

Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) y COVID-19: revisión de la literatura científica

Neutrophil extracellular traps (NETs) and COVID-19: a literature review

Fernando Enrique Rueda Barragán¹, Fernando Esteban Jara González², Jorge Luis Vélez-Páez³

¹Hospital de Solca Núcleo Quito, Unidad de Cuidados Intensivos, Quito-Ecuador.

²Hospital Pablo Arturo Suárez, Unidad de Terapia Intensiva, Centro de Investigación Clínica, Quito-Ecuador.

³Hospital Pablo Arturo Suárez, Unidad de Terapia Intensiva, Centro de Investigación Clínica, Quito-Ecuador.

Fuente de financiamiento: Los autores declaramos no tener Fuente alguna de financiamiento.

Recibido: 4 de agosto de 2023 (segunda versión: 13 de marzo de 2024) / Aceptado: 8 de julio de 2024

Resumen

Desde su estallido, la pandemia de COVID-19 cobró millones de vidas humanas y tuvo un impacto negativo sin precedentes en los sistemas de salud de todo el mundo. Aunque la administración de vacunas frenó la propagación de la enfermedad, hasta la fecha no existe un tratamiento específico para los pacientes. Esto se debe, en parte, a nuestro escaso conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad. La infección por SARS-CoV-2 causa daños multisistémicos con un fenómeno conocido como inmunotrombosis, que se ha relacionado con un “viejo enemigo”, las trampas extracelulares de neutrófilos (en inglés: NETs), que podrían ser la fuente del daño endotelial y parte del estado protrombótico evidenciado. Varios estudios documentaron la relación entre la formación de NET y la gravedad de la enfermedad por SARS-CoV-2 e incluso la mortalidad causada por ella. Partiendo de esta premisa, se ha sugerido que las NETs puede ser una diana terapéutica; sin embargo, ha habido muy pocos estudios sobre el tema, lo que nos impide extraer conclusiones sólidas. Creemos que la comprensión del complejo mecanismo entre las NETs y el SARS-CoV-2 puede conducir a una teoría más sólida, que a su vez facilite el desarrollo de fármacos capaces de frenar la elevada mortalidad causada por esta enfermedad.

Palabras clave: COVID-19; SARS-CoV-2; neutrófilos; NETs; trombosis; endotelio.

Abstract

Since its outbreak, the COVID-19 pandemic has cost millions of human lives and had an unprecedented negative impact on health systems worldwide. Although the administration of vaccines slowed the disease spread, there is still no treatment for critically ill patients. Part of this is due to our poor understanding of the pathophysiology of the disease. As is well known, SARS-CoV-2 infection causes multisystemic damage with a phenomenon known as immunothrombosis, which has been linked to an “old enemy,” the neutrophil extracellular traps (NETs), which could be the source of endothelial damage and part of the prothrombotic state of the disease. Several studies documented the relationship between NET formation and the severity of the disease including the associated mortality. Based on this premise, it has been suggested that NET can be a therapeutic target; however, there have been very few studies on the topic, rendering us unable to draw firm conclusions. We believe that understanding the complex mechanism between NETs and SARS-CoV-2 infection may lead to a more robust theory, which, in turn facilitates the development of drugs able to curb the high mortality rate caused by this disease.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; neutrophils; NETs; thrombosis; endothelium.

Correspondencia a:

Fernando Enrique Rueda Barragán
ferb500@yahoo.es

Introducción y antecedentes

En diciembre de 2019, se notificó el primer caso de una neumonía “inusual” en Wuhan, China¹. Finalmente, se atribuyó a un nuevo miembro de la familia de los betacoronavirus, el SARS-CoV-2², y posteriormente se extendió por todo el mundo hasta el punto de que la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo declaró pandemia, llegando a tasas de incidencia y mortalidad muy elevadas. Según la información recopilada por el Jhons Hopkins³ hasta el 2023 se identificaron 676.609.955 casos con un total de 6.881.955 muertes a nivel mundial. En la región de Latinoamérica se ha descrito una incidencia de 20,43%, con tasas de mortalidad de 32% en relación a toda la población mundial⁴. En Chile⁵, para agosto del 2020 se reportaron 376.056 casos y 10.077 muertes; a nivel de Ecuador no fue diferente, reportándose que esta patología alcanzó un total de 1.057.121 casos con 36.014 personas fallecidas³.

La infección responsable del COVID-19 se asoció a un tipo de síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA)^{1,2}, por lo que se denominó SARS-CoV-2. Hoy en día, es bien sabido que este agente puede causar daños multisistémicos⁶. La fisiopatología se ha debatido ampliamente, pero aún no se ha desarrollado un mecanismo que lo englobe todo. Cuando empezó la pandemia, no se sabía lo suficiente sobre esta enfermedad ni sobre cómo mitigar la respuesta inflamatoria. Hoy se sabe que el daño podría estar asociado al endotelio siendo así que, Pons y cols.⁷, describieron que las células endoteliales desempeñan un papel clave en la patogénesis. Estas células participan en la regulación de la respuesta inflamatoria sistémica y también en las reacciones inmunitarias interactuando con el sistema del complemento, las quimioquinas y los liberadores de citoquinas, que son los principales causantes del síndrome de liberación de citoquinas, causa principal del aumento de la inflamación. El mencionado daño endotelial puede ser iniciado por las trampas extracelulares de neutrófilos (en inglés: NETs)⁸, que se han relacionado con la propagación de la inflamación y la formación de trombos microvasculares, permitiendo un fenómeno de inmunotrombosis en la COVID-19.

Es objetivo de esta revisión comprender uno de los posibles mecanismos que explican la gravedad y la expresión clínica de esta enfermedad para proponer nuevas estrategias de tratamiento. Con esta revisión, esperamos comprender mejor la enfermedad y abrir un nuevo campo de investigación que permita obtener un tratamiento más eficaz para poder contrarrestarla.

Definiciones

Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)

Es bien sabido que los neutrófilos son los responsables

de la inmunidad innata⁹. También se sabe que los granulocitos proceden de las células madre de la médula ósea y que, al madurar alcanzan sus formas finales: neutrófilo, eosinófilo y basófilo. Los neutrófilos, para cumplir su función protectora, interactúan con las bacterias que han engullido, las inactivan y eliminan mediante enzimas proteolíticas, agentes antimicrobianos y especies reactivas del oxígeno¹⁰. Sin embargo, este mecanismo no parece ser el único; esto se demostró en el año 2004 donde el grupo del Dr. Brinkmann¹¹ en Alemania describió un mecanismo que se suma a la acción “asesina” de los neutrófilos, demostrando su degranulación, un mecanismo compartido con los macrófagos, la cual resulta efectiva en presencia de presencia de *Staphylococcus aureus* o *Mannheimia haemolytica*¹². Brinkam¹³, en una segunda descripción, hace referencia que este mecanismo consiste en la elaboración de fibras extracelulares conocidas como NETs, cuya estructura se compone de material nuclear y gránulos que rompen y matan bacterias (Figura 1). Estas redes o trampas se componen de:

- Gránulos azurófilos o primarios: elastasa neutrófila, catepsina y mieloperoxidasa;
- Gránulos secundarios: lactoferrina;
- Gránulos terciarios: gelatinasas.

Antes se creía que las NETs se producían en respuesta a la estimulación por IL-8, acetato de forbol miristato (PMA) y lipopolisacárido (LPS), pero ahora se sabe que cualquier microorganismo puede desencadenar su liberación^{11,14}. Una vez iniciada la infección por un microorganismo, se inicia también toda la vía de formación de NETs. Los experimentos^{14,15} realizados tras la inducción de una infección por microorganismos gram-positivos demostraron que la liberación concluiría en las

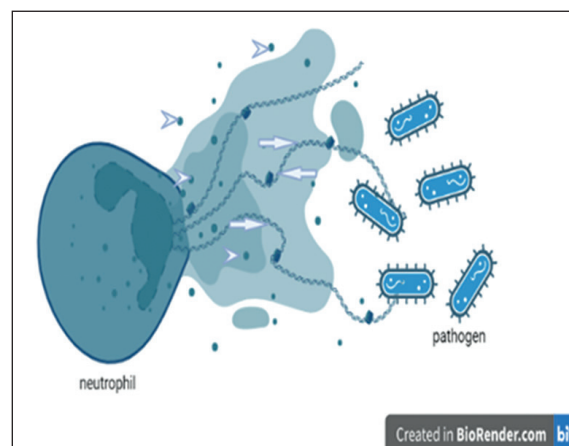


Figura 1. Estructura de las NETs: las puntas de flecha indican los gránulos; las flechas muestran las redes liberadas por los neutrófilos en respuesta a estímulos patógenos [elaborado por los autores].

tres primeras horas, pero esto sigue siendo discutible, ya que los experimentos *in vitro* demostraron que tras una infección cutánea por *S. aureus*, las NETs se liberan en cuestión de minutos.

Secuencia de conformación de las NETs¹⁵

Una vez que los neutrófilos se activan, ya sea por la influencia de IL-8, LPS, hongos, bacterias o plaquetas activadas, inician un mecanismo con un final “suicida” programado. Sólo un tercio de los neutrófilos activados tienen la capacidad de generar NETs y para su activación se han visto involucrados muchos tipos de receptores: receptores tipo Toll (TLR), receptores de fracciones cristalizadas (CF) y receptores de citoquinas. En relación con este último receptor, es fundamental señalar que en los últimos años se ha descrito un nuevo tipo de molécula en relación con los receptores de citoquinas, la vía JAK/STAT¹⁶⁻¹⁹. La interacción de esta vía con las NETs ha sido poco estudiada, pero se ha encontrado que el tofacitinib, un fármaco inhibidor de JAK1/JAK3²⁰, regula la formación de NETs²¹. Además, se ha demostrado en ratones de laboratorio que el JAK2 V617F tiene tendencia a formar más NET y trombosis, lo que sugiere que la inhibición de JAK 2 podría reducir la formación de NETs²². Lo anterior, permite suponer una interacción interesante que podría estudiarse más a fondo para aprender a prevenir la formación de estas trampas.

Continuando la secuencia de la formación de NETs¹⁵, la activación de la proteína quinasa C (PKC) induce la formación del complejo NADPH oxidasa, que finalmente libera especies reactivas de oxígeno (ROS), cuya actividad antimicrobiana ha sido establecida²³. La formación de NETs se debe a la reorganización nuclear y granular de los neutrófilos, que aumenta su movilidad y actividad fagocítica e inicia la explosión respiratoria que libera ROS. Esto ocurre en la primera hora tras el inicio de la reacción, tras la cual el núcleo empieza a cambiar, pierde lobulillos y se libera cromatina, formándose una estructura globular llena de cromatina. Transcurridos 120 minutos desde el inicio de la reacción, el núcleo se desintegra en una vesícula de cadena única y, al mismo tiempo, los gránulos comienzan a disolverse. Después de 180 minutos los componentes se mezclan y se liberan de la célula provocando la liberación de redes conocidas como NETs. Dependiendo de cuál sea el estímulo para su formación y el fin que tengan estas NETs se clasificaran y modificaran sus funciones.

Tipos de NETs

- **NETosis vital:** Se puede deducir que la NETosis es un “suicidio” programado de los neutrófilos, pero hay que entender que cuando los neutrófilos mueren, muchas de sus acciones se pierden, incluyendo el reclutamiento de leucocitos, la quimiotaxis y la fagocitosis, por lo que

este proceso no tiene un resultado positivo, excepto en la infección por *S. aureus*¹² donde se sabe que los neutrófilos conservan su efecto de fagocitosis. En 2013, Yipp y cols.²⁴, observaron un nuevo mecanismo de NETosis en el que parece no haber muerte de neutrófilos, conservando sus propiedades inmunológicas; este mecanismo se conoce como NETosis vital. Aunque aún no se ha dilucidado el mecanismo específico de esta vía, se ha encontrado de que 20 a 25% de los neutrófilos son capaces de activar este tipo de netosis. La formación de esta vía se ha asociado a la infección por bacterias grampositivas y *Candida spp*^{14,25,26}.

- **NETosis suicida:** Como se mencionó anteriormente, el mecanismo de la NETosis se describió en 2004, pero desde 1996²⁷, existen evidencias de que los neutrófilos tienen una capacidad suicida aparte de la apoptosis o la necrosis. Este mecanismo se observó cuando se administró acetato de 12 miristato y 13 forbol, identificándose la liberación de cromatina, destrucción nuclear y ruptura de la membrana celular. Este proceso se definió como un mecanismo dependiente de la NADPH-oxidasa²⁸, que requiere la descondensación de la cromatina con la consiguiente desintegración del núcleo, la liberación de NETs a través de la membrana y la muerte celular; este proceso suele durar tres horas. Una vez producido el NADPH, se produce una entrada significativa de calcio en la célula y comienza el proceso de lisis mediado por la peptidil arginina desaminasa 4 (PAD-4), la mieloperoxidasa y la elastasa.
- **NETosis desencadenada por plaquetas:** Brinkman y cols.¹¹, describieron en el año 2004 un modelo mediante observación micrográfica electrónica que demostraba la adhesión y agregación de plaquetas a estas redes en función del tiempo. A medida que se forman las redes, se agrega contenido plaquetario; lo que, junto con la liberación de histonas por las NETs, promueve la formación y el crecimiento de microtrombos rígido e impermeable. Esto fue confirmado en 2007 por Clark y cols.²⁹, quienes demostraron en ratones con sepsis que la interacción del LPS con el TLR4 permite la interacción plaqueta-neutrófilo, activando a este último y conduciendo a la formación de NETs. Esta vía de activación se ha observado tanto en infecciones bacterianas gramnegativas como grampositivas³⁰, así como en infecciones víricas³¹. Este mecanismo resalta el hecho de que las plaquetas no solo se encargan de la coagulación, sino que juegan un rol importante en la inmunidad, ya que se ha demostrado que la P-selectina que se halla en la superficie de las plaquetas estimula la formación de NETs³².
- **NETosis vital con liberación de ADN mitocondrial:** Descrita por Yousefi y cols.³³, en 2009, en el que se explicaba que la formación de NETs a través de esta vía no resulta en la muerte del neutrófilo. Se demostró que

el ADN mitocondrial, y no el nuclear, está presente en los NETs producidos a través de este mecanismo, en respuesta a la estimulación de GM-CSF, complemento C5a y TLR4. En este experimento, se demostró que la membrana celular de los neutrófilos permanece intacta tras la formación de NETs a través de este mecanismo. También se demostró que los neutrófilos no entran en la fase de apoptosis, que no había redistribución de fosfatidilserina (PS) y que no sufrían cambios morfológicos, lo que lleva a la conclusión de que la formación de NETs por liberación mitocondrial no induce una muerte acelerada de los neutrófilos, por lo que sus funciones inmunológicas no se ven afectadas³⁴.

Hasta el momento hemos explicado sobre secuencia en la conformación de las NETs y su efecto sobre la inmunología del cuerpo; sin embargo, teniendo en mente que la COVID-19 tiene un sustrato fisiopatológico inmunológico muy importante es de vital importancia entender como el COVID-19 se relaciona con la formación de NETs y cuáles son sus efectos sobre el organismo.

SARS-CoV-2 y la relación con NETs

Como bien se sabe, el SARS-CoV-2 es un virus perteneciente a la familia *Coronaviridae* de tipo beta³⁵, siendo de tipo ARN; dentro de su estructura, posee cuatro proteínas estructurales: espiga (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N); de éstas, se destaca la proteína S que interactúa con los receptores de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). Tras esta interacción, dos proteasas de las células hospedadoras, la furina y la proteasa transmembrana serina proteasa 2 (TMPRSS2), escinden la proteína S, y el virus se fusiona con las células hospedadoras, permitiendo la entrada del ARN viral en la célula³⁶, generalmente desde el tracto respiratorio y se inicia una secuencia de respuestas inflamatorias que, en casos avanzados, puede progresar a insuficiencia respiratoria conocida como síndrome de distrés respiratorio agudo asociado a COVID (CARDS)³⁷. En la actualidad, se sabe que esta respuesta no se limita únicamente al aparato respiratorio, e incluso hay estudios que han identificado una importante lesión endotelial^{7,38}. Todo ello es consecuencia de la importante respuesta inflamatoria generada. Está bien documentado que los pacientes con CARDS tienen concentraciones sanguíneas elevadas de interleuquinas, concretamente de interleuquina 2 y 6 (IL-2 e IL-6)⁷. El endotelio expresa receptores para estos dos tipos de interleuquinas, que inducen la fuga capilar. Además, durante esta infección se forman microtrombos debido a la activación del sistema del complemento y de los complejos de ataque de membrana, que promueven el daño endotelial y aumentan la producción del factor de von Willebrand y del

factor VIII, que participan en la formación de coágulos. El daño endotelial generado aumenta la producción del inhibidor-1 de la activación del plasminógeno (PAI-1), que inhibe la transformación del plasminógeno en plasmina e incluso impide la degradación de los coágulos, dando lugar a un estado hipofibrinolítico. Pero no sólo influye el daño endotelial, se ha visto que los NETs forman andamios que pueden ocluir los vasos e incluso promover la agregación plaquetaria³⁹; estas plaquetas generan una mayor formación de NETs, dando lugar a un círculo vicioso entre plaquetas y neutrófilos que resulta en una coagulopatía más grave.

Se ha demostrado que un recuento elevado de neutrófilos al ingreso es un marcador precoz de insuficiencia respiratoria y de mal pronóstico^{40,41} lo que está vinculado directamente con el incremento en la liberación de NETs y una mayor exposición a sus efectos deletéreos sobre el organismo. La presencia de IL-1 β , una citoquina relacionada con la inmunopatogenia de la COVID-19⁴², es un inductor clave para la formación de estas NETs. Asimismo, las propias NETs inducen la liberación de IL-1 β , que combinada con el resto de citoquinas liberadas, da lugar a la “tormenta de citoquinas”, promotoras del daño pulmonar. La familia de los coronavirus comparte ciertas proteínas codificadas en los marcos abiertos de lectura (en inglés: ORF) 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b, de las cuales la proteína 3a se expresa en la COVID-19 e induce muerte celular necrótica en las células endoteliales^{43,44}. Este daño, cuando se combina con la formación de NETs, da lugar a la liberación de DAMPs, que aumenta la producción de citoquinas inflamatorias, creando así un círculo vicioso que exacerba la tormenta de citoquinas, lo que explica el daño endotelial y alveolar⁴⁴.

Las NETs liberan ADN, histonas y proteínas granulares como la elastasa de neutrófilos, la catépsina G, la mieloperoxidasa y la proteinasa 3, lo que conduce a la autoamplificación de la necroinflamación y a una grave destrucción tisular^{44,45}. Como se ha mencionado anteriormente, el SARS-CoV-2 tiene un impacto significativo en el endotelio, que se asocia con la deformación capilar y la neoformación vascular^{46,47} a lo que se suma la acción de estas NETs, las cuales comprometen la integridad y la función de barrera del endotelio y causan la muerte de las células endoteliales. Para que estas NETs se activen va a depender mucho de la expresión de TMPRSS2 y de la interacción del virus con los receptores ACE2^{47,48}.

Veras y cols.⁴⁹, en su estudio, demostraron que no sólo los neutrófilos infectados por el SARS-CoV-2, sino también los neutrófilos sanos, pueden liberar NETs; este efecto depende de la replicación viral y de la señalización PAD-4, lo que implicaría la formación “clásica” de NETs.

Se entiende entonces, que la formación de NETs en pacientes con COVID-19 ocurre a través de dos

mecanismos: suicida e inducido por plaquetas, los cuales contribuyen a las manifestaciones clínicas de esta enfermedad^{47,50}.

Como es bien sabido, se ha notificado una incidencia significativa de trombosis venosa en pacientes críticos infectados por SARS-CoV-2⁵¹; una de las posibles explicaciones de este mecanismo son las NETs que forman agregados de NETs (aggNETs), proporcionando un marco para la unión entre eritrocitos y plaquetas activadas, lo que induce la formación de más NETs, dando lugar a un círculo vicioso que termina en la formación de fibrina y propagación de trombos en el sistema venoso⁵².

La Figura 2 muestra un esquema de la fisiopatología de la formación de NET durante la infección por SARS-CoV-2.

Como era de esperar, la presencia de NETs está relacionada con la gravedad, e incluso, puede predecir la mortalidad en pacientes infectados por SARS-CoV-2. Se han estudiado los productos de las NET, como mieloperoxidasa, elastasa, proteinasa 3, histona 3, catepsina, transcetolasa y calprotectina. Sin embargo, estos componentes son difíciles de medir, por lo que no se puede hacer una estimación de la cantidad de NET formadas. Varios estudios se han centrado en medir la actividad de los NET y su relación con la mortalidad y la gravedad de la enfermedad. En la Tabla 1 se presenta un resumen de los estudios que muestran esta relación.

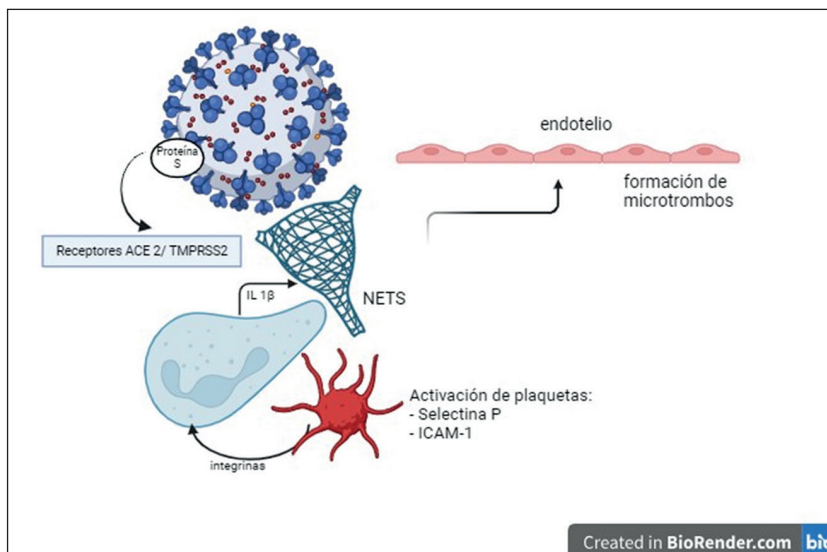


Figura 2. Mecanismo de formación de NET durante la infección por SARS-CoV-2: diagrama que ilustra la interacción entre SARS-CoV-2 y la formación de NETs. Se representan dos mecanismos potenciales: 1) NETosis suicida: durante la infección por SARS-CoV-2, hay presencia de neutrófilos; una vez que se produce la infección, hay una liberación de NETs mediada por la interacción de la proteína S con los receptores ACE2 y TMPRSS2; 2) hay activación plaquetaria, que libera Selectina P e ICAM que promueven la interacción neutrófilo/plaqueta con la subsiguiente liberación de NETs; ambos mecanismos son amplificados por la IL-1 β ; estos NETs inducen un daño endotelial que promueve la liberación de factores inflamatorios, amplificando la respuesta inflamatoria y produciendo también un estado procoagulante que termina en la formación de microtrombos. TMPRSS2: proteasa transmembrana serina 2, ACE 2: enzima convertidora de angiotensina 2, ICAM-1: molécula de adhesión [elaborado por los autores].

Tabla 1. Relación entre la formación de NETs y la gravedad de la infección por SARS-CoV-2

Autor	Tipo de estudio	Técnica usada para medir NETs	Resultados
Middleton y cols., 2020 ⁵³	Cohorte prospectiva	MPO-ADN, cuantificación de neutrófilos granulares, (Cit-H3), microtrombos	Las NETs son responsables de la formación de microtrombos.
Yu Zuo y cols., 2020 ⁸	Estudio prospectivo en 50 pacientes	MPO-DNA, Cit-H3, <i>cell free</i>	MPO-DNA: aumento de NETs en pacientes con VM; Cit-H3: aumento del recuento de plaquetas. ADN libre de células: se correlaciona con los reactantes de fase aguda (PCR), dímero D. ADN libre de células y MPO: más elevados en pacientes con VM.
Radermecker y cols., 2020 ⁵²	Serie de casos en COVID-19	MPO-DNA, Cit-H3	Su presencia contribuye a la gravedad de la enfermedad.
Obermayer y cols., 2021 ⁵⁴	Reporte de autopsias en 7 pacientes con SDRA	MPO, Cit-H3, CD66	Las NET se correlacionaron con la formación de microtrombos y la gravedad de la enfermedad.
Veras y cols., 2020 ⁴⁹	Cohorte de 32 pacientes	MPO en suero, Cit-H3	Las NET promueven la muerte celular en los pulmones.
Kassina y cols., 2022 ⁵⁵	Estudio prospectivo con 46 pacientes COVID-19 (11 no UCI, 26 UCI, 9 con ECMO)	NETs en frotis de sangre citratada, se midió la razón NETs/Neutrófilos (%NETs).	El % de NET fue mayor en los pacientes con COVID y 1,3 veces mayor con ECMO.
Kinnare y cols., 2021 ⁵⁶	Estudio de cohorte prospectivo	MPO, <i>cell-free</i> DNA, Cit-H3	MPO y ADN libre de células: elevados en COVID.
Yu Zuo y cols., 2021 ⁵⁷	Estudio de casos de control (11 casos con trombosis, 33 controles)	MPO, <i>cell-free</i> DNA, Cit-H3	Los pacientes que desarrollaron eventos trombóticos fueron positivos para la presencia de los tres marcadores.
Leppkes y cols., 2020 ⁵⁸	Estudio retrospectivo con 71 pacientes	<i>Cell-free</i> DNA, Cit-H3, MPO, y elastasa de neutrófilos en los vasos sanguíneos	Oclusión de vasos pulmonares por NETs.

MPO-ADN: ADN mieloperoxidasa, Cit-H3: histona H3 citrulinada, SDRA: síndrome de distrés respiratorio del adulto, PCR: proteína C reactiva, VM: ventilación mecánica, ECMO: oxigenación por membrana extracorpórea.

Enfoque terapéutico para la formación de NETS durante la infección por SARS-CoV-2

Resulta razonable pensar que durante la infección por SARS-CoV-2 si hay una mayor formación de NETs hay una mayor mortalidad, pero como se mencionó previamente este no es el único punto importante ya que también su sobreexpresión implica mayores complicaciones inherentes a la enfermedad como necesidad de ventilación mecánica, mayor incidencia de fenómenos tromboticos, mayor tiempo de estancia en UCI, por lo que tener una herramienta que aminore su sobreproducción resulta importante. Por un lado, tenemos fármacos que se aprobaron para el manejo de pacientes con infección moderada/grave y que demostraron una disminución en

las tasas de mortalidad pero que también han manifestado cierta actividad contra la formación de NETs o limitar los efectos propios de estas redes. Por otro lado, tenemos el desarrollo de nuevos fármacos que limitan la producción de estas redes. Por ejemplo, utilizando ADNasa, que se administra a pacientes con fibrosis quística, se demostró un bloqueo de ROS, PAD4 y gasdermina D, moléculas implicadas en la formación de estas trampas. Otra estrategia sería bloquear la actividad de proteínas NET como la elastasa de neutrófilos³⁹. Para obtener un mejor entendimiento de estos nuevos enfoques terapéuticos y la acción de fármacos aprobados para el manejo de esta entidad, en la Tabla 2 hacemos un resumen de su mecanismo de acción y los resultados que se reportan en la literatura científica.

Tabla 2. Fármacos utilizados y nuevas moléculas diseñadas para enfrentar la infección por SARS-COV-2 y la formación de NETS

Fármaco	Mecanismo de acción	Evidencia científica
Corticosteroides ^{59,60}	Inhiben la acción de la IL17 (↓ formación de NETS)	RECOVERY trial ⁶¹ : 6 mg de dexametasona al día disminuyó la mortalidad (RR 0,83, P < 0,001) en VM o con apoyo de oxígeno
Ácido acetilsalicílico ^{62,63}	Efecto conocido sobre la agregación plaquetaria, bloqueando la interacción plaqueta-neutrófilo, disminuyendo el efecto de las NETS	RECOVERY trial ⁶³ : sin cambios en cuanto a tasas de mortalidad (p: 0,35), ni progresión a VM (p: 0,23)
Inhibidores de la elastasa de neutrófilos: sivelestat ⁶⁴	Bloque el efecto lesivo de la elastasa de neutrófilos sobre el tejido conectivo pulmonar, limita la capacidad del virus al prevenir la activación proteolítica de la proteína S ⁶⁴	Evidencia basada en acción farmacológica, sin estudios aún en COVID-19 ⁶⁵
Dornasa alfa ^{66,67}	Recombinante de ADNasa I Reduce la viscosidad mediada por ADN de las secreciones ricas en neutrófilos, lisando los NETS	Reporte de casos controles donde se demostró que su uso disminuye la cantidad de FiO ₂ utilizada no solo en pacientes con COVID-19 sino también en SDRA, pero sin efectos medidos sobre mortalidad ^{66,68}
Trombomodulina recombinante humana ^{69,70}	Sin efecto directo sobre las Nets, pero se encarga de activar la proteína C actuando como antiinflamatorio y anticoagulante por la escisión del factor V y VIII ⁷¹ disminuyendo el estado inflamatorio-trombótico	Reducción de mortalidad en SAC (odds ratio (OR) 0.54, 95% intervalo de confianza (IC): 0,42-0,71) ⁷² , en COVID no se cuenta con evidencia, hasta el momento, del uso de este fármaco
Proteína C activada (PCA) ^{70,73}	Posee un efecto anticoagulante al inhibir la formación de factores V, VIIIa ⁷⁰ , la PCA evita que las plaquetas activadas induzcan la liberación de NETS al escindir las histonas extracelulares ⁷⁴	En animales con infección de ébola disminuye la tasa de mortalidad ⁷⁵ , no hay estudios asociados a infección por COVID-19
Heparina ⁷⁰	Inactiva el factor X y la conversión de protrombina a trombina, en dosis altas inhibe la conversión de fibrinógeno a fibrina. La heparina ha demostrado disminuir la lesión inducida por histonas ⁷⁶	CORIST trial ⁷⁷ : Disminución de 40% en la mortalidad (<i>hazard ratio</i> = 0,60; 95% IC: 0,49-0,74) sobre todo en enfermedad severa ACTIV-4a trial ⁷⁸ : sin beneficio de la dosis de anticoagulación vs estándar
Cloroquina/hidroxicloroquina (HDQ) ⁷⁰	Fármaco antimalárico, se ha demostrado la HDQ modula la respuesta de MMP-TIMPS y podría tener un rol en la reducción de NETS ^{79,80}	RECOVERY trial ⁸¹ : sin cambios en mortalidad vs cuidado usual (RR, 1,09; 95% IC: 0,97 a 1,23; P = 0,15), y con un riesgo de mayor necesidad de VM (RR, 1,14; 95% IC: 1,03 a 1,27)
Vitamina D (⁷⁰)	La vitamina D disminuye la apoptosis lo que disminuye la formación de NETS ⁸²	Murai et al. ⁸² demostraron que el uso de una dosis de vitamina D en pacientes hospitalizados por COVID no reduce la estancia hospitalaria, ni la mortalidad (p: 0,43) ni la admisión a cuidados intensivos (p: 0,30)

VM: ventilación mecánica, FiO₂: fracción inspirada de oxígeno, SDRA: síndrome de distress respiratorio agudo, PAR-1: receptor 1 de proteasa activada, SAC: coagulopatía asociada a la sepsis, MMP: metalopeptidasas de matriz, TIMPS: inhibidores tisulares de metalopeptidasas

Discusión

La pandemia de COVID-19 supuso un reto formidable para el personal sanitario, no sólo por las elevadas tasas de mortalidad que generó^{2,4}, sino también, por la masiva ocupación hospitalaria, que puso en jaque hasta los sistemas de salud más sólidos en el mundo, siendo las unidades de cuidados intensivos las que manejaron los pacientes con las formas más graves de la enfermedad, donde la hipoxemia llegó a ser tan grave que progresó hacia el distrés respiratorio².

En un principio, se planteó que la enfermedad se caracteriza por un daño pulmonar importante³⁷ y por ello, se dio el nombre de CARDS a la insuficiencia respiratoria de tipo SDRA en esta entidad. Estudios³⁷ que evaluaron las características ventilatorias y oxigenatorias, llevaron a la descripción de fenotipos de CARDS: H (*high*) y L (*low*), que básicamente planteaban diferencias en las propiedades mecánicas del pulmón. Sin embargo, después se entendió que estos fenotipos eran parte de la historia natural de la enfermedad y podían presentarse en un mismo paciente dependiendo su tiempo de evolución. En el fenotipo L, el espacio muerto alveolar incrementado responde a alteraciones de la ventilación/perfusión por oclusión microvascular pulmonar; es ahí, donde los términos de endotelitis y NETs, adquirieron interés fisiopatológico.

Hoy sabemos que el daño no se limita al aparato respiratorio sino que tiene una afectación multisistémica muy importante⁶ teniendo como piedra angular la unión del virus a sus receptores es especial ACE2 y TMPRLRS³⁶ induciendo una respuesta inflamatoria muy importante en el organismo, y aquí es donde juegan un rol fundamental los neutrófilos como células de inmunidad innata; éstos, a lo largo de los años han sido células que se encargan de engullir y destruir a los microorganismos pero se ha descubierto¹¹ un nuevo mecanismo que aporta en su actividad de defensa: la formación de NETs, las cuales terminan siendo redes que ayudan a completar la acción del neutrófilo. Como es de esperar, si se produce un mayor reclutamiento de neutrófilos existe una mayor capacidad para formar NETs las cuales al sobre expresarse tienen efectos deletéreos sobre el organismo siendo uno de estos los fenómenos tromboembólicos que se forman. Aquí es donde juegan un rol importante el mecanismo por el que se forman las NETs durante la infección por SARS-CoV-2, uno de ellos es el método “clásico” o suicida y el otro es el que viene dado por la interacción plaqueta/neutrófilo haciéndonos entender que las plaquetas no se encargan solo de la coagulación sino que también tiene un efecto inmunológico⁸³. Esta relación está bien determinada en la literatura científica; cuando las plaquetas entran en contacto con el sitio de lesión, liberan moléculas de adhesión como la P-selectina y la molécula de adhesión (ICAM-1), las que facilitan la agregación de los neutró-

filos, generando una interacción entre ellos que ocurre a través de la liberación de integrinas⁸⁴, lo que estimula la formación de NETs e induce apoptosis celular a nivel pulmonar⁴⁹. Así se explica el intenso daño a nivel pulmonar ya que se ha demostrado que su formación exacerba la respuesta inflamatoria generando un bucle NETs-IL-1 β , el cual se relaciona con la presencia de lesión pulmonar aguda y SDRA e incrementa la expresión de citoquinas proinflamatorias llevando a una tormenta de citoquinas y la presencia del síndrome de activación de macrófagos⁸⁵. Este conjunto de eventos genera un daño multisistémico al organismo, no siempre solo agudo, ya que se demostró que en estadios más avanzados las NETs pueden ser sustituidas por redes de colágeno, promoviendo la subsiguiente fibrosis pulmonar^{52,86}.

Como se ha propuesto en esta revisión, medir las NETs directamente resulta difícil; incluso, sus productos no son de tan fácil acceso a la cabecera del paciente, pero la presencia de estos guarda relación con la formación de trombos^{53,58} la gravedad de la enfermedad⁵⁴ y la necesidad de ventilación mecánica⁵⁷; entonces, al tratarse de una entidad con respuesta inflamatoria y liberación de IL-6, resulta lógico bloquear esta respuesta. Se ha demostrado que la reducción de la liberación de NETs disminuye las concentraciones sanguíneas de IL-6 en modelos murinos de *shock* endotóxico^{62,87} e incluso Veras y cols.⁸⁸, demuestra en sus experimentos que tratar a ratones infectados con SARS-CoV-2 con Dornasa Alfa (una ADNasa I humana recombinante) mejora el estado clínico y disminuye la lesión pulmonar, cardíaca y renal haciéndonos plantear que su uso podría disminuir los efectos deletéreos desencadenados por SARS-CoV-2.

Como hemos mencionado hasta ahora, la formación de estas NETs tiene mucha relación con un estado inflamatorio y esto podemos extrapolarlo a una entidad que es muy común en las unidades de cuidados intensivos: la sepsis, Ventura-Santana y cols.³⁹, hicieron una interesante comparación entre el SARS-CoV-2 y la sepsis: ambas causan daño multisistémico, y el SDRA es la principal causa de mortalidad en ambas patologías. En ambas enfermedades, que son estados hiperinflamatorios, es obvio que las NETs desempeñan un papel importante; su agregación a nivel pulmonar contribuye a la destrucción de las células epiteliales a este nivel e inicia toda la cascada que hemos mencionado. Si bien es cierto no contamos con estudios humanos, estudiar este campo de NETs podría resultar en algo beneficioso para poder entender y mitigar la respuesta inflamatoria excesiva que se produce en ciertas entidades

Conclusiones

La COVID-19 como enfermedad, nos ha dejado con más preguntas que respuestas; aún no se ha descubierto

una solución para mitigar sus efectos adversos sobre el organismo. Un mecanismo clave para hacer frente a esta pandemia fue el uso de vacunas, que permitieron vislumbrar la luz al final del túnel y avanzar en la batalla contra esta afección. Sin embargo, sigue faltando una teoría sólida que lo abarque todo, y aquí es probablemente donde el endotelio desempeña un papel importante. Por lo tanto, estamos dispuestos a afirmar que la COVID-19 es una endotelio patía con una respuesta inflamatoria excesiva que promueve la agregación de neutrófilos, lo que a su vez conduce a la liberación de NETs que, en cantidades excesivas, promueven un estado protrombótico y aumen-

tan la respuesta inflamatoria. La relación entre los NETs y las tasas de mortalidad, la necesidad de ventilación mecánica y los eventos trombóticos es significativa. Es esencial disponer de una estrategia que ayude a mitigar los efectos de las NET, pero lamentablemente no existe en la actualidad. Así pues, es necesario seguir investigando sobre la formación de NETs. Si bien es cierto de haberse declarado superada la pandemia por SARS-CoV-2, aún queda mucho terreno por explorar; entender este mecanismo, no solo la COVID-19, nos permitirá tener una mejor comprensión del daño molecular en otras entidades como por ejemplo la sepsis.

Referencias bibliográficas

- Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. 2020;395(10223): 497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5
- Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020; 382(8): 727-33. doi: 10.1056/nejmoa2001017
- Johns Hopkins Hospital. Johns Hopkins Coronavirus Resource Center, <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
- Caetano G, Pose N. Impactos del COVID-19 en los escenarios latinoamericanos contemporáneos. *Perfiles Latinoamericanos*. 2021; 29(58). doi: 10.18504/pl2958-015-2021
- Martínez M, Cuadrado C, Goyenechea M, Fica D, Peña S. Chile frente al SARS-CoV-2: pandemia en medio del conflicto social. *Rev Chilena Salud Pública*. Published online 2020;50-67. <https://doi.org/10.5354/0719-5281.2020.60384>
- Robba C, Battaglini D, Pelosi P, Rocco PRM. Multiple organ dysfunction in SARS-CoV-2: MODS-CoV-2. *Expert Rev Respir Med*. 2020; 14(9): 865-8. doi: 10.1080/17476348.2020.1778470
- Pons S, Fodil S, Azoulay E, Zafrani L. The vascular endothelium: The cornerstone of organ dysfunction in severe SARS-CoV-2 infection. *Crit Care*. 2020; 24(1). doi: 10.1186/s13054-020-03062-7
- Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, Gockman K, Zuo M, Madison JA, et al. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight*. Published online April 24, 2020. doi: 10.1172/jci.insight.138999
- Haynes B, Soderberg K, Fauci A. Chapter 349: Introduction to the Immune System *Harrison's: Principles of Internal Medicine*. Vol 2. 21st ed. Loscalzo J, Kasper D, Longo DL, Fauci AS, Hauser SL, Jameson JL, eds). McGraw Hill; 2022.
- John I Gallin IMGRSnyderman. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. New York: Raven Press. Published online 1992. <https://www.semanticscholar.org/paper/Inflammation%3A-Basic-Principles-and-Clinical-Gallin-Goldstein/4377fb5b0375b2c1ec2f53e70f07e69d9eaba208>
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* (1979). 2004; 303(5663): 1532-5. doi: 10.1126/science.1092385
- Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13(3): 159-75. doi: 10.1038/nri3399
- Brinkmann V. Neutrophil extracellular traps in the second decade. *J Innate Immun*. 2018; 10(5-6): 414-21. doi: 10.1159/000489829
- Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BNV, Zbytnuik LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*. 2012; 18(9): 1386-93. doi: 10.1038/nm.2847
- Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5(8): 577-82. doi: 10.1038/nrmicro1710
- Serra López-Matencio JM, Morell Baladrón A, Castañeda S. Inhibidores de la vía de señalización JAK-STAT en el tratamiento de las enfermedades inmunomediadas. *Med Clin (Barc)*. 2019; 152(9): 353-60. doi: 10.1016/j.medcli.2018.10.020
- Krolewski JJ, Lee R, Eddy R, Shows TB, Dalla-Favera R. Identification and chromosomal mapping of new human tyrosine kinase genes. *Oncogene*. 1990; 5(3): 277-282. PMID: 2156206
- Cai B, Cai J Ping, Luo Y long, Chen C, Zhang S. The specific roles of JAK/STAT signaling pathway in sepsis. *Inflammation*. 2015; 38(4): 1599-608. doi: 10.1007/s10753-015-0135-z
- Torres-Carpio DA, Lanas-Mendoza ES, Rueda-Barragán FE, Vélez-Páez PA, Torres Cabezas PR, Jara González FE, et al. Importancia de la ruta de señalización JAK/STAT en la sepsis. *ACTA MEDICA PERUANA*. 2022; 39(2). doi: 10.35663/amp.2022.392.2240
- Clark JD, Flanagan ME, Telliez JB. Discovery and development of Janus Kinase (JAK) inhibitors for inflammatory diseases. *J Med Chem*. 2014; 57(12): 5023-38. doi: 10.1021/jm401490p
- Seif F, Khoshmirsafa M, Aazami H, Mohsenzadegan M, Sedighi G, Bahar M. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Communication and Signaling*. 2017; 15(1): 23. doi: 10.1186/s12964-017-0177-y
- Wolach O, Sellar RS, Martinod K, Cherpokova D, McConkey M, Chappell RJ, et al. Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Sci Transl Med*. 2018; 10(436). doi: 10.1126/scitranslmed.aan8292
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002; 82(1): 47-95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001
- Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood*. 2013; 122(16): 2784-94. doi: 10.1182/blood-2013-04-457671
- Pilczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. a novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 2010; 185(12): 7413-25. doi: 10.4049/jimmunol.1000675
- Byrd AS, O'Brien XM, Johnson CM, Lavigne LM, Reichner JS. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *J Immunol*. 2013; 190(8): 4136-48. doi: 10.4049/jimmunol.1202671
- Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes

- different from typical apoptosis or necrosis. *J Leukoc Biol.* 1996; 59(2): 229-40. doi: 10.1002/jlb.59.2.229
- 28.- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007; 176(2): 231-41. doi: 10.1083/jcb.200606027
 - 29.- Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* 2007; 13(4): 463-9. doi: 10.1038/nm1565
 - 30.- Carestia A, Kaufman T, Rivadeneyra L, Landoni VJ, Pozner RG, Negrotto S, et al. Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets. *J Leukoc Biol.* 2016; 99(1): 153-62. doi: 10.1189/jlb.3A0415-161R
 - 31.- Carestia A, Kaufman T, Schattner M. Platelets: New bricks in the building of neutrophil extracellular traps. *Front Immunol.* 2016; 7. doi: 10.3389/fimmu.2016.00271
 - 32.- Etulain J, Martinod K, Wong SL, Cifuni SM, Schattner M, Wagner DD. P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood.* 2015; 126(2): 242-6. doi: 10.1182/blood-2015-01-624023
 - 33.- Yousefi S, Mihalache C, Kozłowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2009; 16(11): 1438-44. doi: 10.1038/cdd.2009.96
 - 34.- Yam J, García L, Sánchez L. Trampas extracelulares de neutrófilos (NET), consecuencia de un suicidio celular. *Gac Med Mex.* Published online 2012:68-75. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=33329>
 - 35.- Liu YC, Kuo RL, Shih SR. COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. *Biomed J.* 2020; 43(4): 328-33. doi: 10.1016/j.bj.2020.04.007
 - 36.- Cecconi M, Forni G, Mantovani A. Ten things we learned about COVID-19. *Intensive Care Med.* 2020; 46(8): 1590-3. doi: 10.1007/s00134-020-06140-0
 - 37.- Marini JJ, Gattinoni L. Management of COVID-19 respiratory distress. *JAMA.* 2020; 323(22): 2329. doi: 10.1001/jama.2020.6825
 - 38.- Libby P, Lüscher T. COVID-19 is, in the end, an endothelial disease. *Eur Heart J.* 2020; 41(32): 3038-44. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa623
 - 39.- Ventura-Santana E, Ninan JR, Snyder CM, Okeke EB. Neutrophil extracellular traps, sepsis and COVID-19 – a tripod stand. *Front Immunol.* 2022; 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.902206
 - 40.- Zhang B, Zhou X, Zhu C, Song Y, Feng F, Yanru Qiu Y, et al. Immune phenotyping based on the neutrophil-to-lymphocyte ratio and IgG level predicts disease severity and outcome for patients with COVID-19. *Front Mol Biosci.* 2020; 7. doi: 10.3389/fmolb.2020.00157
 - 41.- Ying Song C, Xu J, He JQ, Quiang Y. COVID-19 early warning score: a multi-parameter screening tool to identify highly suspected patients. <https://doi.org/10.1101/2020.03.05.20031906>
 - 42.- Janiuk K, Jabłońska E, Garley M. Significance of NETs formation in COVID-19. *Cells.* 2021; 10(1): 151. doi: 10.3390/cells10010151
 - 43.- Yue Y, Nabar NR, Shi CS, Kamenyeva O, Xiao X, Hwang IY, et al. SARS-Coronavirus Open Reading Frame-3a drives multimodal necrotic cell death. *Cell Death Dis.* 2018; 9(9): 904. doi: 10.1038/s41419-018-0917-y
 - 44.- Tomar B, Anders HJ, Desai J, Mulay SR. Neutrophils and neutrophil extracellular traps drive necroinflammation in COVID-19. *Cells.* 2020; 9(6): 1383. doi: 10.3390/cells9061383
 - 45.- Linkermann A, Stockwell BR, Krautwald S, Anders HJ. Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure. *Nat Rev Immunol.* 2014; 14(11): 759-67. doi: 10.1038/nri3743
 - 46.- Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, Welte T, Laenger F, et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med.* 2020; 383(2): 120-8. doi: 10.1056/NEJMoa2015432
 - 47.- Ackermann M, Anders HJ, Bilyy R, Bowlin GL, Daniel C, De Lorenzo R, et al. Patients with COVID-19: in the dark-NETs of neutrophils. *Cell Death Differ.* 2021; 28(11): 3125-39. doi: 10.1038/s41418-021-00805-z
 - 48.- Pieterse E, Rother N, Garsen M, Hofstra JM, Satchell SC, Hoffmann M, et al. Neutrophil extracellular traps drive endothelial-to-mesenchymal transition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017; 37(7): 1371-9. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309002
 - 49.- Protasio Veras F, Cornejo Pontelli MC C, Toller-Kawahisa JE, de Lima M, Carvalho Nascimento D, et al. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. *J Exp Med.* 2020; 217(12). doi: 10.1084/jem.20201129
 - 50.- Lou M, Yuan D, Liao S, Tong L, Li J. Potential mechanisms of cerebrovascular diseases in COVID-19 patients. *J Neurovirol.* 2021; 27(1): 35-51. doi: 10.1007/s13365-021-00948-2
 - 51.- Llitjos J, Leclerc M, Chochois C, Monsallier JM, Ramakers M, Auvray M, et al. High incidence of venous thromboembolic events in anticoagulated severe COVID-19 patients. *J Thromb Haemost.* 2020; 18(7): 1743-6. doi: 10.1111/jth.14869
 - 52.- Radermecker C, Detrembleur N, Guioit J, Cavalier E, Henket M, d'Emal C, et al. Neutrophil extracellular traps infiltrate the lung airway, interstitial, and vascular compartments in severe COVID-19. *J Exp Med.* 2020; 217(12). doi: 10.1084/jem.20201012
 - 53.- Middleton EA, He XY, Denorme F, Campbell RA, Ng D, Salvatore SP, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood.* 2020; 136(10): 1169-79. doi: 10.1182/blood.2020007008
 - 54.- Obermayer A, Jakob LM, Haslbauer JD, Matter MS, Tzankov A, Stoiber W. Neutrophil extracellular traps in fatal COVID-19-associated lung injury. *Dis Markers.* 2021; 2021: 1-10. doi: 10.1155/2021/5566826
 - 55.- Kassina D, Gur'ev A, Martyanov A, Volkov A. Neutrophil extracellular traps in COVID-19 patients correlates with therapy, disease severity and mortality. *Res Pract Thromb Haemost.* 2021; 5. <https://abstracts.isth.org/abstract/neutrophil-extracellular-traps-in-covid-19-patients-correlates-with-therapy-disease-severity-and-mortality/>
 - 56.- Kinnare N, Hook JS, Patel PA, Monson NL, Moreland JG. Neutrophil extracellular trap formation potential correlates with lung disease severity in COVID-19 patients. *Inflammation.* 2022; 45(2): 800-11. doi: 10.1007/s10753-021-01585-x
 - 57.- Zuo Y, Zuo M, Yalavarthi S, Gockman K, Madison JA, Shi H, et al. Neutrophil extracellular traps and thrombosis in COVID-19. *J Thromb Thrombolysis.* 2021; 51(2): 446-53. doi: 10.1007/s11239-020-02324-z
 - 58.- Leppkes M, Knopf J, Naschberger E, Lindemann A, Singh J, Herrmann I, et al. Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. *EBioMedicine.* 2020; 58: 102925. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102925
 - 59.- Arabi YM, Chrousos GP, Meduri GU. The ten reasons why corticosteroid therapy reduces mortality in severe COVID-19. *Intensive Care Med.* 2020; 46(11): 2067-70. doi: 10.1007/s00134-020-06223-y
 - 60.- Janssen P, Tosi I, Hego A, Maréchal P, Marichal T, Radermecker C. Neutrophil extracellular traps are found in bronchoalveolar lavage fluids of horses with severe asthma and correlate with asthma severity. *Front Immunol.* 2022; 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.921077
 - 61.- RECOVERY Collaborative Group. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021; 384(8): 693-704. doi: 10.1056/NEJMoa2021436
 - 62.- Carestia A, Davis RP, Grosjean H, Lau MW, Jenne CN. Acetylsalicylic acid inhibits intravascular coagulation during *Staphylococcus aureus*-induced sepsis in mice. *Blood.* 2020; 135(15): 1281-6. doi: 10.1182/blood.2019002783
 - 63.- RECOVERY Collaborative Group: Abani O, Abbas A, Abbas F, Abbas M, Abbasi S, Abbas

- H, et al. Aspirin in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *The Lancet*. 2022; 399: 143-51. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01825-0
- 64.- Mohamed MMA, El-Shimy IA, Hadi MA. Neutrophil elastase inhibitors: a potential prophylactic treatment option for SARS-CoV-2-induced respiratory complications? *Crit Care*. 2020; 24(1): 311. doi: 10.1186/s13054-020-03023-0
- 65.- Sahebnaasagh A, Saghaei F, Safdari M, Khataminia M, Sadremomtaz A, Talaei Z, et al. Neutrophil elastase inhibitor (sivelestat) may be a promising therapeutic option for management of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome or disseminated intravascular coagulation in COVID-19. *J Clin Pharm Ther*. 2020; 45(6): 1515-9. doi: 10.1111/jcpt.13251
- 66.- Weber AG, Chau AS, Egeblad M, Barnes BJ, Janowitz T. Nebulized in-line endotracheal dornase alfa and albuterol administered to mechanically ventilated COVID-19 patients: a case series. *Molecular Med*. 2020; 26(1): 91. doi: 10.1186/s10020-020-00215-w
- 67.- Toma A, Darwish C, Taylor M, Harlacher J, Darwish R. The use of dornase alfa in the management of COVID-19-associated adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Res Pract*. 2021; 2021: 1-6. doi: 10.1155/2021/8881115
- 68.- Morris C, Mullan B. Use of dornase alfa in the management of ARDS. *Anaesthesia*. 2004; 59(12): 1249. doi: 10.1111/j.1365-2044.2004.04018.x
- 69.- Helms J, Clere-Jehl R, Bianchini E, Le Borgne P, Burban M, Zobairi F, et al. Thrombomodulin favors leukocyte microvesicle fibrinolytic activity, reduces NETosis and prevents septic shock-induced coagulopathy in rats. *Ann Intensive Care*. 2017; 7(1): 118. doi: 10.1186/s13613-017-0340-z
- 70.- Mutua V, Gershwin LJ. A review of neutrophil extracellular traps (NETs) in disease: potential anti-NETs therapeutics. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2021; 61(2): 194-211. doi: 10.1007/s12016-020-08804-7
- 71.- Mazzeffi M, Chow JH, Amoroso A, Tanaka K. Revisiting the protein C pathway: an opportunity for adjunctive intervention in COVID-19? *Anesth Analg*. 2020; 131(3): 690-3. doi: 10.1213/ANE.0000000000005059
- 72.- Valeriani E, Squizzato A, Gallo A, Porreca E, Vincent JL, Iba T et al. Efficacy and safety of recombinant human soluble thrombomodulin in patients with sepsis-associated coagulopathy: A systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost*. 2020; 18(7): 1618-25. doi: 10.1111/jth.14812
- 73.- Pestka SB. Old drug, new trick? The rationale for the treatment of COVID-19 with activated protein C. *Med Hypotheses*. 2021; 149: 110537. doi: 10.1016/j.mehy.2021.110537
- 74.- Healy LD, Puy C, Fernández JA, Annachiara Mitrugno A, Keshari RS, Taku NA, et al. Activated protein C inhibits neutrophil extracellular trap formation in vitro and activation in vivo. *J Biol Chem*. 2017; 292(21): 8616-29. doi: 10.1074/jbc.M116.768309
- 75.- Hensley LE, Stevens EL, Yan SB, Geisbert JB, Macias WL, Larsen T, et al. Recombinant human activated protein C for the postexposure treatment of Ebola hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 2007; 196(s2): S390-S399. doi: 10.1086/520598
- 76.- Iba T, Hashiguchi N, Nagaoka I, Tabe Y, Kadota K, Sato K. Heparins attenuated histone-mediated cytotoxicity in vitro and improved the survival in a rat model of histone-induced organ dysfunction. *Intensive Care Med Exp*. 2015;3(1): 36. doi: 10.1186/s40635-015-0072-z
- 77.- Di Castelnovo A, Costanzo S, Antinori A, Berselli N, Blandi L, Bocaccio ML, et al. Heparin in COVID-19 patients is associated with reduced in-hospital mortality: the multicenter italian CORIST Study. *Thromb Haemost*. 2021; 121(08): 1054-65. doi: 10.1055/a-1347-6070
- 78.- Goligher E, Bradbury CA, McVerry BJ, Lawler PR, BJS, Gong MN, C, Zarychanski R. Therapeutic anticoagulation with heparin in critically ill patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021; 385(9): 777-89. doi: 10.1056/NEJMoa2103417
- 79.- Lesiak A, Narbutt J, Sysa-Jedrzejowska A, Lukamowicz J, McCauliffe D, Wóznicka A. Effect of chloroquine phosphate treatment on serum MMP-9 and TIMP-1 levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2010; 19(6): 683-8. doi: 10.1177/0961203309356455
- 80.- Wozniacka A, Lesiak A, Narbutt J, McCauliffe DP, Sysa-Jedrzejowska A. Chloroquine treatment influences proinflammatory cytokine levels in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2006; 15(5): 268-75. doi: 10.1191/0961203306lu2299oa
- 81.- RECOVERY Collaborative Group, Horby P, M. Effect of hydroxychloroquine in hospitalized patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2020; 383(21): 2030-40. doi: 10.1056/NEJMoa2022926
- 82.- Murai IH, Fernandes AL, Sales LP, Pinto AJ, Goessler KF, Duran CSC, et al. Effect of a single high dose of vitamin D3 on hospital length of stay in patients with moderate to severe COVID-19: A randomized clinical trial. *JAMA*. 2021; 325(11): 1053. doi: 10.1001/jama.2020.26848
- 83.- Mezger M, Nording H, Sauter R, Tobias Graft T, Heim C, von Bubnoff N, et al. Platelets and immune responses during thromboinflammation. *Front Immunol*. 2019; 10. doi: 10.3389/fimmu.2019.01731
- 84.- McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, Jenne CN, Kubes P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe*. 2012; 12(3): 324-33. doi: 10.1016/j.chom.2012.06.011
- 85.- Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Al-hussaniy HA, Al-Harcan NAH, Alexiou A, Batiha GES. Neutrophil extracellular traps (NETs) and Covid-19: A new frontiers for therapeutic modality. *Int Immunopharmacol*. 2022; 104: 108516. doi: 10.1016/j.intimp.2021.108516
- 86.- Chrysanthopoulou A, Mitroulis I, Apostolidou E, Arelaki S, Mikroulis D, Konstantinidis T, et al. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *J Pathol*. 2014; 233(3): 294-307. doi: 10.1002/path.4359
- 87.- Okeke EB, Louttit C, Fry C, et al. Inhibition of neutrophil elastase prevents neutrophil extracellular trap formation and rescues mice from endotoxic shock. *Biomaterials*. 2020; 238: 119836. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.119836
- 88.- Veras FP, Gomes GF, Silva BMS, Diego B CaetitéDB, Almeida CJRL, Silva CMS, et al. Targeting neutrophils extracellular traps (NETs) reduces multiple organ injury in a COVID-19 mouse model. *Respir Res*. 2023; 24(1): 66. doi: 10.1186/s12931-023-02336-2