




Rol de trampas extracelulares de neutrófilos en el pronóstico de las infecciones del sistema respiratorio

Role of neutrophil extracellular traps in the prognosis of respiratory tract infections

Flores Guzmán, Francisco David; Hernández Rivera, Anna Gabriela; Iraheta Tobar, Karla Gabriela

-  **Francisco David Flores Guzmán**
davidflores.gzm@gmail.com
Universidad Dr. José Matías Delgado, El Salvador
-  **Anna Gabriela Hernández Rivera**
Universidad Dr. José Matías Delgado, El Salvador
-  **Karla Gabriela Iraheta Tobar**
Universidad Dr. José Matías Delgado, El Salvador

Alerta
Ministerio de Salud, El Salvador
ISSN-e: 2617-5274
Periodicidad: Semestral
vol. 6, núm. 2, 2023
ralerta@salud.gob.sv

Recepción: 10 Junio 2022
Aprobación: 08 Marzo 2023
Publicación: 20 Julio 2023

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/419/4194315010/>

DOI: <https://doi.org/10.5377/alerta.v6i2.15448>

Citación recomendada: Flores Guzmán FD, Hernández Rivera AG, Iraheta Tobar KG. Rol de trampas extracelulares de neutrófilos en el pronóstico de las infecciones del sistema respiratorio. *Alerta*. 2023;6(2):149-156. DOI: 10.5377/alerta.v6i2.15448

Resumen: Las trampas extracelulares de neutrófilos (NET, por sus siglas en inglés) han surgido recientemente como un vínculo potencial entre la inmunidad y la inflamación, que podría cumplir un papel clave en la patogénesis de las infecciones de vías respiratorias. El objetivo de esta revisión es determinar su rol como marcador pronóstico en enfermedades infecciosas de vías respiratorias. Para la elaboración de este artículo de revisión narrativa se consultaron las publicaciones disponibles a través de una búsqueda automatizada en las bases de datos de PubMed, Scopus y Embase. Las concentraciones elevadas de trampas extracelulares de neutrófilos (cfADN, complejos de mieloperoxidasas-ADN) en pacientes con cuadro clínico grave por infecciones de vías respiratorias, se relacionan con una estancia hospitalaria más larga, periodo prolongado de administración de antibióticos, aumento del riesgo de ingreso a la UCI, necesidad de ventilación mecánica, disfunción orgánica e incluso la muerte ($p \leq 0,05$). A pesar de no contar con un parámetro de medición estandarizado, el exceso de trampas extracelulares de neutrófilos se corresponde con la gravedad del daño tisular observado en pacientes con infecciones de vías respiratorias, esto revela el importante rol pronóstico de la respuesta de los neutrófilos y del proceso de la NETosis en las enfermedades infecciosas pulmonares.

Palabras clave: Neumonía, infecciones por coronavirus, trampas extracelulares de neutrófilos, pronóstico.

Abstract: Neutrophil extracellular traps (NET) have recently emerged as a potential link between immunity and inflammation, which could play a key role in the pathogenesis of respiratory tract infections. This review aims to determine the role of neutrophil extracellular traps as prognostic markers in respiratory tract infectious diseases. For this article a literature review was undertaken, consulting available publications through an automated search in PubMed, Scopus, and Embase databases. High concentrations of neutrophil extracellular traps (cfDNA, Myeloperoxidase-DNA complexes) in patients with severe clinical presentation due to respiratory tract infections are related to a longer length of hospital stay, prolonged period of antibiotic administration and increased risk of admission to the ICU, need for mechanical ventilation, organ dysfunction and even death ($p \leq 0.05$). Despite not having a standardized

measurement parameter, the excess of neutrophil extracellular traps corresponds to the severity of tissue damage observed in patients with respiratory tract infections, revealing the important prognostic role of the neutrophil response and NETosis process in pulmonary infectious diseases.

Keywords: Pneumonia, Coronavirus Infections, Neutrophil Extracellular Traps, Prognosis.

INTRODUCCIÓN

Las trampas extracelulares de neutrófilos (NET) consisten en redes de cromatina y proteínas granulares y ADN, producto de la liberación del contenido de los neutrófilos, como un mecanismo de defensa para atrapar y destruir microorganismos¹.

Los neutrófilos son la primera línea de defensa del sistema inmune que en respuesta a estímulos inflamatorios, utilizan diferentes mecanismos para eliminar microorganismos patógenos, entre ellos, la fagocitosis, la degranulación² y las trampas extracelulares de neutrófilos que están compuestas por fibras de cromatina extracelular marcadas con proteínas antimicrobianas que participan en la respuesta inmune³, y aunque su rol en la respuesta inmune es claro, la formación excesiva también puede ser perjudicial para el huésped, pues desencadenan mecanismo de respuesta inflamatoria no deseada^{4,5}.

Este es un mecanismo alternativo desarrollado por los neutrófilos, que fue descrito por Brinkmann *et al.*, en el año 2004, en el que los neutrófilos llevan a cabo un mecanismo de defensa de los neutrófilos donde se liberan estructuras fibrilares de ADN al espacio extracelular y es evidente que una de sus particularidades, comparado con la fagocitosis y la degranulación, es la eliminación eficiente de microorganismos^{6,7}.

Actualmente, el estudio de nuevos marcadores inmunológicos constituye un área importante de investigación con múltiples aplicaciones potenciales en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas⁸, y debido a las funciones pleiotrópicas de los neutrófilos, especialmente en las vías respiratorias, la convierte en un área de interés⁹.

Por otro lado, se ha identificado que las infecciones de las vías respiratorias pueden ser causadas por un grupo variado de agentes bacterianos y virales, que ocasionan enfermedades con sintomatología similar, representando así una de las primeras causas de atención médica en todo el mundo¹⁰. Recientemente, la aparición de la pandemia de SARS-CoV-2 ha evidenciado la importancia de las infecciones respiratorias virales, como la influenza, y otras infecciones de causa bacteriana, que están asociadas, frecuentemente, a una alta mortalidad^{11,12}.

Las infecciones de las vías respiratorias son una causa importante de morbi-mortalidad en todo el mundo¹³. Según el Foro Internacional de Sociedades Respiratorias (FIRS, por sus siglas en inglés), se estima que cerca de cuatro millones de personas mueren a causa de infecciones cada año, 98 % de ellas, debido a infecciones de las vías respiratorias inferiores¹⁴.

La elaboración de este artículo de revisión narrativa incluyó la consulta de publicaciones disponibles a través de una búsqueda automatizada contenidas en las bases de datos de PubMed, Scopus y Embase. Se incluyeron artículos originales, estudios de cohorte, artículos de revisión, en español y en inglés, con una antigüedad menor a los cinco años en el 81,2 % de las referencias. Se utilizaron conectores booleanos y la expresión de búsqueda: infecciones de vías respiratorias AND trampas extracelulares de neutrófilos, neumonía AND trampas extracelulares de neutrófilos, *respiratory tract infection* AND *neutrophil extracellular traps*, *pneumonia* AND *neutrophil extracellular traps*.

Por lo tanto, el objetivo de esta revisión es describir el rol de las trampas extracelulares de neutrófilos como marcador pronóstico en enfermedades infecciosas de vías respiratorias.

DISCUSIÓN

Trampas extracelulares de neutrófilos en enfermedades infecciosas de vías respiratorias

Las NET, constituyen un fenómeno biológico de ruptura de la membrana nuclear de los neutrófilos como respuesta ante la presencia de microorganismos, lo que permite la mezcla de los componentes celulares y nucleares, que finaliza con la ruptura de la membrana celular y la liberación de los componentes al medio extracelular y de esta forma, atrapar a los microorganismos y evitar su proliferación.

Los neutrófilos son altamente eficaces en la eliminación de los patógenos y con mínimos efectos adversos sobre el huésped, sin embargo, estos mecanismos efectores podrían no ser insuficientes para controlar una infección masiva¹⁵.

El rol de las NET se ha vuelto de interés, por su papel en las enfermedades infecciosas de las vías respiratorias. Antes de su liberación, estos se conforman por una mezcla compleja de componentes intracelulares que son organizados por los neutrófilos dentro del citoplasma¹⁶. Se conocen entre 20 y 30 proteínas que forman las trampas extracelulares, incluyendo proteínas antimicrobianas y proteasas, al igual que proteínas del citoesqueleto y enzimas glucolíticas. La liberación de NET puede depender de la elastasa de neutrófilos, especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés) y la citrulinación de histonas¹⁷.

Al ser liberados, atrapan y destruyen bacterias, hongos, virus y protozoos, participan en las defensas inmunitarias del huésped mediante la formación de trampas para evitar la propagación del patógeno en el organismo¹⁸. Aunque la formación de NET es un mecanismo de defensa contra microorganismos, algunos datos recientes sugieren que la formación excesiva de estos contribuye a la formación de lesión pulmonar al causar muerte de células epiteliales, endoteliales y pulmonares, así como la formación de trombos intravasculares^{19,20}.

La producción de NET es consecuencia de una forma regulada de muerte celular llamada NETosis, un tipo de muerte celular diferente a la apoptosis o la necrosis^{21,22}. Vorobjeva *et al.*, han descrito los diferentes mecanismos de la NETosis. Una de ellas, la NETosis vía clásica o suicida, es la que finaliza con la muerte celular y la NETosis vital en la que se mantiene la viabilidad y función de los neutrófilos, y se describe como la muerte celular programada. Se caracteriza por la liberación de componentes granulares en el citosol, así como por la descondensación de la cromatina asociada con la modificación de las histonas²³.

La formación desregulada de las trampas extracelulares de neutrófilos contribuye a la patogénesis de las infecciones de las vías respiratorias, la NETosis se asocia con la gravedad de la enfermedad en pacientes que sufren lesiones de múltiples órganos inducidas por infecciones virales como el SARS-CoV-2²⁴.

Se cree que algunos neutrófilos que sobreviven, se vuelven anucleares y pueden provocar daño tisular. Según Twaddell *et al.*, la formación de NET produce un efecto citotóxico para el epitelio y el endotelio pulmonar. Su producción excesiva se observa en enfermedades de las vías respiratorias como la neumonía y otras patologías que causan lesión pulmonar aguda, así como en diversas enfermedades pulmonares crónicas²⁵.

Al iniciar la liberación de componentes quimioatrayentes y el reclutamiento de neutrófilos, se genera una respuesta universal del individuo ante los virus o bacterias. Ante dicho estímulo, la membrana celular de los neutrófilos expresa receptores y moléculas de adhesión para varios ligandos, incluidas las inmunoglobulinas, las moléculas de membrana en otras células y las citoquinas²⁶.

Según Tomar *et al.*, la infiltración progresiva de los neutrófilos en el sitio de la infección y liberación de NET produce una respuesta inmunitaria al liberar citoquinas y quimioquinas en gran cantidad resultando en una «tormenta de citoquinas» que contribuyen al desarrollo de síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y sepsis. Mediante la liberación de NET en procesos infecciosos se dispersan las histonas, el ADN y las proteínas granulares, complejos de la mieloperoxidasa (MPO), la elastasa de neutrófilos, la cathepsina G y la proteinasa 3, lo que da como resultado una destrucción grave del tejido y establece el ciclo de auto amplificación de la necroinflamación²⁷.

La inflamación es crucial para la defensa inmunitaria contra los patógenos. Sin embargo, cuando se encuentran desreguladas, las citoquinas que normalmente median en la inmunidad protectora y promueven la recuperación pueden causar un estado inmunitario hiperactivo, produciendo mayor daño en el tejido pulmonar^{28,29}.

Y si bien, en la actualidad se usan diversos biomarcadores de respuesta inflamatoria e infección, en concreto las interleucinas, proteína C reactiva (PCR) o procalcitonina por su fiabilidad para ser utilizados de manera rutinaria como marcadores diagnósticos y pronósticos, estos presentan varias limitaciones. Unos muestran poca estabilidad y una vida media corta, otros, una cinética más lenta o no se elevan en infecciones virales, lo que limita su utilidad³⁰.

Por tanto, es importante explorar la utilidad de nuevas moléculas como las NET y sus componentes como un nuevo marcador pronóstico en las infecciones respiratorias.

Identificación y cuantificación de trampas extracelulares de neutrófilos en enfermedades infecciosas de vías respiratorias

Pérez *et al.* refieren que los procedimientos para cuantificar trampas extracelulares de neutrófilos son muy diversos y no se ha logrado un consenso entre los investigadores para establecer un método en particular que sea considerado el «estándar de oro»³¹. De igual forma, Plana *et al.* manifiestan que, hasta la fecha, ningún método directo y fiable para cuantificarlos ha sido reportado, por lo que las mediciones de la NETosis se basan usualmente en cuantificaciones indirectas de sus componentes por separado o combinados³².

Las trampas extracelulares de neutrófilos se han estudiado en gran detalle y se han descrito varios componentes; los más importantes incluyen la cromatina descondensada, las histonas nucleares y 30 componentes más de proteínas granulares con actividad bactericida tales como las elastasas de neutrófilos (NE, por sus siglas en inglés), mieloperoxidasas, cathepsina G, lactoferrina, entre otros^{33,34}.

No obstante, no todos los componentes son específicos de la NETosis, sino también pueden estar presentes en otras células nucleadas (p. ej., eosinófilos, macrófagos, mastocitos) y pueden liberarse durante otras formas de muerte celular distintas a la NETosis³⁵. Por ello, la formación de NET se refleja mejor en la liberación de marcadores específicos de neutrófilos, tales como histonas citrulinadas 3 (H3Cit), complejos de MPO-ADN, NE y ADN circulante fragmentado (cfADN), que son los marcadores medidos en la mayoría de los estudios³⁶.

La medición de ADN total no es específica de NET también mide el ADN que proviene de células necróticas. Los complejos MPO-ADN son más precisos, debido a que en conjunto miden el ADN y la MPO que proceden específicamente de los neutrófilos³⁷. Sin embargo, la cuantificación de H3Cit mediante inmunohistoquímica es considerado el marcador más fiable, este proceso es específico de la NETosis³⁸.

Los métodos para cuantificar tanto a las NET como a sus componentes se apoyan en una amplia variedad de técnicas incluyendo el ensayo inmunoabsorbente de enzimas (ELISA), la citometría de flujo, los ensayos basados en ADN libre de células, la microscopía confocal tridimensional y la microscopía fluorescente^{39,40}.

A pesar de que cada una de estas técnicas y métodos tiene sus ventajas, Gupta *et al.* reportan que existen limitaciones específicas de cada uno de ellos²².

Aún cuando estos métodos de medición proporcionan información sobre los cambios en la morfología de los neutrófilos durante una infección y en los procesos bioquímicos que presentan las células que mueren por la NETosis, presentan una serie de limitaciones, tales como la falta de objetividad, el bajo rendimiento, son monótonos, lentos y difíciles de comparar y/o reproducir entre laboratorios, y tienen un alto costo^{41,42}. Sin embargo, Rebernick *et al.* afirman que uno de los métodos más utilizados para cuantificar los NET es hacer un conteo a simple vista del número de células que tienen ADN descondensado y/o proteínas asociadas a las NET mediante microscopía de fluorescencia⁴³.

El acceso a las muestras de tejidos generalmente es limitado; sin embargo, se ha logrado hacer análisis de las NET en muestras de pacientes, lo que ha contribuido en la caracterización del rol de estas en diferentes enfermedades y probablemente, a trazar nuevas líneas de biomarcadores y dianas terapéuticas, debido a que los parámetros en sangre y plasma de la formación de NET han permitido ser considerados como potenciales marcadores pronósticos⁴⁴.

La cuantificación de las NET en plasma y sangre permite una mejor comprensión de los procesos fisiopatológicos sobre la inmunidad humana, recapitulan mal la biología de los neutrófilos en el pulmón que sufre procesos inflamatorios. De hecho, los neutrófilos inactivos presentes en la circulación periférica para poder migrar al tejido pulmonar *per se*, deben sufrir diferentes procesos de maduración antes de alcanzar un estado activo. Por ello, los neutrófilos bronquioalveolares representan un modelo más preciso para los estudios de patologías pulmonares, especialmente de origen infeccioso^{45,46}.

Dado que los métodos que existen para cuantificar los NET y sus componentes no están estandarizados y presentan problemas de sensibilidad y especificidad⁴⁷, hasta el momento no existe un valor ni rango específico que determine los niveles o concentraciones «normales» frente a los niveles «patológicos» de las NET y/o sus componentes en un tejido⁴⁸.

Usualmente, en los ensayos clínicos se emplea lo que se conoce como «*cut-off value*» para establecer estos valores. Para ello, se determinan los niveles de NET y/o sus componentes en muestras de plasma, lavado bronquioalveolar o esputo de pacientes control, para obtener un valor de prueba y compararlo posteriormente con un valor de referencia. El valor de referencia representa entonces el nivel de umbral de las NET, niveles por encima de este indican riesgo de mortalidad, complicaciones o estancia hospitalaria prolongada (Tabla 1)⁴⁹.

Trampas extracelulares de neutrófilos en el pronóstico de enfermedades infecciosas de vías respiratorias

Un estudio reciente por Zhu *et al.*, realizado en 93 pacientes hospitalizados con influenza tipo A, demostró que los NET de pacientes con H7N9 y H1N1 incrementan la permeabilidad de las células epiteliales y, en consecuencia, los niveles de cf-ADN y MPO-ADN tienen una correlación positiva con el sistema de puntuación APACHE II y cálculos aproximados de mortalidad ($r = 0,4802$, $p < 0,05$) confirmando el efecto dañino de los NET en el parénquima pulmonar. El deterioro singular de la distensibilidad pulmonar sugiere que los pacientes con mayor cantidad sérica de NET en los primeros días desde el ingreso, tiene mayor riesgo de complicaciones, de estancia hospitalaria y/o incluso la muerte⁵⁰.

De igual forma Zhu *et al.* mencionan que cuando los NET no se regulan adecuadamente se asocian con enfermedades graves, incluso en los pulmones de pacientes con síndromes de dificultad respiratoria aguda bajo ventilación mecánica, como lo demuestran en su estudio al comparar las muestras de pacientes con COVID-19 severo con necesidad de ventilación mecánica y pacientes con COVID-19 leve respirando

aire ambiente, evidenciando que los pacientes que necesitaron ventilación mecánica tuvieron niveles significativamente más altos de cfADN y MPO-ADN ($p = 0,05$)⁵⁴.

Estos estudios hacen suponer que el COVID-19 severo podría definirse por una neutrofilia, de la misma forma en que se observa en otras enfermedades ocasionadas por virus pandémicos, incluidos la influenza H1N1, el SARS-CoV y el coronavirus del síndrome respiratorio del Oriente Medio, que también presentan una infiltración de neutrófilos en el sitio de infección, revelando una asociación entre la circulación de marcadores de NET y la inflamación, una disregulación de la homeostasis y el daño endotelial, con el consecuente desarrollo del síndrome de dificultad respiratoria aguda⁵⁵.

Recientemente, Ebrahimi *et al.* también observaron que la activación excesiva de los neutrófilos y la producción consiguiente de NET en pacientes con neumonía están asociados a un aumento de complicaciones, como la incapacidad del intercambio gaseoso alveolar, la disfunción pulmonar y el aumento del riesgo de muerte. En su estudio incluyó a 310 pacientes con neumonía adquirida en la comunidad, en el que notaron que el tiempo de estabilización clínica de los signos vitales era más prolongado en los pacientes que tenían mayores niveles de NET con una mediana de 5,0 (entre 2,6 y 9,0 días), comparado con aquellos con niveles más bajos, es decir, los que se encontraban en los tres cuartiles inferiores (mediana de 4,0; entre 2,0 y 7,9 días) con un cociente de riesgos instantáneos ajustado de 0,97; IC 95 % 0,94 - 0,99; $p < 0,01$), el tiempo para el alta fue más corto en sujetos con menores niveles de NET (mediana de 7,0; entre 5,0 y 11,0 días en comparación con 9,0; entre 5,0 y 14,0 días: HR 0,90; IC 95 % 0,82 - 0,99; $p < 0,05$) y una administración más prolongada de antibióticos intravenosos en sujetos con concentraciones más altas (IC 95 % 0,1- 0,94; $p < 0,05$)⁵⁶.

Por lo tanto, los autores proponen que el efecto sistémico y local de inflamación proporciona una manera de medir los cambios de los marcadores séricos de NET para valorar el pronóstico de la enfermedad y a su vez establecer nuevas dianas terapéuticas. La evidencia reciente muestra que los altos niveles de NET séricos al ingreso, se asocian con un peor pronóstico.

CONCLUSIÓN

Con base a la literatura consultada, los datos muestran que los niveles elevados de marcadores circulantes de NET en pacientes con infecciones de vías respiratorias pueden ser considerados como un marcador pronóstico, pues ilustran la severidad del daño celular observado, precisamente entre los pacientes con un cuadro clínico más grave, señalado por medio de escalas de severidad. Además, están relacionados con una estancia hospitalaria más larga, un periodo prolongado de administración de antibióticos intravenosos, un mayor riesgo de ingreso a la unidad de cuidados intensivos, la necesidad de ventilación mecánica, la disfunción orgánica e incluso con la muerte.

La cuantificación de los marcadores de NET es difícil de ser implementada en la práctica clínica debido a los desafíos que existen por la falta de métodos estandarizados para su medición, sin embargo, los hallazgos son importantes, ya que refuerzan el hecho de que la NETosis puede convertirse en un biomarcador de pronóstico de severidad útil en las enfermedades infecciosas de vías respiratorias, especialmente en la COVID-19, la influenza y la neumonía bacteriana que han sido las más estudiadas y podrían ser el objetivo terapéutico antes del desarrollo de síndrome de dificultad respiratoria aguda.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la Dra. Veronica Cecilia Fuentes Rodríguez, por sus aportes al manuscrito.

FINANCIAMIENTO

Los autores declaran no haber recibido financiamiento proveniente de agencias del sector público, sector privado, comercial o entidades sin ánimo de lucro.

TABLA 1
Comparación de valores de referencia de marcadores de la NETosis, método de detección y tipo muestra

Referencia	Muestra	Método de medición	NET	Valor de referencia
Zhu L <i>et al.</i> ⁵⁰	Sangre	ELISA	cfADN	248,6 ± 38,5 ng/mL
			Complejos de MPO-ADN	1,1 fold
Mikacenic C <i>et al.</i> ⁵¹	Líquido de lavado bronco- alveolar	Ensayos colorimétricos	cfADN	Indetectable
			Complejos de MPO-ADN	Indetectable
			Peroxidasa	Indetectable
Ng H <i>et al.</i> ⁵²	Sangre	ELISA	cfADN	345 (319 - 486) ng/mL
			Complejos H3Cit-ADN	84 (64 - 101) ng/mL
		PCR en tiempo real	NE	16 (12 - 23) ng/mL
			cfADN	4,1 (2,8 - 5,3) ng/μL
Huckriede J <i>et al.</i> ⁵³	Plasma	ELISA	Histonas H3	0,0 (0,0 - 0,0) μg/mL
			NE	0,0 (0,0 - 0,0) ng/mL
			GAS6	14,4 (11,0 - 19,7) ng/mL
			sAXL	17,3 (13,7 - 18,4) ng/mL

cfADN ADN circulante fragmentado
 ELISA enzimoimmunoanálisis de adsorción
 GAS6 gen específico de detención del crecimiento 6
 H3Cit histonas citrulinadas
 NE elastinas de neutrófilos
 NET trampas extracelulares de neutrófilos
 MPO mieloperoxidasa
 PCR reacción en cadena de polimerasa
 sAxl Axl soluble

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yam J, García L, Sánchez L. Trampas extracelulares de neutrófilos (NET), consecuencia de un suicidio celular. 2012. 2212;(148):68-75. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2012/gm121i.pdf>
2. Camicia G, de Larrañaga G. Trampas extracelulares de neutrófilos: un mecanismo de defensa con dos caras. Medicina Clínica. 2013;140(2):70-75. DOI: 10.1016/j.medcli.2012.04.022
3. Yuzeir S, Gercheva L. Inflammation in the 21st Century. Estados Unidos. IntechOpen. 2022. 302 p.
4. Boeltz S, Amini P, Anders H, Andrade F, Bilyy R, Chatfield S, *et al.* To NET or not to NET: current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps. Cell Death Differ. 2019;26(3):395-408. DOI: 10.1038/s41418-018-0261-x
5. Yaqinuddin A, Kvietyts P, Kashir J. COVID-19: Role of neutrophil extracellular traps in acute lung injury. Respiratory Investigation. 2020;58(5):419-420. DOI: 10.1016/j.resinv.2020.06.001
6. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. Science. 2004;303(5663):1532-1535. DOI: 10.1126/science.1092385

7. Amador J, Rodríguez R, García J. The Neutrophil's role during health and disease, new insights, and open questions. 2021;25(3):25-35. Disponible en: <https://smbb.mx/wp-content/uploads/2021/11/Amador-et-al.-2021.pdf>
8. Mozzini C, Girelli D. The role of Neutrophil Extracellular Traps in Covid-19: Only an hypothesis or a potential new field of research? *Thrombosis Research*. 2020;191(10):26-27. DOI: 10.1016/j.thromres.2020.04.031
9. Zhang H, Sun B. Pleiotropic regulations of neutrophil receptors response to sepsis. *Inflamm. Res*. 2017;66(3):197-207. DOI: 10.1007/s00011-016-0993-3
10. Vázquez J, Salas J, Pérez R, Montes M. Salud respiratoria en América Latina: número de especialistas y formación de recursos humanos. *Arch Bronconeumol*. 2014;50(1):34-39. DOI: 10.1016/j.arbres.2013.07.011
11. Reed K. Respiratory Tract Infections. *Molecular Medical Microbiology*. 2015;1(1):1499-1506. DOI: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00084-6
12. Hyams C, Challen R, Begier E, Southern J, King J, Morley A, *et al*. Incidence of community acquired lower respiratory tract disease in Bristol, UK during the COVID-19 pandemic: A prospective cohort study. *The Lancet Regional Health - Europe*. 2022;21:e100473. DOI: 10.1016/j.lanepe.2022.100473
13. World Health Organization. The World health report#: 2004#: Changing history. Ginebra, Suiza: World Health Organization; 2004. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42891/924156265X.pdf>
14. Forum of International Respiratory Societies. The Global Impact of Respiratory Disease. Suiza: European Respiratory Society; 2017. 43 p. Disponible en: https://static.physoc.org/app/uploads/2019/04/22192917/The_Global_Impact_of_Respiratory_Disease.pdf
15. Liew P, Kubes P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiological Reviews*. 2019;99(2):1223-1248. DOI: 10.1152/physrev.00012.2018
16. Thiam H, Wong S, Wagner D, Waterman C. Cellular Mechanisms of NETosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2020;36(1):191-218. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-020520-111016
17. Santocki M, Kolaczowska E. On Neutrophil Extracellular Trap (NET) Removal: What We Know Thus Far and Why So Little. *Cells*. 2020;9(9):2079. DOI: 10.3390/cells9092079
18. Gillot C, Favresse J, Mullier F, Lecompte T, Dogné J, Douxfils J. NETosis and the Immune System in COVID-19: Mechanisms and Potential Treatments. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12(2):1-12. DOI: 10.3389/fphar.2021.708302
19. Ondracek A, Lang I. Neutrophil Extracellular Traps as Prognostic Markers in COVID-19. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2021;41(2):995-998. DOI: 10.1161/ATVBAHA.120.315633
20. Szturmowicz M, Demkow U. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Severe SARS-CoV-2 Lung Disease. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16):8854. DOI: 10.3390/ijms22168854
21. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *Journal of Cell Biology*. 2012;198(5):773-783. DOI: 10.1083/jcb.201203170
22. Gupta S, Chan D, Zaal K, Kaplan M. A High-Throughput Real-Time Imaging Technique To Quantify NETosis and Distinguish Mechanisms of Cell Death in Human Neutrophils. *The Journal of Immunology*. 2018;200(2):869-879. DOI: 10.4049/jimmunol.1700905
23. Vorobjeva N, Chernyak B. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. *Biochemistry Moscow*. 2020;85(10):1178-1190. DOI: 10.1134/S0006297920100065
24. Sung P, Hsieh S. C-type lectins and extracellular vesicles in virus-induced NETosis. *J Biomed Sci*. 2021;28(1):46. DOI: 10.1186/s12929-021-00741-7
25. Twaddell S, Baines K, Grainge C, Gibson P. The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps in Respiratory Disease. *CHEST*. 2019;156(4):774-782. DOI: 10.1016/j.chest.2019.06.012
26. Borges L, Pithon T, Curi R, Hatanaka E. COVID-19 and Neutrophils: The Relationship between Hyperinflammation and Neutrophil Extracellular Traps. *Mediators of Inflammation*. 2020;2020: e8829674. DOI: 10.1155/2020/8829674

27. Tomar B, Anders H, Desai J, Mulay SR. Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Drive Necroinflammation in COVID-19. *Cells*. 2020;9(6):1383. DOI: 10.3390/cells9061383
28. Lv D, Xu Y, Cheng H, Ke Y, Zhang X, Ying K. A novel cell-based assay for dynamically detecting neutrophil extracellular traps-induced lung epithelial injuries. *Experimental Cell Research*. 2020;394(2):112101. DOI: 10.1016/j.yexcr.2020.112101
29. Tahaghoghi S, Zafari P, Masoumi E, Rajabinejad M, Jafari-Shakib R, Hasani B, *et al.* The role of dysregulated immune responses in COVID-19 pathogenesis. *Virus Research*. 2020;290:198197. DOI: 10.1016/j.virusres.2020.198197
30. Julián A, Candel F, González J. Utilidad de los biomarcadores de inflamación e infección en los servicios de urgencias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2014;32(3):177-190. DOI: 10.1016/j.eimc.2013.01.005
31. Pérez L, Trejos A, Arias A, López J. Formación de trampas extracelulares de neutrófilos humanos in vitro: descripción de un método. *Hechos Microbiológicos*. 2019;10(1-2):12-22. DOI: 10.17533/udea.hm.v10n1a01
32. Plana E, Oto J, Medina P, Fernández Á, Miralles M. Novel contributions of neutrophils in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm, the role of neutrophil extracellular traps: A systematic review. *Thrombosis Research*. 2020;194:200-208. DOI: 10.1016/j.thromres.2020.07.039
33. Delgado V, Martínez M, Iñiguez L, García A, Alvarado A, Fafutis M. Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview. *Frontiers in Immunology*. 2017;8(81):1-20. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00081
34. Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade. *JIN*. 2018;10(5-6):414-421. DOI: 10.1159/000489829
35. Goggs R, Jeffery U, LeVine DN, Li RHL. Neutrophil-Extracellular Traps, Cell-Free DNA, and Immunothrombosis in Companion Animals: A Review. *Vet Pathol*. 2020;57(1):6-23. DOI: 10.1177/0300985819861721
36. Huckriede J, Anderberg S, Morales A, de Vries F, Hultström M, Bergqvist A, *et al.* Evolution of NETosis markers and DAMPs have prognostic value in critically ill COVID-19 patients. *Sci Rep*. 2021;11(1):15701. DOI: 10.1038/s41598-021-95209-x
37. Masuda S, Nakazawa D, Shida H, Miyoshi A, Kusunoki Y, Tomaru U, *et al.* NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clinica Chimica Acta*. 2016;459(2):89-93. DOI: 10.1016/j.cca.2016.05.029
38. Rohrbach A, Slade D, Thompson P, Mowen K. Activation of PAD4 in NET formation. *Front. Immun*. 2012;3(12):1-10. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00360
39. Kraaij T, Tengström F, Kamerling S, Pusey C, Scherer H, Toes R, *et al.* A novel method for high-throughput detection and quantification of neutrophil extracellular traps reveals ROS-independent NET release with immune complexes. *Autoimmunity Reviews*. 2016;15(6):577-584. DOI: 10.1016/j.autrev.2016.02.018
40. Kasprzycka W, Homa I, Mlak R, Małecka T. Direct and indirect methods of evaluating the NETosis process. *J Pre Clin Clin Res*. 2019;13(1):50-56. DOI: 10.26444/jpccr/105563
41. Van S, Vokalova L, Neugebauer C, Rossi S, Hahn S, Hasler P. Computational Methodologies for the in vitro and in situ Quantification of Neutrophil Extracellular Traps. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(1562):1-7. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01562
42. Singhal A, Yadav S, Chandra T, Mulay S, Gaikwad A, Kumar S. An Imaging and Computational Algorithm for Efficient Identification and Quantification of Neutrophil Extracellular Traps. *Cells*. 2022;11(2):191. DOI: 10.3390/cells11020191
43. Rebernick R, Fahmy L, Glover C, Bawadekar M, Shim D, Holmes CL, *et al.* DNA Area and NETosis Analysis (DANA): a High-Throughput Method to Quantify Neutrophil Extracellular Traps in Fluorescent Microscope Images. *Biological Procedures Online*. 2018;20(1):7. DOI: 10.1186/s12575-018-0072-y

44. Hayden H, Ibrahim N, Klopff J, Zagrapan B, Mauracher L, Hell L, *et al.* ELISA detection of MPO-DNA complexes in human plasma is error-prone and yields limited information on neutrophil extracellular traps formed in vivo. *PLOS ONE*. 2021;16(4):e0250265. DOI: 10.1371/journal.pone.0250265
45. Giacalone V, Margaroli C, Mall M, Tirouvanziam R. Neutrophil Adaptations upon Recruitment to the Lung: New Concepts and Implications for Homeostasis and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(3):851. DOI: 10.3390/ijms21030851
46. Gautam S, Stahl Y, Young G, Howell R, Cohen A, Tsang D, *et al.* Quantification of bronchoalveolar neutrophil extracellular traps and phagocytosis in murine pneumonia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2020;319(4):661-669. DOI: 10.1152/ajplung.00316.2020
47. Söderberg D, Segelmark M. Neutrophil extracellular traps in vasculitis, friend or foe? *Current Opinion in Rheumatology*. 2018;30(1):16-23. DOI: 10.1097/BOR.0000000000000450
48. Christophorou M. The virtues and vices of protein citrullination. *Royal Society Open Science*. 2022;9(6): e220125. DOI: 10.1098/rsos.220125
49. de Vries J, Autar A, Dam D, Donkel S, Kassem M, Kolk A, *et al.* Association between plaque vulnerability and neutrophil extracellular traps (NETs) levels: The Plaque At RISK study. *PLOS ONE*. 2022;17(6):e0269805. DOI: 10.1371/journal.pone.0269805
50. Zhu L, Liu L, Zhang Y, Pu L, Liu J, Li X, *et al.* High Level of Neutrophil Extracellular Traps Correlates With Poor Prognosis of Severe Influenza A Infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2018;217(3):428-437. DOI: 10.1093/infdis/jix475
51. Mikacenic C, Moore R, Dmyterko V, West T, Altemeier W, Liles W, *et al.* Neutrophil extracellular traps (NETs) are increased in the alveolar spaces of patients with ventilator-associated pneumonia. *Critical Care*. 2018;22(1):358. DOI: 10.1186/s13054-018-2290-8
52. Ng H, Havervall S, Rosell A, Aguilera K, Parv K, Meijerfeldt F, *et al.* Circulating Markers of Neutrophil Extracellular Traps Are of Prognostic Value in Patients With COVID-19. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2021;41(2):988-994. DOI: 10.1161/ATVBAHA.120.315267
53. Huckriede J, Anderberg S, Morales A, Vries F, Hultström M, Bergqvist A, *et al.* Markers of NETosis and DAMPs are altered in critically ill COVID-19 patients. 2020. Fecha de consulta: 11 de noviembre de 2022. Disponible en: <https://www.researchsquare.com>
54. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, Gockman K, Zuo M, Madison J, *et al.* Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight*. 2020;5(11):1-13. DOI: 10.1172/jci.insight.138999
55. Dandekar A, Perlman S. Immunopathogenesis of coronavirus infections: implications for SARS. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(12):917-927. DOI: 10.1038/nri1732
56. Ebrahimi F, Giaglis S, Hahn S, Blum C, Baumgartner C, Kutz A, *et al.* Markers of neutrophil extracellular traps predict adverse outcome in community-acquired pneumonia: secondary analysis of a randomised controlled trial. *European Respiratory Journal*. 2018;51(4). DOI: 10.1183/13993003.01389-2017