

Inmunotrombosis: implicancias de las trampas extracelulares de neutrófilos en el desarrollo y progresión de la enfermedad tromboembólica venosa.

Immunothrombosis: implications of neutrophil extracellular traps in the development and progression of venous thromboembolic disease.

Aranda F, Perés Wingeyer S y de Larrañaga G.

Laboratorio de Hemostasia y Trombosis,
Hospital de Infecciosas Francisco Javier Muñiz. Buenos Aires, Argentina.

nanoaranda@hotmail.com

Fecha de recepción: 19/08/2015
Fecha de aprobación: 27/10/2015



ARTÍCULO
DE REVISIÓN

HEMATOLOGÍA
Volumen 19 n° 3: 231-245
Septiembre - Diciembre 2015

Palabras clave: inmunotrombosis,
trampas extracelulares de neutrófilos,
hemostasia,
enfermedad tromboembólica venosa.

Keywords: immunothrombosis,
neutrophil extracellular traps,
haemostasis,
venous thromboembolic disease.

Resumen

Durante mucho tiempo se consideró que las plaquetas estaban involucradas exclusivamente en el sistema hemostático y que los leucocitos sólo participaban de los mecanismos del sistema inmunológico. Sin embargo, esta visión ha cambiado, reconociéndose que existe una profunda interrelación entre ambos sistemas, y que las plaquetas y los leucocitos son efectores centrales que cumplen roles hemostáticos e inmunológicos.

Los procesos infecciosos constituyen un importante factor de riesgo trombótico. De hecho, se ha acuñado el término inmunotrombosis, definido como una respuesta inmune innata que implica la formación de un trombo en un vaso sanguíneo favoreciendo el confinamiento y la destrucción de microorganismos patógenos. En esta respuesta, están involucrados tanto factores inmunológicos como hemostáticos.

Hace casi una década se describió que los neutrófilos despliegan un mecanismo extracelular que les

permite confinar y destruir microorganismos. Este novedoso mecanismo consiste en la liberación de estructuras en forma de redes, denominadas trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), compuestas por ADN, histonas y otras proteínas antimicrobianas, en respuesta a la presencia de microorganismos patógenos. Asimismo, las NETs se forman también en respuesta a distintos estímulos inflamatorios, como ocurre en patologías como vasculitis de pequeños vasos, pre-eclampsia y diferentes tipos de tumores. Las NETs podrían ser un nexo fundamental entre inflamación y trombosis, principalmente al estar involucradas en el andamiaje que brinda estabilidad a los trombos.

Distintos componentes de las NETs tienen un gran potencial como biomarcadores trombóticos. Además, el conocimiento del rol de las NETs en la fisiopatología trombótica ofrecería nuevas posibilidades para prevenir la trombosis y mejorar el tratamiento trombolítico.

Abstract

It was long thought that platelets were exclusively involved in the haemostatic system and that leukocytes were only part of the immune response. However, this paradigm has been shifted, and it has been recognized that there is a cross-talk between these two systems, with both platelets and leukocytes as key effectors that have immunological and haemostatic roles.

The infectious processes are a major risk factor for thrombosis. In fact, the term immunothrombosis has been coined, defined as an innate immune response that involves the formation of a thrombus in a blood vessel and promotes the confinement and destruction of pathogenic microorganisms. In this response, both immunological and haemostatic factors are involved.

Almost a decade ago, it was described that neutrophils display an extracellular mechanism that allows

them to confine and destroy microorganisms. This novel mechanism involves the release of network-shaped structures, termed neutrophil extracellular traps (NETs), composed of DNA, histones and other proteins with antimicrobial activity, in response to the presence of pathogenic microorganisms. Furthermore, NETs are also formed in response to different inflammatory stimuli, as in pathologies like small vessel vasculitis, pre-eclampsia and different types of tumors. NETs could be a key link between inflammation and thrombosis, mainly being involved in the scaffolding that gives stability to the thrombus.

Different elements that are part of the NETs structure have a great potential as thrombotic biomarkers. In addition, elucidating the role of NETs in the thrombotic pathophysiology might offer new possibilities for preventing thrombosis and improving thrombolytic therapy.

Introducción

Durante muchos años hemos identificado a las plaquetas como células involucradas únicamente en funciones de la hemostasia y a los leucocitos como células exclusivas del sistema inmune. Sin embargo, hoy la visión es mucho más amplia y tanto las plaquetas como los glóbulos blancos han sido reconocidos como efectores centrales que cumplen roles tanto en el sistema hemostático como en el sistema inmunológico. Durante un proceso séptico, las plaquetas interactúan con los neutrófilos, vía toll like receptor-4 (TLR-4), activándolos y provocando el despliegue de diferentes mecanismos de defensa para controlar la infección⁽¹⁾. Estos eventos ocurren principalmente en los sinusoides hepáticos y los capilares pulmonares. Recientemente, se ha demostrado que las plaquetas poseen un rol colaborativo con las células de Kupffer hepáticas en la erradicación de infecciones sistémicas⁽²⁾. Bacterias como *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes son capturadas rápidamente por las células de Kupffer y activan plaquetas, que se adhieren de manera sostenida a dichas células, y, mediante esta

acción coordinada, logran encerrar a las bacterias y eliminarlas. Este novedoso mecanismo representa un sistema de vigilancia mediante el cual las plaquetas interactúan con leucocitos e intervienen activamente en la respuesta inmune.

En la presente revisión, abordaremos el tema de los neutrófilos y su conexión con el desarrollo y la progresión de la trombosis venosa.

Enfermedad tromboembólica venosa

La enfermedad tromboembólica venosa (ETV), que incluye tanto a la trombosis venosa profunda (TVP) como a su complicación asociada, el tromboembolismo pulmonar (TEP), es la patología cardiovascular más común después del infarto de miocardio y el accidente cerebrovascular isquémico⁽³⁾.

La ETV es una patología multifactorial y, epidemiológicamente, está asociada a distintos factores de riesgo. A su vez, cada factor de riesgo puede estar asociado a uno o más mecanismos de acción involucrados en la formación del trombo. Entre los factores de riesgo asociados a ETV más importantes se encuentran diversas patologías inflamatorias

tales como infecciones, enfermedades autoinmunes, obesidad y cáncer, inmovilizaciones prolongadas, embarazos y tratamientos con quimioterapia, entre otros⁽⁴⁻⁶⁾.

Fisiopatología de la ETV

Los trombos venosos son estructuras que consisten de sucesivas capas de fibrina, plaquetas, glóbulos rojos y leucocitos. Las plaquetas cumplirían un rol mecánico sosteniendo la formación del trombo y es por esto que la trombosis venosa depende fuertemente de su adhesión, activación y agregación⁽⁷⁾. De todas maneras, la estabilidad final del trombo requiere del establecimiento de un firme andamiaje estructural provisto por polímeros de gran tamaño, entre los cuales se encuentran la fibrina y el factor de von Willebrand (FvW)⁽⁸⁻⁹⁾.

La formación de un trombo venoso puede desencadenarse a partir de alteraciones en el flujo sanguíneo, la activación o fallas en el funcionamiento normal del endotelio vascular o por un estado de hipercoagulabilidad de la sangre⁽⁴⁾. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con la trombosis arterial, que generalmente es el resultado de la erosión o ruptura de una placa aterosclerótica, los mecanismos del desarrollo de la trombosis venosa en vasos sanguíneos intactos aún no son comprendidos completamente.

El desarrollo de los trombos venosos suele comenzar en los senos de las válvulas venosas donde, debido a complejos mecanismos propios de los fluidos que se dan particularmente en la cavidad de dichas válvulas, el patrón de flujo sanguíneo se vuelve anormal y provoca alteraciones en el funcionamiento endotelial⁽¹⁰⁾. El estancamiento del flujo sanguíneo (estasis) en la sección de los vasos sanguíneos tendría similares efectos. La estasis de la sangre provoca una baja en la tensión de oxígeno que trae aparejada la activación local del endotelio⁽¹¹⁾. Al activarse, las células endoteliales liberan FvW desde los cuerpos de Weibel-Palade, y el FvW actúa como mediador en el reclutamiento de plaquetas. A su vez, tanto el endotelio activado como las plaquetas reclutadas y activadas aumentan la expresión de glicoproteína P-selectina en sus membranas, la cual es responsable del reclutamiento inicial de neutrófilos y otras células de la inmunidad innata que también están involucradas en el desarrollo y la propagación del trombo⁽¹²⁻¹³⁾. Por último, el otro factor que tiene un rol preponderante en la patogénesis de la ETV

es la hipercoagulabilidad de la sangre. Ésta depende fundamentalmente de las concentraciones individuales y el funcionamiento tanto de las proteínas pro-coagulantes como de las anti-coagulantes, y de la concentración y la naturaleza de las micropartículas (MPs) que contienen factor tisular (FT), la molécula encargada de iniciar la vía extrínseca de coagulación y que es considerada como la principal involucrada en el desencadenamiento de la coagulación en ETV⁽¹⁴⁻¹⁵⁾. Una compleja interacción entre estos distintos factores lleva a la activación tanto de la vía intrínseca como extrínseca de la coagulación y, en consecuencia, a la formación de fibrina y al consiguiente establecimiento de un trombo intravascular^(5, 15-16).

Básicamente, la evolución del trombo procede generalmente a través de tres etapas⁽¹⁷⁾. En una primera fase, el trombo se encuentra desorganizado. Si se forma bajo condiciones de flujo continuo de sangre, se van alternando capas de plaquetas y glóbulos rojos en forma de láminas, mientras que si se forma en condiciones estáticas adopta un aspecto más uniforme. Luego de unos días, el trombo comienza a organizarse y, en esta etapa, son reclutadas las células inflamatorias que se infiltran en los bordes de dicho trombo. Luego de semanas, se puede observar la etapa del trombo organizado, en la cual este trombo posee una apariencia fibrosa ordenada y con escasa infiltración inflamatoria. Muchos factores afectan la gradualización de este proceso e, incluso, un trombo a menudo puede mostrar varias etapas de desarrollo al mismo tiempo.

ETV asociada a procesos inflamatorios. El rol de los neutrófilos.

Tal como hemos mencionado, las patologías inflamatorias son un factor de riesgo importante para el desarrollo de ETV. La formación de los trombos puede ser fuertemente intensificada por la inflamación y el daño endotelial⁽¹⁸⁾. Una respuesta inflamatoria aguda, debido a una infección o a un trauma, puede resultar en la activación sistémica de la coagulación mediante diferentes mecanismos, en los cuales las células del endotelio vascular cumplen un rol central promoviendo el reclutamiento de plaquetas, neutrófilos y otros leucocitos, y participando directamente en la iniciación, la regulación de la formación y en la posterior remoción de fibrina⁽¹⁹⁻²⁰⁾. Uno de los principales componentes celulares invo-

lucrados en los procesos inflamatorios son los neutrófilos. Los neutrófilos son los miembros más abundantes de la población de leucocitos, comprenden entre 50 y 70 % de la misma en individuos sanos, y constituyen la primera línea de defensa frente a la invasión de microorganismos patógenos, ya que son los primeros leucocitos reclutados a los sitios de infección⁽²¹⁻²²⁾.

Amulic y colaboradores han descripto su tarea de una manera muy elegante: en el torrente sanguíneo, los neutrófilos actúan como monitores de la posible presencia de señales de peligro para el hospedador, patrullando de manera continua los vasos sanguíneos, buscando atentamente indicios de una incipiente respuesta inflamatoria y, en caso de detectarla, desarrollando rápidamente un proceso bien orquestado que les permita localizar, atacar y destruir la potencial amenaza⁽²³⁾.

Este proceso en el cual los neutrófilos integran el complejo bombardeo de estímulos y los traducen en acciones concretas, se denomina activación de los neutrófilos.

Trampas extracelulares de neutrófilos

Hasta hace algunos años, se consideraba que los neutrófilos empleaban dos mecanismos para contener y eliminar los microorganismos invasores: la fagocitosis y la degranulación⁽²⁴⁾. Esta última implica la liberación de un arsenal de enzimas, péptidos antimicrobianos y otras moléculas hacia el espacio extracelular, entre las que se encuentran proteasas que degradan factores de virulencia y toxinas, lisozima que degrada la pared celular bacteriana, péptidos que aumentan la permeabilidad de las membranas de diversos microorganismos y catelicidinas y defensinas que pueden matar bacterias en forma directa⁽²⁵⁾. Sin embargo, recientemente han surgido evidencias indiscutibles en las cuales se demuestra que los neutrófilos pueden eliminar patógenos mediante otro mecanismo de manera extracelular⁽²⁶⁾. Este novedoso mecanismo consiste en la liberación por parte de los neutrófilos activados de estructuras en forma de redes, denominadas NETs (del inglés neutrophil extracellular traps), compuestas por ADN, histonas y otras proteínas con actividad antimicrobiana⁽²⁶⁻²⁸⁾.

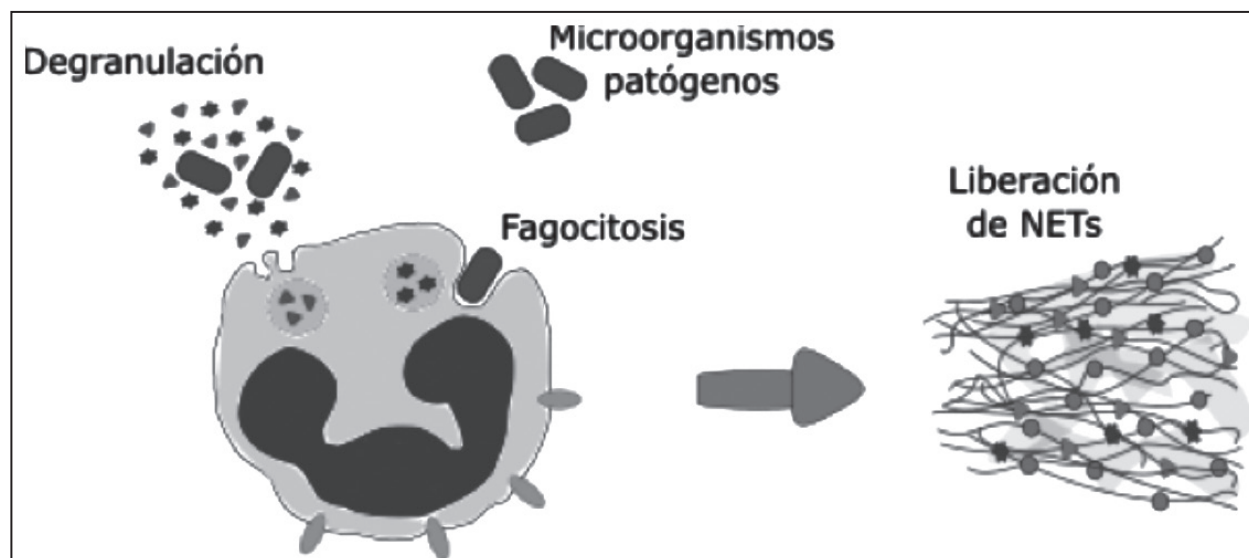


Figura 1. Mecanismos de defensa mediados por neutrófilos. Esquema representativo de los distintos mecanismos empleados por los neutrófilos para la contención y/o eliminación de los agentes patógenos. Adaptado de Shock 2014, Camicia G., Pozner R. y de Larrañaga G.

Estas NETs tienen la capacidad de pegar, desarmar y matar patógenos de manera extracelular, y se cree que lo harían al exponerlos a altas concentraciones locales de antimicrobianos^(26, 28-30). Las NETs tienen la capacidad de atrapar todo tipo de microorganismos, incluyendo bacterias Gram positivas, Gram

negativas, hongos y protozoos^(27, 29, 31-35).

Además de su función microbicida, las NETs cumplirían un rol vital al confinar a los patógenos en el sitio de infección, actuando como una barrera física que previene su diseminación⁽³⁶⁾. Estructuralmente, las NETs son fibras, semejantes a una tela de araña

(Figura 2), que están constituidas por ADN con incrustaciones de péptidos y enzimas antimicrobianas

como elastasa, catepsina G, mieloperoxidasa, histonas, proteína 3, gelatinasa, LL-37, lactoferrina, y calprotectina⁽³⁰⁾.

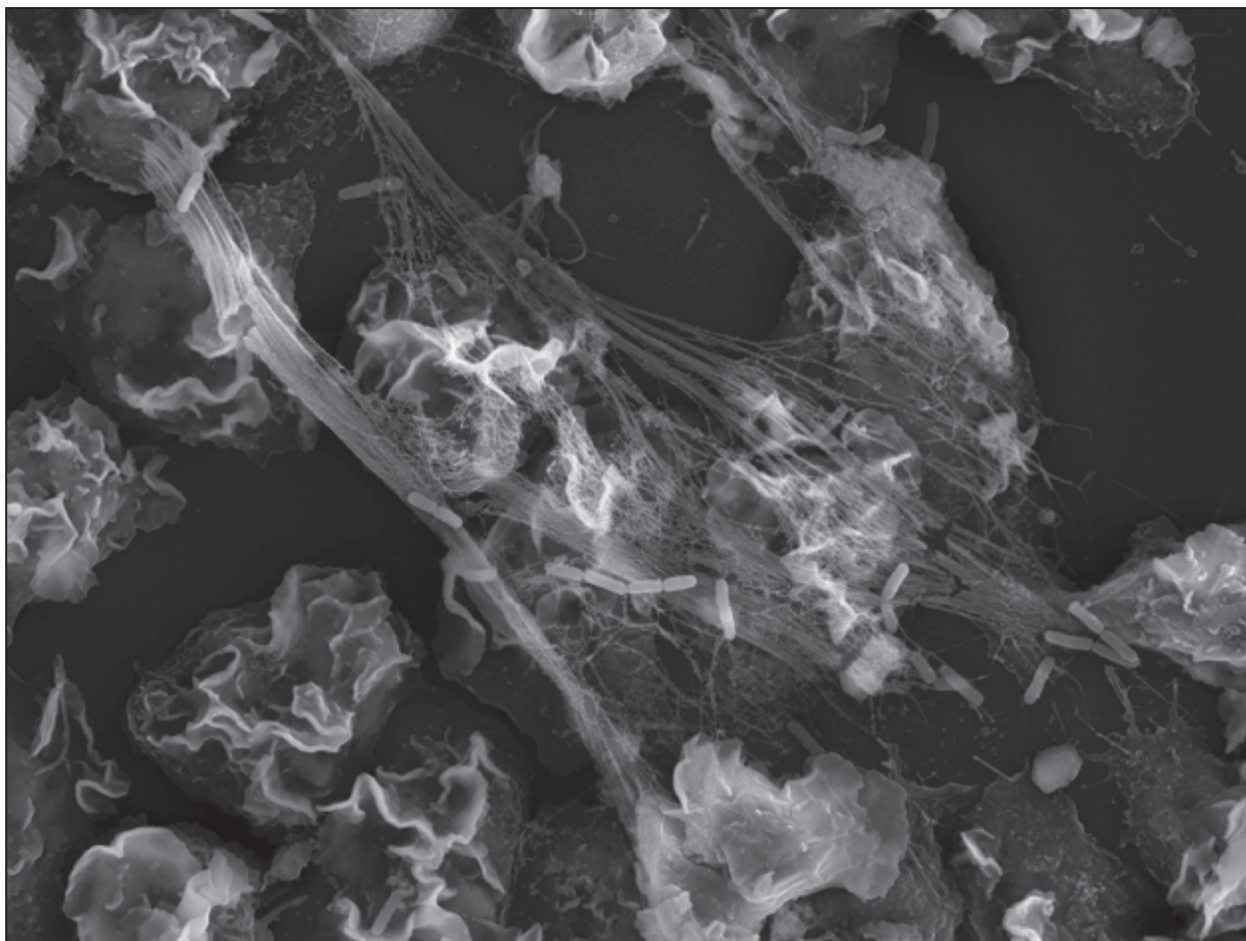


Figura 2. Neutrófilos y trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). Imagen de microscopía electrónica cedida por Volker Brinkmann y Arturo Zychlinsky. Max Planck Institute for Infection Biology, Alemania.

Hasta el momento no se ha esclarecido totalmente si cada patógeno activa selectivamente alguno de estos mecanismos de defensa, o cómo decide el neutrófilo cuál de ellos debe emplear. No obstante, teniendo en cuenta que, *in vitro*, la fagocitosis y la degranulación son procesos rápidos, mientras que la formación de NETs es un proceso más lento, se ha sugerido que la secuencia temporal de estos mecanismos sería: fagocitosis, degranulación y, finalmente, formación de NETs⁽³⁰⁾. Recientemente se presentaron evidencias que permiten afirmar que los neutrófilos liberan selectivamente NETs en respuesta a patógenos de gran tamaño, cuando los mismos son demasiado grandes para ser fagocitados⁽³⁷⁾. Esta capacidad, además, es crítica para evitar el daño tisular excesivo

durante la respuesta a la infección. Asimismo, se ha demostrado que las NETs no son liberadas exclusivamente en respuesta a microorganismos, sino que también pueden ser formadas frente a una infección viral e incluso en situaciones de inflamación estéril como, por ejemplo, en vasculitis de pequeños vasos, pre-eclampsia y diferentes tipos de tumores⁽³⁸⁻⁴³⁾.

La NETosis es el proceso por el cual los neutrófilos cambian su morfología adquiriendo una forma aplanada, emiten numerosas protrusiones de membrana y liberan fibras de ADN decoradas con proteínas hacia el medio extracelular⁽³¹⁾. Este proceso involucra la decondensación de la cromatina, el reordenamiento de la arquitectura nuclear y granular, seguido de la mezcla de la cromatina con el contenido

antimicrobiano de los gránulos en el citoplasma y, finalmente, la liberación hacia el espacio extracelular de proteínas granulares y otros péptidos anti-

microbianos anclados a la cromatina, tras la ruptura de la membrana celular^(31, 44-48) (**Figura 3**).

Si bien este mecanismo de “NETosis suicida” es el

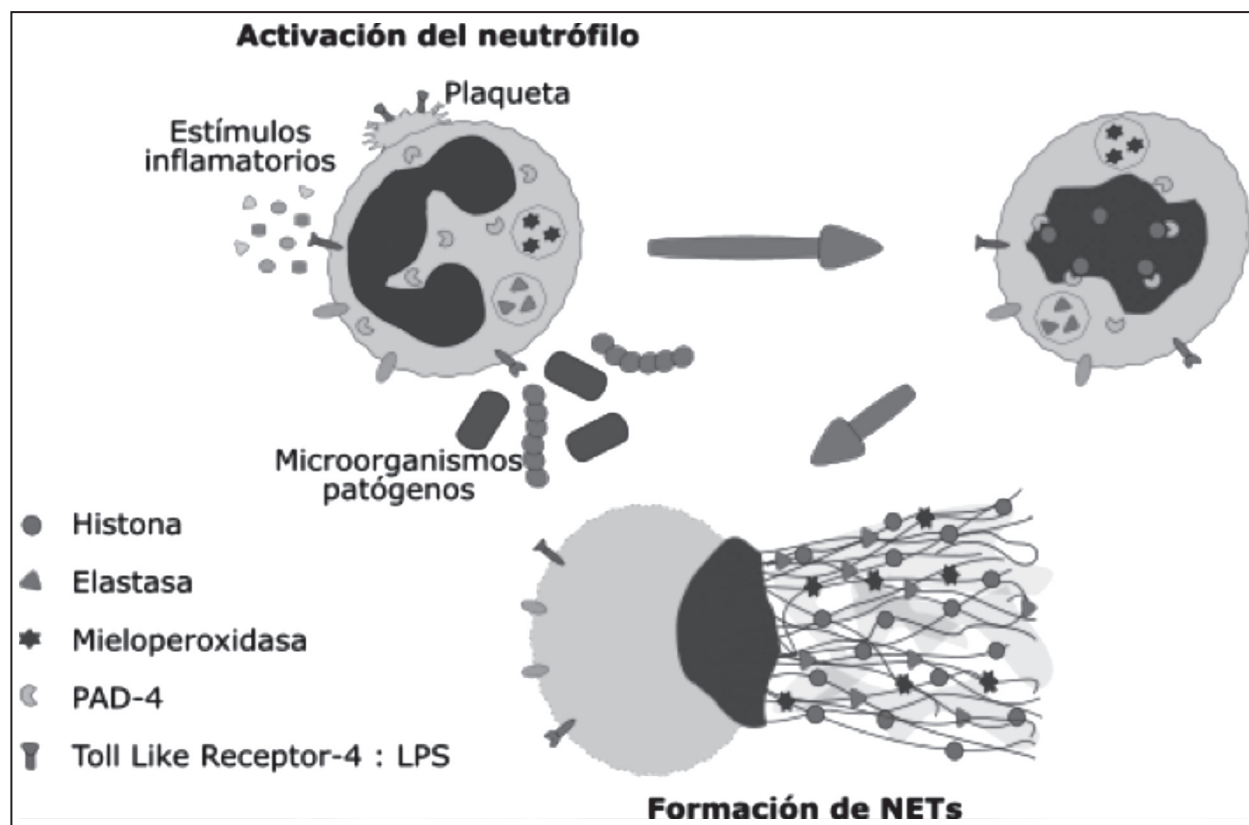


Figura 3. Formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). Esquema representativo del modelo de formación de NETs por NETosis. La activación del neutrófilo por contacto con microorganismos patógenos o diferentes estímulos inflamatorios conduce a la desintegración de la membrana nuclear y de las membranas granulares, decondensación de la cromatina, y mezcla del contenido nuclear con proteínas granulares y citoplasmáticas. Posteriormente, el neutrófilo se contrae y expulsa la NET. Este proceso es relativamente lento y demanda entre 2 a 3 horas para completarse. Adaptado de *J Mol Med* 2009, von Köckritz-Blickwede y Nizet.

más ampliamente aceptado, también se ha demostrado que las NETs pueden ser liberadas sin inducir la propia muerte celular, mediante un mecanismo que ha sido denominado “NETosis vital”, conservando las funciones vitales y el arsenal de armas convencionales de defensa del neutrófilo⁽⁴⁹⁻⁵⁰⁾. Por ejemplo, mediante microscopía electrónica se pudo demostrar que *Staphylococcus aureus* induce una rápida liberación de NETs a través de la generación de pequeñas evaginaciones esféricas surgidas a partir de la membrana nuclear que son exportadas mediante vesículas, preservando de esta forma la integridad de la membrana plasmática⁽⁵⁰⁻⁵¹⁾.

Sin embargo, pese a que el conjunto de instrucciones de los neutrófilos es simple y efectivo es, a su

vez, potencialmente perjudicial. La función primordial de los neutrófilos es exterminar a los microbios patógenos sin dañar al hospedador pero, ante la duda, la prioridad es cumplir con el primer objetivo, más allá de los daños colaterales que se puedan producir⁽²³⁾. El arsenal de armas antimicrobianas de las que disponen los neutrófilos, entre las cuales están incluidas las NETs y sus distintos componentes, puede ser tan peligroso para las células del hospedador como lo son para los microbios invasores, ya que permiten atrapar y matar microorganismos pero lo hacen bajo el riesgo de provocar daño, tanto en el endotelio, si las despliegan a nivel vascular, como en los tejidos hacia los cuales extravasan^(1, 52-55).

NETs y Trombosis

Las infecciones, tal como lo hemos descripto previamente, constituyen un importante factor de riesgo trombótico. De hecho, Engelman y Massberg acuñaron el término **inmunotrombosis**, definiéndolo como una **respuesta inmune innata** que implica la formación de un trombo a nivel de los vasos sanguíneos y favorece el confinamiento, el reconocimiento y la destrucción de los microorganismos patógenos⁽⁵⁶⁾. Considerando que la activación endotelial es uno de los principales inductores del proceso trombótico, que las NETs también se forman en la vasculatura y no sólo a nivel tisular, que muchas de las enzimas y péptidos antimicrobianos que forman parte de las NETs pueden provocar el daño y la consecuente activación del endotelio, que la estabilidad de los trombos requiere de un andamiaje provisto por grandes polímeros como la fibrina y el FvW y que se observó formación y persistencia de NETs en patologías inflamatorias no infecciosas, resultaría lógico pensar que las NETs podrían ser un nexo fundamental entre la **inflamación** y la **trombosis**. Así, bajo esta hipótesis, Fuchs y colaboradores demostraron por primera vez en el año 2010, mediante ensayos elegantes y bien organizados, que las NETs aportarían no sólo un andamiaje estructural sino también estímulos que permiten la activación, el pegado y la agregación de plaquetas, la adhesión de glóbulos rojos y de proteínas plasmáticas relevantes en la estabilidad del trombo, tales como FvW, fibronectina y fibrinógeno⁽⁵⁷⁾. Estas moléculas se pegarían a las NETs probablemente debido a su afinidad por las histonas o el ADN⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾. La activación plaquetaria mediada por las NETs podría deberse a la acción de las histonas o de proteasas que forman parte de estas estructuras. Se vio que, *in vitro*, las histonas purificadas estimulan el flujo de calcio hacia las plaquetas promoviendo su activación y su agregación⁽⁶¹⁻⁶²⁾. Además, las enzimas elastasa y catepsina G, que se encuentran enzimáticamente activas dentro de la estructura de las NETs, tienen la capacidad de potenciar la agregación plaquetaria activando receptores de las plaquetas a través de su proteólisis⁽⁶³⁻⁶⁴⁾.

Fuchs y colaboradores fueron pioneros en mostrar evidencias claras de que marcadores propios de NETs, como ADN extracelular, histona (H) 3 y complejos ADN/H2A/H2B, estaban presentes tanto en plasma como en el interior de los trombos en un

modelo de TVP en babuinos, lo cual fue confirmado posteriormente en un modelo murino^(57, 65). Además, demostraron que la H3 no sólo estaba presente en forma abundante en los trombos sino que también se encontraba **citruilizada**. La citruilización es una modificación post-traduccional (conversión de arginina en citrulina, un aminoácido no convencional) mediada por la enzima peptidilarginina deiminasa 4 (PAD4), una enzima altamente expresada en granulocitos⁽⁶⁶⁻⁶⁷⁾. Al ocurrir esta modificación, se reduce la carga positiva de las histonas permitiendo la decondensación de la cromatina, la cual es fundamental para la formación de las NETs⁽⁴⁶⁾ (**Figura 3**). De hecho, los neutrófilos de ratones knockout para el gen de PAD4 son incapaces de formar NETs, mientras que la sobreexpresión de esta enzima es estímulo suficiente para la decondensación y formación de NETs aún en células que normalmente no las producen^(48, 68). Por lo tanto, la detección de la presencia de H3 citruilizada en trombos en modelos murinos de TVP indicaría que provienen de neutrófilos que formaron NETs. Posteriormente se vio que la incapacidad de formar NETs por parte de ratones deficientes en el gen de PAD4 resultó ser protectora en el mismo modelo de TVP⁽⁶⁹⁾. Allí se observó que, pese a que las plaquetas y los leucocitos se acumulaban a lo largo del endotelio activado, se formaba una cantidad mucho menor de trombos, los cuales tenían neutrófilos presentes en su interior pero la estabilidad de estos trombos no se sostenía en el tiempo.

Tanto previa como paralelamente al establecimiento de la conexión entre las NETs y los procesos que llevan a la formación de un trombo, también fue evaluada la capacidad de afectar de manera individual los mecanismos de coagulación por parte de los ácidos nucleicos y de algunos componentes nucleares. Las moléculas polianiónicas, incluyendo al ADN, al ARN y los polifosfatos, son activadoras de la coagulación, promoviendo la activación de proteasas de la vía intrínseca, tal como los factores XII y XI⁽⁷⁰⁻⁷¹⁾. Las histonas, por su parte, también poseen efectos protrombóticos. La H4 provoca la autoactivación de la protrombina, independientemente de la cascada de coagulación, y también estimula la exposición de fosfatidilserina en la membrana plasmática de los glóbulos rojos, lo que acelera la formación de fibrina⁽⁷²⁻⁷³⁾. A su vez, las histonas incrementan la generación de trombina a través de un

mecanismo que depende de las plaquetas, contribuyendo a la activación y la agregación plaquetaria y, adicionalmente, poseen la capacidad de inhibir mecanismos anticoagulantes al impedir la activación de la proteína C mediada por trombomodulina^(62, 74-75). Incluso Xu y colaboradores demostraron, utilizando un modelo murino de sepsis, que la infusión de histonas promueve la formación de microtrombos en pulmón⁽⁶¹⁾. Por su parte, también se demostró que la enzima elastasa de neutrófilos posee propiedades pro-coagulantes, al inactivar proteolíticamente al inhibidor del factor tisular e intensificar la acción del factor X activado. Más aún, distintos trabajos mostraron que las plaquetas activadas son capaces de estimular la liberación de NETs, resultando así en una especie de círculo vicioso de formación de NETs y activación de plaquetas, evidenciando aún más la compleja interacción que existe entre los distintos actores involucrados en el proceso trombótico^(1, 12, 76).

La tendencia a desarrollar trombosis es un rasgo característico asociado a pacientes que presentan diferentes tipos de tumores y el estado de hipercoagulabilidad en el que se encuentran puede deberse a múltiples factores, que van desde las propias propiedades procoagulantes de las células tumorales hasta los efectos de cirugías, del uso de catéteres y de los agentes quimioterapéuticos⁽⁷⁷⁾. Por su parte, los neutrófilos cumplen un papel central en la biología tumoral y constituyen una gran proporción del infiltrado inflamatorio, tanto en tumores humanos como en modelos murinos de cáncer⁽⁷⁸⁻⁷⁹⁾. Sus propiedades pro o anti-tumorales son un continuo tema de debate pero, en estudios recientes, ha sido demostrado que el fenotipo de los neutrófilos difiere según las distintas etapas de progresión tumoral, volviéndose más protumoral a medida que el tumor lleva más tiempo de desarrollo⁽⁸⁰⁾. Aumentos en el recuento de neutrófilos periféricos y/o intratumorales han sido asociados a peores pronósticos y desenlace en diferentes tipos de cáncer, mucho de ellos asociados a un elevado riesgo de trombosis venosa⁽⁸¹⁻⁸²⁾.

En un modelo murino de carcinoma mamario, se observó trombosis pulmonar en una etapa tardía de progresión tumoral, coincidente con recuento de neutrófilos y niveles plasmáticos de ADN extremadamente altos y, simultáneamente al desarrollo de trombosis, se registró hipercitrulinación de H3 en plasma⁽⁸³⁾. Incluso, en otro modelo murino

de cáncer pancreático y trombosis, se observó que, en el interior de los trombos, había MPs procoagulantes derivadas de células tumorales adheridas a las NETs⁽⁸⁴⁾. Asimismo, los niveles plasmáticos de ADN se encuentran frecuentemente elevados en pacientes con cáncer, siendo estos niveles mayores en etapas avanzadas de la progresión tumoral, de la misma manera que se ha visto que hay incrementos en los niveles de ADN plasmático y nucleosomas asociados al tratamiento con quimioterapia⁽⁸⁵⁻⁸⁷⁾. Estos resultados, obtenidos en trombosis venosas asociadas a distintos tipos de tumores, indicarían que los componentes de las NETs estarían fuertemente involucrados en el desarrollo y el mantenimiento de la estructura del trombo.

En definitiva, la presencia de NETs en los trombos venosos es indudable pero, de todas maneras, el rol que cumplen dentro su estructura y la importancia que tienen en su fisiopatología aún no han sido completamente esclarecidos⁽⁸⁸⁾. Un estudio reciente evaluó la composición de tromboembolismos venosos humanos y los resultados revelaron que se produce acumulación de NETs durante la etapa de organización del trombo y que estas NETs estarían íntimamente asociadas con plaquetas unidas a FvW, respaldando la idea de que las NETs participan activamente en la maduración de los trombos y son parte de la estructura que les brinda estabilidad⁽⁸⁹⁾. **(Figura 4)**.

NETs y trombolisis.

Posible impacto a nivel diagnóstico.

Para poder restaurar el flujo sanguíneo, es indispensable que el trombo sea degradado y solubilizado. La fibrina y el FvW, los principales componentes del andamiaje estructural del trombo, son fragmentados proteolíticamente por acción de las proteasas plasmina y ADAMTS-13, respectivamente. Las NETs, siendo un tercer componente de esta estructura, también deben ser desarmadas durante la trombolisis. De hecho, se ha demostrado que el ADN se une a los productos de degradación de la fibrina manteniendo firmemente unida a toda la red de fibrina, por lo que es indispensable su remoción⁽⁹⁰⁻⁹¹⁾.

La cromatina que forma parte de las NETs se encuentra en un estado de alta decondensación, volviéndose así muy accesible para las ADNasas humanas, enzimas que degradan ADN. Mediante ensayos *in vitro* se demostró que la acción de las ADNasas

plasmáticas es fundamental para la completa degradación de los coágulos sanguíneos siendo estos resultados respaldados posteriormente por estudios

que analizaron las cinéticas de la degradación de los tres componentes estructurales de los trombos^(26, 28, 57, 92-93).

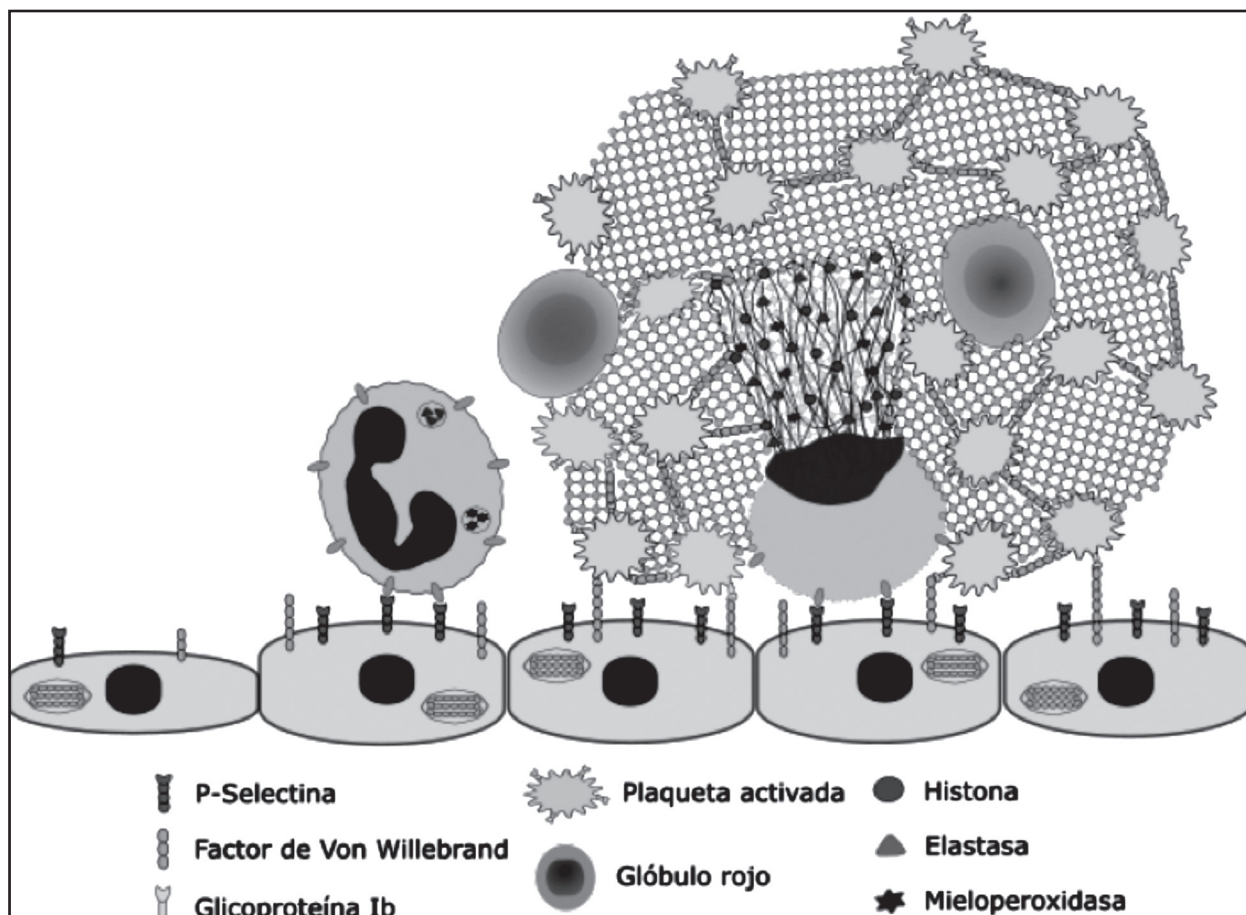


Figura 4. Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) en el proceso trombótico.

Las células endoteliales activadas poseen una expresión aumentada de ciertas proteínas, tales como p-selectina y factor de Von Willebrand (FvW). La p-selectina permite el anclaje de los neutrófilos al endotelio activado y el FvW facilita la adhesión de las plaquetas activadas mediante su interacción con la glicoproteína Ib. Los neutrófilos, en respuesta a diversos estímulos inflamatorios, liberan NETs. Las NETs proveen un andamiaje estructural al trombo en formación facilitando una mayor adhesión de plaquetas activadas, glóbulos rojos y de proteínas involucradas en la estabilidad del trombo, como el mismo FvW y la fibrina, debido a su afinidad por las histonas o el ADN. A su vez, las NETs estimulan la activación plaquetaria, promoviendo una mayor adhesión y agregación de plaquetas, probablemente mediante la acción de las histonas y de proteasas, como la elastasa, componente fundamental de estas estructuras.

En un modelo de TVP en babuinos, se vio que los niveles plasmáticos de ADN aumentaban con una cinética similar a los del dímero D, producto de degradación de la fibrina^(57, 93). En pacientes con TVP, no sólo se encontró que los niveles de ADN en plasma eran mayores respecto de controles sanos y de pacientes sintomáticos que no tenían TVP, sino que dichos niveles de ADN correlacionaban positivamente con los niveles de FvW y negativamente

con los niveles de ADAMTS-13⁽⁹²⁾. Por lo tanto, es probable que los niveles de ADN en circulación puedan reflejar la degradación de NETs dentro de un trombo. Asimismo, los niveles de nucleosomas en circulación y de ciertos marcadores de activación de neutrófilos también se encuentran aumentados en pacientes con TVP respecto de pacientes sintomáticos pero sin confirmación⁽⁹²⁻⁹⁴⁾.

En consecuencia, tanto los distintos productos de

degradación de las NETs así como los marcadores de activación de neutrófilos podrían considerarse como potenciales biomarcadores para ser utilizados en el diagnóstico de TVP, considerando que actualmente el ultrasonido es el mejor método diagnóstico pero no siempre es confiable^(88, 95).

Posible impacto terapéutico

Además de la potencial aplicación como biomarcadores, a nivel diagnóstico, que podrían tener algunos de los distintos elementos que forman parte de las NETs, conocer en profundidad el rol de las NETs en la fisiopatología trombótica y los mecanismos por los cuales se generan en la vasculatura, ofrecería nuevas posibilidades para prevenir la trombosis y mejorar el tratamiento trombolítico. El agente antitrombótico ideal es aquél que es capaz de prevenir la formación patológica de trombos teniendo el menor impacto posible sobre la hemostasia, por lo que los neutrófilos resultarían ser blancos terapéuticos ideales⁽⁸⁸⁾.

Una alternativa que está siendo fuertemente estudiada es la terapia dirigida contra la **P-selectina**. La inhibición de P-selectina resultó ser protectora en modelos animales de TVP, reduciendo significativamente el reclutamiento de neutrófilos, la generación de NETs y la actividad procoagulante de la propia P-selectina^(12, 93, 96). De hecho, en un estudio reciente se observó que la inhibición de P-selectina mostró mejores efectos terapéuticos y profilácticos que la enoxaparina y que un inhibidor de FvW, en un modelo de TVP en babuinos⁽⁹⁷⁾.

El uso de tratamientos específicos dirigidos hacia componentes estructurales de las NETs, como **ADNasas, anticuerpos anti-histonas o heparina no anticoagulante**, son estrategias atractivas para la prevención de la trombosis y del posible daño orgánico si las NETs se convierten en un problema debido sus efectos deletéreos colaterales^(61, 88, 98). En algunos estudios con modelos animales de TVP, la administración de ADNasa I mostró efectos protectores; sin embargo, en un estudio reciente, se observó que el tratamiento con ADNasa provoca una mayor generación de trombina que, probablemente, se deba a la liberación masiva de algunos componentes de las NETs que pueden resultar perjudiciales para el hospedador provocando daño endotelial^(12, 65, 99). A su vez, teniendo en cuenta el rol de las redes en la contención de las infecciones, una terapia con AD-

Nasa para disminuir las NETs podría generar como efecto colateral una erradicación ineficiente de los microorganismos patógenos⁽¹⁰⁰⁾.

La heparina, además de ser un agente anticoagulante, desmantela las redes de ADN de NETs y evita las interacciones entre histonas y plaquetas, por lo tanto es probable que su uso resulte en una disminución de la trombosis mediada por las NETs⁽⁹⁸⁾. La actividad de ADNasa I es exacerbada, in vitro, en presencia de serino-proteasas, y esto puede ser imitado por la heparina, ya que desplaza a las histonas de la cromatina permitiendo una mejor accesibilidad para la enzima ADNasa I⁽⁸⁸⁾. Es por ello que la combinación de ADNasa I con heparina podría reducir aún más el riesgo de eventos trombóticos y prevenir significativamente el daño causado por las histonas. Sin embargo, el uso de heparina podría, al mismo tiempo, aumentar el riesgo de hemorragia. Debido a esto, un trabajo muy reciente se focalizó en obtener una heparina que presente los efectos beneficiosos sobre el control de las NETs pero reduciendo el riesgo de sangrado. De esta manera, Wildhagen y colaboradores, mediante un elegante abordaje experimental, lograron purificar una fracción de la heparina sin función anticoagulante que, in vitro, puede prevenir la citotoxicidad mediada por histonas y reducir la mortalidad de la inflamación estéril y sepsis en modelos de ratón, sin aumentar el riesgo de sangrado⁽⁹⁸⁾. Sin embargo, como hemos mencionado, estas estrategias basadas en desmantelar NETs ya formadas podrían tener efectos colaterales no deseados. Por este motivo, una estrategia que aún no ha sido explorada en profundidad pero que se viene proponiendo extensamente como alternativa es limitar la formación de NETs utilizando inhibidores de PAD-4^(88, 90).

Perspectivas a futuro.

Aún quedan muchos interrogantes por responder y se deben realizar muchas investigaciones para poder hacerlo. Seguramente, a lo largo de los próximos años, veremos crecer los conocimientos acerca de los mecanismos de la formación de NETs y su implicancia en la fisiopatología de la trombosis. De lo que seguro ya no quedan dudas es que los glóbulos blancos han dejado de pertenecer solamente al campo de la inmunología para ser un elemento fundamental de la definición de INMUNOTROMBOSIS.

Declaración de conflicto de interés:

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Bibliografía

1. Clark SR, Ma AC, Tavener SA y col. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007; 13:463-469.
2. Wong CH, Jenne CN, Petri B, Chrobok NL, Kubes P. Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nat Immunol* 2013; 14:785-792.
3. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS y col. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2015; 131:e29-322.
4. Kyrle PA, Eichinger S. Deep vein thrombosis. *Lancet* 2005; 365:1163-1174.
5. Reitsma PH, Versteeg HH, Middeldorp S. Mechanistic view of risk factors for venous thromboembolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32:563-568.
6. Previtali E, Bucciarelli P, Passamonti SM, Martinelli I. Risk factors for venous and arterial thrombosis. *Blood Transfus* 2011; 9:120-138.
7. Denis CV, Wagner DD. Platelet adhesion receptors and their ligands in mouse models of thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:728-739.
8. Lord ST. Fibrinogen and fibrin: scaffold proteins in hemostasis. *Curr Opin Hematol* 2007; 14:236-241.
9. Ruggeri ZM. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb Res* 2007; 120 Suppl 1:S5-9.
10. Karino T, Motomiya M. Flow through a venous valve and its implication for thrombus formation. *Thromb Res* 1984; 36:245-257.
11. Bovill EG, van der Vliet A. Venous valvular stasis-associated hypoxia and thrombosis: what is the link? *Annu Rev Physiol* 2011; 73:527-545.
12. von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A y col. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* 2012; 209:819-835.
13. Brill A, Fuchs TA, Chauhan AK y col. Von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood* 2011; 117:1400-1407.
14. Manly DA, Boles J, Mackman N. Role of tissue factor in venous thrombosis. *Annu Rev Physiol* 2011; 73:515-525.
15. Mackman N. New insights into the mechanisms of venous thrombosis. *J Clin Invest* 2012; 122: 2331-2336.
16. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev* 2013; 93:327-358.
17. Seidman M, Mitchel R. Surgical pathology of small and medium sized vessels. *Surg Pathol Clin* 2012; 5:435-451.
18. Wagner DD, Frenette PS. The vessel wall and its interactions. *Blood* 2008; 111:5271-5281.
19. Smeeth L, Cook C, Thomas S, Hall AJ, Hubbard R, Vallance P. Risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism after acute infection in a community setting. *Lancet* 2006; 367:1075-1079.
20. Levi M, van der Poll T, Schultz M. New insights into pathways that determine the link between infection and thrombosis. *Neth J Med* 2012; 70:114-120.
21. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010; 33:657-670.
22. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:519-531.
23. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Review Immunol* 2012; 30:459-489.
24. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Review Immunol* 2005; 23:197-223.

25. Bardoel BW, Kenny EF, Sollberger G, Zychlinsky A. The balancing act of neutrophils. *Cell Host Microbe* 2014; 15:526-536.
26. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C y col. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004; 303:1532-1535.
27. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5:577-582.
28. Urban CF, Ermert D, Schmid M y col. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 2009; 5:e1000639.
29. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* 2006; 8:668-676.
30. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol* 2009; 30:513-521.
31. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C y col. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal Cell Biol* 2007; 176:231-241.
32. Guimaraes-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS y col. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:6748-6753.
33. Ramos-Kichik V, Mondragon-Flores R, Mondragon-Castelan M y col. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 2009; 89:29-37.
34. Baker VS, Imade GE, Molta NB y col. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age. *Malaria journal* 2008; 7:41.
35. Saitoh T, Komano J, Saitoh Y y col. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe* 2012; 12:109-116.
36. Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev* 2007; 219:88-102.
37. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE y col. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol* 2014; 15:1017-1025.
38. Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Gebhardt S, Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum Immunol* 2005; 66:1146-1154.
39. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U y col. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 2009; 15:623-625.
40. Demers M, Wagner DD. Neutrophil extracellular traps: A new link to cancer-associated thrombosis and potential implications for tumor progression. *Oncoimmunology* 2013; 2:e22946.
41. McInturff AM, Cody MJ, Elliott EA y col. Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Blood* 2012; 120:3118-3125.
42. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B y col. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest* 2013; 123:3446-3458.
43. Camicia G, Pozner R, de Larranaga G. Neutrophil extracellular traps in sepsis. *Shock* 2014; 42:286-294.
44. Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V y col. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* 2009; 114:2619-2622.
45. Keshari RS, Verma A, Barthwal MK, Dixhit M. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *J Cell Biochem* 2013; 114:532-540.

46. Wang Y, Li M, Stadler S y col. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol* 2009; 184:205-213.
47. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2010; 191:677-691.
48. Li P, Li M, Lindberg MR y col. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* 2010; 207:1853-1862.
49. Remijnsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E y col. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ* 2011; 18:581-588.
50. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood* 2013; 122:2784-2794.
51. Pilszczek FH, Salina D, Poon KK y col. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 2010; 185:7413-7425.
52. Medina E. Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host. *J Innate Immun* 2009; 1:176-180.
53. Segel GB, Halterman MW, Lichtman MA. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *J Leukoc Biol* 201; 89:359-372.
54. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA y col. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One* 2012; 7:e32366.
55. Gould TJ, Lysov Z, Liaw PC. Extracellular DNA and histones: double-edged swords in immunothrombosis. *J Thromb Haemost* 2015; 13 Suppl 1:S82-91.
56. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:34-45.
57. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D y col. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107:15880-15885.
58. Pande H, Calaycay J, Hawke D, Ben-Avram CM, Shively JE. Primary structure of a glycosylated DNA-binding domain in human plasma fibronectin. *J Biol Chem* 1985; 260:2301-2306.
59. Gonias SL, Pasqua JJ, Greenberg C, Pizzo SV. Precipitation of fibrinogen, fibrinogen degradation products and fibrin monomer by histone H3. *Thromb Res* 1985; 39:97-116.
60. Ward CM, Tetaz TJ, Andrews RK, Berndt MC. Binding of the von Willebrand factor A1 domain to histone. *Thromb Research* 1997; 86:469-477.
61. Xu J, Zhang X, Pelayo R y col. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* 2009; 15:1318-321.
62. Semeraro F, Ammollo CT, Morrissey JH y col. Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood* 2011; 118:1952-1961.
63. Renesto P, Chignard M. Enhancement of cathepsin G-induced platelet activation by leukocyte elastase: consequence for the neutrophil-mediated platelet activation. *Blood* 1993; 82:139-144.
64. Si-Tahar M, Pidard D, Balloy V y col. Human neutrophil elastase proteolytically activates the platelet integrin α IIb β 3 through cleavage of the carboxyl terminus of the α IIb subunit heavy chain. Involvement in the potentiation of platelet aggregation. *J Biol Chem* 1997; 272:11636-11647.
65. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS y col. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* 2012; 10:136-144.
66. Nakashima K, Hagiwara T, Yamada M. Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. *J Biol Chem* 2002; 277:49562-49568.

67. Wang Y, Wysocka J, Sayegh J y col. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylation. *Science* 2004; 306:279-283.
68. Leshner M, Wang S, Lewis C y col. PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Front Immunol* 2012; 3:307.
69. Martinod K, Demers M, Fuchs TA y col. Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110:8674-8679.
70. Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F y col. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:6388-6393.
71. Altincicek B, Stotzel S, Wygrecka M, Preissner KT, Vilcinskis A. Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects. *J Immunol* 2008; 181:2705-2712.
72. Barranco-Medina S, Pozzi N, Vogt AD, Di Cera E. Histone H4 promotes prothrombin autoactivation. *J Biol Chem* 2013; 288:35749-35757.
73. Semeraro F, Ammollo CT, Esmo NL, Esmo CT. Histones induce phosphatidylserine exposure and a procoagulant phenotype in human red blood cells. *J Thromb Haemost* 2014; 12:1697-1702.
74. Carestia A, Rivadeneyra L, Romaniuk MA, Fondevila C, Negrotto S, Schattner M. Functional responses and molecular mechanisms involved in histone-mediated platelet activation. *Thromb Haemost* 2013; 110:1035-1045.
75. Ammollo CT, Semeraro F, Xu J, Esmo NL, Esmo CT. Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation. *J Thromb Haemost* 2011; 9:1795-1803.
76. Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML y col. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* 2010; 16:887-896.
77. Varki A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood* 2007; 110:1723-1729.
78. Brandau S, Dumitru CA, Lang S. Protumor and antitumor functions of neutrophil granulocytes. *Semin Immunopathol* 2013; 35:163-176.
79. Gregory AD, Houghton AM. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res* 2011; 71:2411-2416.
80. Mishalian I, Bayuh R, Levy L, Zolotarov L, Michaeli J, Fridlender ZG. Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression. *Cancer Immunol Immunother* 2013; 62:1745-1756.
81. Donskov F. Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials. *Semin Cancer Biol* 2013; 23:200-207.
82. Paneesha S, McManus A, Arya R y col. Frequency, demographics and risk (according to tumour type or site) of cancer-associated thrombosis among patients seen at outpatient DVT clinics. *Thromb Haemost* 2010; 103:338-343.
83. Demers M, Krause DS, Schatzberg D y col. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:13076-13081.
84. Thomas GM, Brill A, Mezouar S y col. Tissue factor expressed by circulating cancer cell-derived microparticles drastically increases the incidence of deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* 2015; 13:1310-1319.
85. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011; 11:426-437.
86. Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmuller H y col. Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases. *Int J Cancer* 2001; 95:114-120.

87. Kwee S, Song MA, Cheng I, Loo L, Tiirikainen M. Measurement of circulating cell-free DNA in relation to 18F-fluorocholine PET/CT imaging in chemotherapy-treated advanced prostate cancer. *Clin Transl Sci* 2012; 5:65-70.
88. Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood* 2014; 123:2768-2776.
89. Savchenko AS, Martinod K, Seidman MA y col. Neutrophil extracellular traps form predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development. *J Thrombosis Haemost* 2014; 12:860-870.
90. Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32:1777-1783.
91. Longstaff C, Varju I, Sotonyi P y col. Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA and histones. *J Biol Chem* 2013; 288:6946-6956.
92. Diaz JA, Fuchs TA, Jackson TO y col. Plasma DNA is Elevated in Patients with Deep Vein Thrombosis. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord* 2013; 1: 341-348.e1
93. Meier TR, Myers DD, Jr., Wroblewski SK y col. Prophylactic P-selectin inhibition with PSI-421 promotes resolution of venous thrombosis without anticoagulation. *Thromb Haemost* 2008; 99:343-351.
94. van Montfoort ML, Stephan F, Lauw MN y col. Circulating nucleosomes and neutrophil activation as risk factors for deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33:147-51.
95. Coleman DM, Wakefield TW. Biomarkers for the diagnosis of deep vein thrombosis. *Expert Opin Med Diagn* 2012; 6:253-257.
96. Myers DD, Jr., Rectenwald JE, Bedard PW y col. Decreased venous thrombosis with an oral inhibitor of P selectin. *J Vasc Surg* 2005; 42:329-336.
97. Diaz JA, Wroblewski SK, Alvarado CM y col. P-selectin inhibition therapeutically promotes thrombus resolution and prevents vein wall fibrosis better than enoxaparin and an inhibitor to von Willebrand factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35:829-837.
98. Wildhagen KC, Garcia de Frutos P, Reutlingsperger CP y col. Nonanticoagulant heparin prevents histone-mediated cytotoxicity in vitro and improves survival in sepsis. *Blood* 2014; 123:1098-1101.
99. Gould TJ, Vu TT, Swystun LL y col. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34:1977-1984.
100. Meng W, Paunel-Gorgulu A, Flohe S y col. Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice. *Crit Care* 2012; 16:R137.