desempeñar una patología subyacente.

Aunado a la investigación anterior, Gupta y sus colegas (2006), de acuerdo con sus observaciones previas e investigación de informes sobre la secreción de ADN nuclear por los neutrófilos circulatorios activados para generar NET, publicaron lo siguiente traducido al español: "Ocurrencia de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NET) en Pre-Eclampsia ¿Un vínculo con niveles elevados de ADN libre de células?". Estos autores mencionan que, dado que la respuesta fisiológica como STBM al parecer induce el fenómeno en el espacio intervelloso de las placentas afectadas, es posible que un gran número de NET interrumpen el flujo de sangre a través de esta interfaz feto-materna crítica, conduciendo a una condición de hipoxia. En consecuencia, la preeclampsia puede no estar asociada solamente con una condición más distal de hipoxia en el sitio de las arterias espirales inadecuadamente modificadas, sino que también puede ocurrir directamente en el sitio de intercambio feto-materno, el espacio intervelloso. Esta hipótesis puede tener implicaciones fundamentales con respecto a la comprensión de este enigmático trastorno.

Según Gupta et al., (2007) se ha sugerido que los STBM que se liberan en la preeclampsia han alterado las características morfológicas, incluidas las áreas de nudos sincitial atribuidos

a la hipoxia placentaria y áreas de aponecrosis asociadas con la pérdida de STBM. Además, la perfusión inadecuada de la placenta por la sangre materna es una característica clave en el desarrollo y la patogénesis de la preeclampsia. En ese sentido, la incapacidad de los citotrofoblastos invasivos para cambiar su repertorio de moléculas de adhesión para que se asemeje a la de las células vasculares, resulta en la invasión inadecuada y la modificación de las arteriolas espirales maternas. En consecuencia, estas arterias uterinas siguen siendo vasos estrechos de alta resistencia, que no pueden bañar adecuadamente las vellosidades placentarias en un flujo aún lento de sangre materna, para satisfacer las crecientes demandas del feto por oxígeno y nutrientes.

Se ha propuesto que esta reducción de la perfusión placentaria puede conducir a estrés oxidativo en la placenta, lo que resulta en la generación de especies reactivas de oxígeno. De esta manera, puede preverse una cascada, con una naturaleza de bucle sin fin, por lo que la condición hipóxica inicial y el estrés oxidativo asociado provocado por la modificación inadecuada de las arterias espirales, conducirá a la activación de los neutrófilos y la formación de las NET. La presencia de estas NET obstaculizará aún más la circulación sanguínea a través del espacio intervelloso, aumentando así el grado de hipoxia y el estrés oxidativo asociado. Además, se ha propuesto que la hipoxia promueve la liberación de citoquinas tales IL-6 e IL-8 por trofoblasto placentario de embarazos preeclámpicos. En consecuencia se podría atraer más neutrófilos adicionales y su activación posterior conduciría a nuevos ciclos de reclutamiento y activación.

Según sus observaciones, estos autores plantean una visión generalmente aceptada de la perfusión de placenta reducida en la preeclampsia. No obstante, también plantean una nueva hipótesis menos aceptada, de que la preeclampsia no es el resultado de la hipoxia placentaria, sino que implica períodos de hipoxia y reoxigenación, asociados con un grado considerable de estrés oxidativo. Esta fluctuación en el flujo sanguíneo estaría mediada por la rápida generación y depuración de las NET, conduciendo

a una entrada repentina de sangre materna rica en oxígeno en estos tejidos hipóxicos. Estas condiciones alternas de hipoxia/reoxigenación o estrés oxidativo se asocian con un aumento de la apoptosis y aponecrosis del tejido veloso, lo que conduciría a una mayor liberación de STBM por la placenta isquémica, induciendo así la generación de más NET. En su conclusión se menciona la importancia que implica el comprender las vías moleculares que conducen a la generación de NET después de la activación de neutrófilos, para tener una mejor visión de la patogénesis de los trastornos inflamatorios y ser utilizada terapéuticamente.

Más recientemente, la investigación de Giaglis y sus colegas (2016), hace hincapié en nuevos estudios incluyendo el descubrimiento de un nuevo subconjunto de neutrófilos en la decidua, la interacción de la proteína placentaria 13 (PP13) y los neutrófilos en la modulación de la modificación de la arteria espiral, así como el uso de modelos animales para elucidar la función de los neutrófilos en la implantación, la gestación y el parto, útiles en la identificación de componentes clave implicados en la pérdida fetal recurrente, preeclampsia o nuevas moléculas de señalización como esfingolípidos, planteando la hipótesis de que fosfolípidos pueden contribuir a la disfunción placentaria en casos pertinentes con pérdida recurrente fetal, pues los esfingolípidos funcionan como un elemento regulador de la actividad de células inmunes innatas en la interfaz feto-maternal. En relación con lo anterior, se indica que, al observar células de decidua humana del primer trimestre, se observó que la inhibición del sistema de esfingosina quinasa condujo a un aumento de la producción de IL-8, lo que indica que las anomalías de este sistema podrían promover la infiltración de PMN (polimorfonucleares) través de la producción de quimioquinas.

Aunque no se tienen datos claros sobre la participación de esfingolípidos en la preeclampsia, los investigadores señalan que S1P (sphingosine-1-phosphate) puede tener efectos pronunciados en el tono vascular. De esta manera, un desequilibrio en la síntesis de S1P podría contribuir al daño endotelial asociado con la

preeclampsia y, por otro lado, se ha observado un aumento de los niveles de ceramida en la preeclampsia, lo que podría afectar la supervivencia de los trofoblastos y su activación promoviendo la autofagia. Autores como Dobierzewska et al., (2016) se han dado la tarea de comprender esto, como en la publicación titulada y traducida al español: Insuficiencia de la vía angiogénica de receptores de esfingosina quinasa-1/esfingosina-1-fosfato en la preeclampsia, que han encontrado estas irregularidades en pacientes.

Finalmente, se puede concluir que es necesario conocer y comprender todas las posibles vías de activación moleculares de este complejo fenómeno conocido como NETosis y su participación y consecuente efecto en la patogénesis de la preeclampsia, y que, en caso de existir la posibilidad, puedan ser utilizadas nuevas y mejores formas de tratamiento en pro de mejorar el éxito de supervivencia tanto del feto como de la madre.

Bibliografía

- AbiAbdallah, D. S., & Denkers, E. Y. (2012). Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites. *NETosis: At the Intersection of Cell Biology, Microbiology, and Immunology*, 182.
- Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. (2007). Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*, 5(8): 577-82.
- Brinkmann, V., Laube, B., Abu Abed, U., Goosmann, C., & Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *J Vis Exp.* (36), e1724, doi:10.3791/172.

- Branzk, N., & Papayannopoulos, V. (2013). Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. In *Seminars in immunopathology*, vol. 35 (4), pp. 513-530.
- Camicia, G., & de Larrañaga, G. (2013). Trampas extracelulares de neutrófilos: un mecanismo de defensa con dos caras. *Medicina Clínica*, 140(2): 70-75.
- DeCherney, A. H., Nathan, L., Laufer, N. & Roman, A. (2013). Diagnóstico y tratamiento ginecoobstetricos. 11 ed. México: Mc Graw Hill.
- Dobierzewska, A., Palominos, M., Sanchez, M., Dyhr, M., Helgert, K., Venegas-Araneda, P., & Illanes, S. E. (2016). *Impairment of angiogenic sphingosine kinase-1/sphingosine-1-phosphate receptors pathway in preeclampsia*. Recuperado 7 de enero de 2017, de <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0157221>
- Giaglis, S., Stoikou, M., Grimolizzi, F., Subramanian, B. Y., van Breda, S. V., Hoesli, I., & Hahn, S. (2016). Neutrophil migration into the placenta: Good, bad or deadly?. *Cell adhesion & migration*, 10(1-2), 208-225.
- Gupta, A. K., Hasler, P., Holzgreve, W., Gebhardt, S., & Hahn, S. (2005). Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Human immunology*, 66(11), 1146-1154.
- Gupta, A., Hasler, P., Gebhardt, S., Holzgreve, W., & Hahn, S. (2006). Occurrence of Neutrophil Extracellular DNA Traps (NETs) in Pre-Eclampsia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1075(1), 118-122.

- Gupta, A. K., Hasler, P., Holzgreve, W., & Hahn, S. (2007). Neutrophil NETs: a novel contributor to preeclampsia-associated placental hypoxia?. In *Seminars in immunopathology*, 29 (2), 163-167.
- Hahn, S., Giaglis, S., Hoesli, I., & Hasler, P. (2012). Neutrophil NETs in reproduction: from infertility to preeclampsia and the possibility of fetal loss. *Frontiers in immunology*, 3, 362.
- Nel, J. G., Theron, A. J., Pool, R., Durandt, C., Tintinger, G. R., & Anderson, R. (2016). Neutrophil extracellular traps and their role in health and disease. *South African Journal of Science*, 112(1-2), 01-09.
- Silva, L. M., Caro, T. M., Gerstberger, R., Vila-Viçosa, M. J., Cortes, H. C., Hermosilla, C., & Taubert, A. (2014). The apicomplexan parasite *Eimeria arloingi* induces caprine neutrophil extracellular traps. *Parasitology research*, 113(8), 2797-2807.
- Urban, C. F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., & Zychlinsky, A. (2009). Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*, 5(10), e1000639.
- Yam-Puc, J. C., García-Marín, L., & Sánchez-Torres, L. E. (2012). Trampas extracelulares de neutrófilos (NET), consecuencia de un suicidio celular. *Gaceta Médica de México*, 148(1), 68-75.
- Yipp, B. G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C. N., Scott, B. N., Zbytnuik, L. D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H. C., & Malawista, S. E. (2012). Dynamic NETosis is carried out by live neutrophils in human and mouse bacterial abscesses and during severe gram-positive infection. *Nature Medicine*, 18(9), 1386.

