

¿NETs un nuevo factor de riesgo trombótico en cáncer?

NETs a new thrombotic risk factor in cancer?

Schattner M

*Instituto de Medicina Experimental (IMEX-CONICET-ANM),
Laboratorio de Trombosis Experimental, Buenos Aires, Argentina*

mschattner@hotmail.com



SIMPOSIO SIMULTÁNEO B
GATLA- CAHT

HEMATOLOGÍA
Volumen 22 • Número Extraordinario
XIII Congreso del Grupo CAHT: 135-139
Septiembre 2018

Palabras claves: NETs,
trombosis,
cáncer.

Keywords: NETs,
thrombosis,
cancer.

El cáncer está asociado con una mayor incidencia de tromboembolismo venoso (TEV) (4% a 20%) y trombosis arterial (2% a 5%)⁽¹⁾. La trombosis asociada a cáncer generalmente carece de una etiología clara. Sin embargo, está asociada a un pronóstico pobre y representa la segunda causa de muerte en pacientes con cáncer. El TEV tiene el potencial de presentarse en el momento del diagnóstico, durante todo el tratamiento y, en última instancia, como una causa frecuente de muerte⁽¹⁾. Interesantemente, las tasas de TEV varían en diferentes tipos de cáncer sugiriendo la existencia de vías específicas para el TEV según el tipo de cáncer⁽¹⁾.

Si bien se han descriptos varios mecanismos incluyendo niveles aumentados de factores de coa-

gulación, expresión aumentada de factor tisular, exposición de fosfatidilserina, liberación de micropartículas circulantes procoagulantes, disfunción endotelial, disminución hepática en la síntesis de anticoagulante y activación plaquetaria⁽²⁾, la fisiopatología de la trombosis aún permanece desconocida y puede variar entre los diferentes tipos de cánceres y estadio de la enfermedad.

Recientemente diversos estudios han sugerido que las trampas extracelulares de neutrófilos o NETs (del inglés *Neutrophils Extracellular Traps*) podrían ser nuevos factores de riesgo asociados a la aparición de fenómenos trombóticos en cáncer⁽³⁾.

Las NETs son estructuras compuestas por un entramado con forma de red, cuyo componente prin-

cipal son fibras de cromatina descondensada, que forman complejos con los cinco tipos de histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4) y se encuentran decoradas por una variedad de proteínas con actividad citotóxica que permiten el atrapamiento y eliminación de patógenos⁽⁴⁾. La formación de NETs que ocurre por la activación de algunos neutrófilos es el resultado de un programa de muerte celular, distinto de la apoptosis y la necrosis, denominado NETosis. Durante la NETosis, se produce la disolución de la membrana nuclear y de las membranas granulares permitiendo que el contenido granular antimicrobiano y la cromatina se mezclen, posibilitando, luego de la descondensación de la cromatina y la ruptura de la membrana plasmática, la liberación al espacio extracelular de proteínas granulares microbicidas (elastasa, mieloperoxidasa y defensina, entre otras) ancladas a una red de cromatina⁽⁴⁾. Molecularmente, la formación de NETs generalmente se inicia por la activación de la proteína quinasa C que conduce a la activación de la enzima NADPH oxidasa y a la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs) que promueven la translocación de la elastasa y la mieloperoxidasa citoplasmática al núcleo, donde clivan la H1 (nexo de los nucleosomas) permitiendo la descondensación de la cromatina. Este proceso también es facilitado por la activación simultánea de la enzima peptidil-arginina-deaminasa 4 (PAD4) que entra al núcleo y citrulina histonas⁽⁵⁾. Las NETs se expanden en el espacio extracelular 3-8 horas luego de la activación del neutrófilo. Esta formación lítica de NETs se conoce como NETosis suicida. Un mecanismo alternativo llamado NETosis no lítica o vital conduce a una liberación rápida de NETs (minutos post-estimulación), vía secreción de cromatina y contenido de los gránulos. Este fenómeno, genera NETs y citoplastos anucleados que fagocitan bacterias y es llevada a cabo por los primeros neutrófilos que llegan al sitio de infección⁽⁵⁾. Inicialmente se describió que la formación de NETs es gatillada por la exposición directa de bacterias, hongos y protozoos. Sin embargo, hoy sabemos que la NETosis puede ser inducida en respuesta a una variedad de estímulos proinflamatorios como peróxido de hidrógeno, lipopolisacárido bacteriano, citoquinas, la fracción C5 de complemento, anticuerpos o complejos Ag/Ac y por plaquetas activadas. Moléculas sintéticas, como el forbol miristato acetato (PMA) o ionóforos de calcio, son potentes

agonistas y han sido ampliamente utilizadas para evaluar la formación de NETs *in-vitro*⁽⁵⁾. Las vías de señalización involucradas en la formación de NETs varían acorde al estímulo inductor⁽⁵⁾.

Si bien la formación de NETs es un mecanismo importante de la respuesta inmune innata del huésped en defensa frente a patógenos, la formación excesiva de NETs puede producir efectos deletéreos y, por ello, las NETs están involucradas en diferentes patologías inflamatorias no solamente infecciosas sino también estériles como lupus, vasculitis, cáncer, aterosclerosis y trombosis⁽⁵⁾. En este último contexto, la observación en modelos experimentales de biomarcadores de NETs en los trombos y plasma de monos y ratones sometidos a trombosis venosa profunda (TVP) reveló que las NETs son parte estructural del trombo^(6,7). La presencia de NETs como componentes de la matriz del trombo también ha sido observada en biopsias humanas de pacientes con TVP y con infarto de miocardio^(8,9). Mas aún, H3 citrulinada (H3cit) se detectó en microtrombos cerebrales en pacientes con accidente cerebrovascular⁽¹⁰⁾ y en pacientes sépticos, y se observó que el aumento en el riesgo de TEV correlacionaba más con la formación de NETs que con parámetros de inflamación o severidad de la enfermedad⁽¹¹⁾. De esta manera, estos datos en conjunto señalan que, a pesar de que la patogénesis de la trombosis arterial y venosa es muy diferente, la formación de NETs ocurre en ambas⁽¹²⁾. Exactamente cómo las NETs promueven la coagulación y la trombosis depende de las circunstancias en las cuales se forman. Los mayores constituyentes de las NETs, DNA, histonas y proteasas, tienen propiedades procoagulantes y protrombóticas. *In vitro*, los ácidos nucleicos extracelulares aumentan la actividad proteasa de los factores de coagulación e inducen la generación de trombina en forma dependiente e independiente de las plaquetas⁽¹³⁾. Todas las histonas de manera individual o en conjunto directamente inducen en plaquetas: adhesión, exposición de fosfatidilserina, la unión de fibrinógeno, agregación, liberación de factor von Willebrand (FVW) y la expresión de P-selectina, que promueve la formación de agregados mixtos plaqueta-neutrófilo⁽¹⁴⁾. Además, la H4 es citotóxica hacia las células endoteliales e inhibe la anticoagulación del plasma impidiendo la acción de la trombomodulina^(15,16). En modelos experimentales en ratones, se observó que las NETs unen no solamente el factor tisular y

el FXII gatillando la activación de la vía extrínseca de coagulación, sino también el FVW e inducen el reclutamiento de plaquetas y glóbulos rojos⁽⁶⁾. Las serino proteasas de las NETs, como la elastasa, clivan y oxidan anticoagulantes incluyendo el inhibidor de la vía del factor tisular aumentando la coagulación y la deposición de fibrina⁽⁶⁾. Por lo tanto, de diferentes maneras, la liberación de NETs en el compartimiento vascular gatilla un estado procoagulante y promueve la unión y activación de plaquetas que, en conjunto, conducen a la aparición del evento trombótico. A su vez, las plaquetas activadas aumentan la formación de NETs a través de la liberación de TXA2 que induce la liberación de PF4 y de VWF^(17,18). De esta manera, la formación de NETs intravasculares genera un diálogo cruzado entre los neutrófilos, las plaquetas y el endotelio que, a través de un proceso de retroalimentación positiva, promueve la formación de microtrombos y la eliminación de patógenos. Esta interacción entre las plaquetas y los neutrófilos ha llevado al grupo de Massberg a acuñar un nuevo concepto denominado inmunotrombosis, el cual implica una respuesta del sistema inmune innato que involucra la formación de trombos a nivel de los capilares sanguíneos y la participación del sistema inmune y de proteínas específicas de la coagulación. La inmunotrombosis favorece el reconocimiento, confinamiento y destrucción de un amplio abanico de patógenos⁽¹⁹⁾. Sin embargo, como se ha mencionado previamente, el desarrollo no controlado de este proceso durante la sepsis o en condiciones inflamatorias estériles puede dar lugar a la patología trombótica⁽¹⁹⁾.

¿Pueden ser las NETs inductores de trombosis en pacientes con cáncer?

Los neutrófilos constituyen un porcentaje significativo del infiltrado inflamatorio en varios modelos murinos de cáncer y también en tumores humanos. Sin embargo hay puntos de vista dicotómicos respecto a su rol en cáncer, porque parecería ser que pueden causar crecimiento del tumor, así como la eliminación del mismo⁽²⁰⁾. Llamativamente, en los últimos 5 años hay evidencias crecientes de la formación de NETs en cáncer⁽²¹⁾. Cabe destacar que niveles altos de ADN en plasma en pacientes con cáncer fueron descritos hace más de 30 años⁽²²⁾. Desde entonces, un aumento en el ADN plasmático o sérico se ha observado en muchos tipos diferentes de cáncer⁽²²⁾.

Durante mucho tiempo se pensó que el ADN era liberado del tumor o del tejido lesionado por células muertas por apoptosis o necrosis. Sin embargo, la identificación de NETs en cáncer, así como en otras enfermedades inflamatorias, proporciona ahora otra explicación para los niveles elevados de ADN plasmático.

Interesantemente, tanto el aumento de neutrófilos circulantes o intratumorales como una alta relación neutrófilo/linfocitos están asociados a un pronóstico y evolución pobre en diferentes tipos de cáncer. Esta elevación en los neutrófilos se observa principalmente en melanoma, carcinoma hepatocelular, glioblastomas, cáncer gástrico, colorrectal, esofágico, pulmonar y ovárico, la mayoría de los cuales están asociados con un alto riesgo de TEV^(23,24). Estas observaciones, junto con el descubrimiento de las NETs, llevaron a que varios grupos comenzaran a investigar la formación de NETs como otro de los mecanismos patogénicos que gatillan trombosis en pacientes con cáncer.

La primera descripción de la formación de trombosis en cáncer mediada por NETs fue publicada en 2012⁽²⁵⁾. Se demostró que los neutrófilos de un ratón portador de tumor eran más susceptibles a formar NETs que los neutrófilos de ratones normales, y que las NETs en los ratones portadores de tumor estaban asociadas con la formación de trombos en los pulmones. Estudios posteriores en pacientes con microangiopatía trombótica asociada a tumores, mostraron altos niveles plasmáticos de DNA que correlacionaban positivamente con marcadores de NETs, como mieloperoxidasa, así como también altos niveles de H3cit⁽²⁶⁾. Interesantemente, se ha reportado que pacientes con accidente cerebrovascular isquémico y con niveles elevados de troponina, tenían una alta prevalencia de cáncer, la mitad de los cuales fueron diagnosticados post-mortem. Las autopsias de estos pacientes, revelaron no solamente microtrombosis cerebral, pulmonar y miocárdica con H3cit en los trombos, sino también niveles plasmáticos elevados de H3cit que correlacionaban con los complejos trombina-antitrombina y P-selectina soluble, estableciendo así un nexo entre NETosis y un estado protrombótico⁽²⁷⁾.

Recientemente, en un modelo murino de cáncer de mama, se observó que exosomas derivados del tumor junto con niveles aumentados de G-CSF inducen la formación de NETs y aceleran la formación

de trombosis venosa. Si bien los estímulos que gatillan la formación de NETs en pacientes con cáncer aún están muy poco estudiados, estos hallazgos sugieren que habría una cooperación entre los exosomas tumorales y los neutrófilos en el desarrollo de trombosis asociada a cáncer⁽²⁸⁾.

Además de los factores de riesgo protrombóticos asociados con la presencia de un tumor, el tratamiento quimioterápico puede aumentar el riesgo unas 6.5 veces, especialmente en pacientes con cáncer de mama⁽²⁹⁾. Sin embargo, los mecanismos por el cual estas drogas aumentan el riesgo de trombosis aún no está caracterizado. Estudios recientes muestran que pacientes con cáncer de mama tienen niveles aumentados de DNA libre y de complejos trombina-antitrombina a las 24 hs post quimioterapia con doxorubicina y epirubicina. Además, ambas drogas inducen liberación de DNA de neutrófilos y este DNA es capaz de inducir la formación de trombina. Interesantemente, ambas respuestas son inhibidas por el agregado del antioxidante glutatión, que previene la generación de especies reactivas del oxígeno y, por ende, la formación de NETs⁽³⁰⁾. De esta manera, la liberación de DNA libre del tejido lesionado o de las células tumorales puede representar un mecanismo novedoso por el cual la trombosis es gatillada en pacientes con cáncer que reciben quimioterapia. Entender los mecanismos a través de los cuales las drogas quimioterapéuticas modifican el riesgo trombótico podría llevar a un mejor control de los pacientes con riesgo y a estrategias profilácticas más seguras.

Contrariamente a estos estudios, el grupo de Albadawi mostró en un estudio prospectivo de un solo centro que, si bien las muestras de plasma de los pacientes con cáncer presentaban niveles más altos de nucleosomas, DNA libre y la presencia de NETs en el tejido tumoral del hígado y pulmón comparado con el grupo control, los niveles de NETs no correlacionaron con los niveles de los complejos TAT o prevalencia de trombosis venosa⁽³¹⁾. De esta manera resulta claro que, si bien las evidencias de la investigación básica y de modelos experimentales sustentan un potencial rol de las NETs como otro factor de riesgo en pacientes con cáncer, establecer si la determinación de sus niveles plasmáticos resulta un biomarcador para el pronóstico y evolución de los pacientes así como si una terapéutica dirigida contra la NETosis sería beneficiosa para disminuir el riesgo

trombótico, es un área de activa investigación que aún requiere mayor cantidad de estudios para confirmar esta atractiva hipótesis.

Declaración de conflictos de interés

La autora declara que no posee conflictos de interés.

Bibliografía

1. Sheth RA, Niekamp A, Quencer KB et al. Thrombosis in cancer patients: etiology, incidence, and management. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2017;7(S3):S178-S185.
2. Hisada Y, Mackman N. Cancer-associated pathways and biomarkers of venous thrombosis. *Blood.* 2017;130(13):1499-1506.
3. Demers M, Wagner DD. NETosis: a new factor in tumor progression and cancer-associated thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2014;40(3):277-83.
4. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-1535.
5. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 2017;18(2):134-147.
6. Massberg S, Grahl L, von Bruehl M-L et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med.* 2010;16(8):887-96.
7. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost.* 2012;10(1):136-144.
8. Savchenko AS, Martinod K, Seidman MA et al. Neutrophil extracellular traps form predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development. *J Thromb Haemost.* 2014;12(6):860-70.
9. Maugeri N, Campana L, Gavina M et al. Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J Thromb Haemost.* 2014;12(12):2074-2088.
10. Laridan E, Denorme F, Desender L et al. Neutrophil extracellular traps in ischemic stroke thrombi. *Ann Neurol.* 2017;82(2):223-232.
11. Yang S, Qi H, Kan K et al. Neutrophil Extracellular Traps Promote Hypercoagulability in Patients With Sepsis. *Shock.* 2017;47(2):132-139.
12. Carestia A, Kaufman T, Schattner M. Platelets: New Bricks in the Building of Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol.* 2016;7:271.
13. Semeraro F, Ammollo CT, Morrissey JH et al. Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood.* 2011;118(7):1952-61.
14. Carestia A, Rivadeneyra L, Romaniuk MA et al. Functional responses and molecular mechanisms involved in histone-mediated platelet activation. *Thromb Haemost.* 2013;110(5):1035-45.

15. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One*. 2012;7(2):e32366.
16. Kowalska MA, Zhao G, Zhai L et al. Modulation of Protein C Activation by Histones, Platelet Factor 4, and Heparinoids: New Insights Into Activated Protein C Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(1):120-126.
17. Carestia A, Kaufman T, Rivadeneyra L 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.
18. Clark SR, Ma AC, Tavener SA et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 2007;13(4):463-469.
19. Gaertner F, Massberg S. Blood coagulation in immunothrombosis-At the frontline of intravascular immunity. *Semin Immunol*. 2016;28(6):561-569.
20. Brandau S, Dumitru CA, Lang S. Protumor and antitumor functions of neutrophil granulocytes. *Semin Immunopathol*. 2013;35(2):163-76.
21. Erpenbeck L, Schön MP. Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression? *Oncogene*. 2017;36(18):2483-2490.
22. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer-a survey. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1775(1):181-232.
23. Paneesha S, McManus A, Arya R et al. 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(2):338-43.
24. Blix K, Jensvoll H, Brækkan SK, Hansen J-B. White Blood Cell Count Measured Prior to Cancer Development Is Associated with Future Risk of Venous Thromboembolism - The Tromsø Study. *PLoS One*. 2013;8(9):e73447.
25. Demers M, Krause DS, Schatzberg D et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(32):13076-81.
26. Fuchs TA, Kremer Hovinga JA, Schatzberg D, Wagner DD, Lämle B. Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood*. 2012;120(6):1157-64.
27. Thålin C, Demers M, Blomgren B et al. NETosis promotes cancer-associated arterial microthrombosis presenting as ischemic stroke with troponin elevation. *Thromb Res*. 2016;139:56-64.
28. Leal AC, Mizurini DM, Gomes T et al. Tumor-Derived Exosomes Induce the Formation of Neutrophil Extracellular Traps: Implications For The Establishment of Cancer-Associated Thrombosis. *Sci Rep*. 2017;7(1):6438.
29. Oppelt P, Betbadal A, Nayak L. Approach to chemotherapy-associated thrombosis. *Vasc Med*. 2015;20(2):153-61.
30. Swystun LL, Mukherjee S, Liaw PC. Breast cancer chemotherapy induces the release of cell-free DNA, a novel procoagulant stimulus. *J Thromb Haemost*. 2011;9(11):2313-21.
31. Oklu R, Sheth RA, Wong KHK, Jahromi AH, Albadawi H. Neutrophil extracellular traps are increased in cancer patients but does not associate with venous thrombosis. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2017;7(S3):S140-S149.