



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TRAMPAS EXTRACELULARES INVOLUCRADAS EN MECANISMOS DEL SISTEMA

INMUNE EN INVERTEBRADOS.

Trabajo Monográfico de Actualización

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ALICIA ABIGAÍL CUBILLO MARTÍNEZ



CDMX, AÑO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: ORTEGA MUÑOZ RAQUEL

VOCAL: Profesor: LOPEZ MACIAS CONSTANTINO III ROBERTO

SECRETARIO: Profesor: SANCHEZ SALGADO JOSE LUIS

1er. SUPLENTE: Profesor: GAVILANES RUIZ MARINA

2º SUPLENTE: Profesor: BERRON RUIZ LAURA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

ASESOR DEL TEMA:

JOSE LUIS SANCHEZ SALGADO

SUSTENTANTE (S):

ALICIA ABIGAIL CUBILLO MARTINEZ

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio 6 de Inmunología del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. José Luis Sánchez Salgado y Dr. Mohamed Ali Pereyra Morales, con el apoyo de los proyectos PAPIIT de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM IN203821 e IN202422.

Tabla de contenido

Portada	1
I. Introducción y antecedentes.....	5
II. Hipótesis.....	7
III. Objetivo principal.....	7
IV. Objetivos particulares	7
V. Sistema inmune en invertebrados	8
1.1 Receptores de reconocimiento de patógenos en invertebrados.....	8
1.2 Mecanismos inmunes humorales en invertebrados.....	9
1.3 Mecanismos inmunes celulares en invertebrados.....	11
<u>1.4 Trampas extracelulares en invertebrados (ETs).</u>	13
2.1 Moléculas que activan a formación de ETs.....	13
2.2 Participación de PRRs en la formación de ETs.....	18
2.3 Mecanismos intracelulares en la formación de ETs.....	20
2.3.1 Vía de señalización dependiente de NADPH.....	20
2.3.2 Vía de señalización independiente de NADPH.....	22
2.4 Proteínas involucradas en la estructura de ETs	24
2.5 ETs y los mecanismos de defensa de invertebrados.....	27
VI. Discusión	32
VII. Conclusión.....	38
VIII. Bibliografía.....	39

I. Introducción y antecedentes

El estudio de la inmunología comparada aporta información sobre la evolución del sistema inmunológico; actualmente se utilizan distintos modelos para entender los mecanismos que participan en presencia de diferentes patógenos (Cooper, 2003; Little et al., 2021). Una forma de estudiar la evolución del sistema inmune es clasificando los componentes que se conservan de aquellos que han cambiado (Flajnik, 2018). Diferentes estudios consideran que el sistema inmune de invertebrados es precursor de la respuesta inmunológica en vertebrados (Medzhitov & Janeway, 1998; Neumann et al., 2020). Se ha demostrado que especies filogenéticamente distantes como los mamíferos, peces, camarones, moluscos y ostras, comparten mecanismos inmunológicos (Poirier et al., 2014b). En mamíferos, el sistema inmune está compuesto por una respuesta innata y una respuesta adaptativa, la respuesta innata posee un espectro amplio de reconocimiento y se activa de manera inmediata en presencia de microorganismos, posteriormente si la respuesta innata no fue suficiente para controlar los patógenos, se activa la respuesta adaptativa, la cual presenta mecanismos para aumentar la diversidad de reconocimiento y generar memoria (Schulenburg et al., 2004). La respuesta inmune innata cuenta con una gran variedad de receptores de reconocimiento de patrones

(PRRs) con la capacidad de reconocer un amplio repertorio de patrones moleculares asociados a patógenos (Sánchez-Salgado et al., 2020)(Robb et al., 2014). De igual manera, se han identificado mecanismos como la fagocitosis, la encapsulación, el sistema de la coagulación y los péptidos antimicrobianos que participan en la eliminación de microorganismos (Nascimento et al., 2018). Una de las principales células efectoras en el sistema inmune innato de humanos son los neutrófilos; en 2004 se observó que estas células producen trampas extracelulares (NETs) capaces de capturar y eliminar patógenos (Brinkmann, 2004). Las NETs están compuestas por una red de DNA asociada a múltiples proteínas nucleares y granulares como: histonas, elastasa, mieloperoxidasa, lactotransferrina, catepsina G, defensinas entre otras moléculas (Goldmann & Medina, 2013). Estudios posteriores demostraron que las trampas extracelulares no son producidas solo por neutrófilos, también son liberadas por eosinófilos y macrófagos (Goldmann & Medina, 2013; Ueki et al., 2016). Recientemente, se ha identificado la formación de trampas extracelulares (ETs) en organismos invertebrados participando como un mecanismo inmune celular que puede ser desencadenado por diferentes tipos de patógenos. En el presente trabajo de revisión, se realizó una identificación de estímulos, receptores de reconocimiento a patógenos, vías de señalización y proteínas que participan en la formación de trampas extracelulares, así como

la posible asociación con otros mecanismos inmunológicos involucrados en la eliminación de patógenos.

II. Hipótesis

- La organización y actualización de la información sobre las trampas extracelulares en invertebrados proporcionará información relevante que permitirá ampliar el panorama sobre futuras áreas de investigación.

III. Objetivo principal

- Realizar una búsqueda bibliográfica sobre las trampas extracelulares en invertebrados y su participación en la respuesta inmunológica.

IV. Objetivos particulares

- Identificar PRRs que participan en la activación de las trampas extracelulares en invertebrados.
- Determinar estimulantes que activan la formación de trampas extracelulares en invertebrados.
- Identificar mecanismos intracelulares y proteínas involucradas en la formación de trampas extracelulares.
- Establecer la asociación entre las trampas extracelulares y otros mecanismos de la respuesta inmune en invertebrados.

V. Sistema inmune en invertebrados

El sistema inmune innato es el principal mecanismo de defensa que poseen los invertebrados, este sistema se ha identificado hace alrededor de 500 millones de años dentro de la escala evolutiva (Palmieri et al., 2021). Diferentes estudios sugieren que el sistema inmune de invertebrados podría ser el precursor de la inmunidad en vertebrados; está constituido por diversos mecanismos celulares y humorales que son capaces de identificar y eliminar patógenos (Hernández-Gurrola et al., 2020; Max-Aguilar et al., 2021)(Gerardo et al., 2020). La primera línea de defensa está compuesta por barreras físicas que restringe la entrada de microorganismos, como es la cutícula en nematodos y artrópodos (Gerardo et al., 2020). Si el microorganismo logra atravesar la barrera, los invertebrados poseen receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y activan mecanismos celulares realizados principalmente por los hemocitos, células circundantes en los invertebrados (Huang & Ren, 2021)(Buchmann, 2014).

1.1 Receptores de reconocimiento de patógenos en invertebrados.

Los PRRs en invertebrados presentan diferentes dominios y especificidades, los receptores tipo Toll (TLRs) es una de las familias más importantes, se ha identificado su participación en infecciones virales y bacterianas (Liu et al., 2021; Wu et al., 2021). Los TLRs de invertebrados realizan el reconocimiento de PAMPs de manera indirecta mediante la participación de moléculas solubles

(Buckley & Rast, 2012). Los TLRs desencadenan la producción de diferentes péptidos antimicrobianos (AMPs) así como la activación de diferentes mecanismos celulares (H. Liu et al., 2021).

Otros PRRs en invertebrados son los receptores Scavengers; en el gusano de seda, *Bombyx mori*, se comprobó que el receptor scavenger C se une a diferentes bacterias gram positivas, generando un aumento en la expresión de AMPs (K. Zhang et al., 2021). En recientes estudios se ha identificado que apolipoproteína I-III (apoLp-I-III), proteínas componentes de lipoproteínas, actúan como PRRs, en *B. mori*, apoLp-I fue capaz de identificar *Staphylococcus aureus* e inhibió la expresión del gen hemolisina (Omae et al., 2013; Wang et al., 2019).

Otra familia de PRRs de gran importancia son las lectinas, se puede subdividir en lectinas de tipo-C, proteínas relacionadas a fibrinógeno, lectinas tipo-L, lectinas de unión a manosa, galactinas, entre otras, demostrando una amplia gama de especificidad por carbohidratos y activando mecanismos celulares y humorales (Sánchez-Salgado et al., 2021).

1.2 Mecanismos inmunes humorales en invertebrados.

La respuesta inmune humoral está compuesta por varias familias de proteínas como: lectinas, AMPs, el sistema prophenoloxidasa (proPO) y de la coagulación (Melillo et al., 2018). En invertebrados existen varias familias de AMPs que son

almacenadas en los gránulos de los hemocitos, diferentes estímulos generan la secreción de estas proteínas con actividad antimicrobica contra bacterias Gram (+), Gram (-) y hongos (Hillyer, 2016a)(Li et al., 2019). Las principales familias de AMPs identificadas en camarones son las pertenecientes a las crustinas, factores anti-lipopolisacáridos (ALFs) y stilicinas; estas moléculas tienen la capacidad de generar lisis celular (Tassanakajon et al., 2018).

El Sistema proPO es uno de los principales mecanismos de la respuesta humoral en invertebrados (Homa et al., 2016). Las proteínas de unión de lipopolisacáridos y β -1,3-glucanos son las responsables de desencadenar las enzimas activadoras de proPO (PPAEs) que son almacenadas en los gránulos de los hemocitos, las PPAEs generan fenoloxidasas que a su vez inician la producción de quinonas y melanina, promoviendo la eliminación de los patógenos (Cerenius et al., 2008b; Prochazkova et al., 2019; Touffeeq et al., 2019).

El sistema de coagulación puede ser desencadenado mediante LPS o β -1,3-glucanos presentes en patógenos, se genera la formación de una estructura tipo gel que es originada por el cambio de coagulógeno a coagulina que a su vez se unen para formar homopolímeros (Hanington & Zhang, 2011; Osaki & Kawabata, 2004). En crustáceos, la polimerización de la proteína de coagulación plasmática es regulada por transglutaminasas (TGases)

dependientes de calcio (Perdomo-Morales et al., 2019). En este mecanismo ayuda a la inmovilización de patógenos y también previene la pérdida de hemolinfa (Hanington & Zhang, 2011).

Otro componente principal en los mecanismos humorales son las lectinas; en los crustáceos, las lectinas séricas muestran la capacidad de inducir especies reactivas del oxígeno (ROS) en hemocitos; en investigaciones recientes, se demostró que la lectina sérica CqL activa la producción de ROS mediante cinasas inducidas por su receptor CqLR que encuentra en hemocitos granulares (Alpuche et al., 2009; Sánchez-Salgado et al., 2018; Sierra et al., 2005). Otros factores séricos, como la peroxinectina, se han identificado en invertebrados, es almacenada en los gránulos de hemocitos y son liberados durante el proceso de degranulación (Cai et al., 2020). La actividad de peroxinectina puede estar relacionada con el sistema proPO y respuesta anti bactericida (Cerenius et al., 2008a)(Dong et al., 2011).

1.3 Mecanismos inmunes celulares en invertebrados.

Los hemocitos son los principales responsables de los mecanismos celulares de la respuesta inmune, se han estudiado en diferentes organismos (Smith, 2016). Actualmente, se han clasificado basándose en su composición granular, tamaño celular y el radio de su núcleo, los hemocitos hialinos no presentan gránulos en el citoplasma y se han identificado con una participación en el proceso de la

fagocitosis; los hemocitos granulares contienen abundantes gránulos en el citoplasma y se relacionan con el sistema proPO, melanización y actividad antimicrobiana; los hemocitos semi granulares posee pocos gránulos de diferente tamaño y participan principalmente en los procesos de encapsulación y melanización (S. Liu et al., 2020) (Sánchez-Salgado et al., 2021).

Los hemocitos realizan tres principales mecanismos inmunológicos: encapsulación, nodulación y fagocitosis (Jeyachandran et al., 2020). La fagocitosis es un proceso con diferentes fases que responde a lesiones o infecciones (Cerenius & Söderhäll, 2018). Este proceso inicia mediante el reconocimiento de patógenos a través de PRRs; en crustáceos, los principales receptores que desencadenan la fagocitosis son: DSCAMs, lectinas de tipo C y TLRs (Sirikharin et al., 2020). Se internaliza al microorganismo mediante la formación del endosoma y posterior maduración hacia el fagolisosoma donde participan mecanismos dependientes e independientes de oxígeno que colaboran en la eliminación del patógeno (Johansson et al., 2000).

En el mecanismo de la nodulación se forma una agregación de hemocitos alrededor del patógeno, limitando su movilidad y disminuyendo la concentración de oxígeno; posteriormente, se activan diferentes mecanismos humorales como el sistema de la proPO y la liberación de AMPs dentro del nódulo que colaboran en la destrucción de los agentes infecciosos (Dubovskiy

et al., 2016; Hillyer, 2016b). Recientemente, la formación de trampas extracelulares (ETs) se ha descrito en invertebrados y se ha asociado su participación como un mecanismo celular de respuesta contra patógenos.

1.4 Trampas extracelulares en invertebrados (ETs).
La primera descripción de trampas extracelulares fue realizada en humanos, se observó que los neutrófilos generaban este mecanismo y se nombró NETs (Brinkmann, 2004). Estas trampas están formadas principalmente por fibras de DNA asociadas a proteínas granulares y nucleares, cuyo propósito es atrapar y eliminar a los patógenos (Brinkmann, 2004). Los primeros dos reportes en invertebrados relacionados con trampas extracelulares (ETs) fueron realizados en la polilla de cera *Galleria mellonella* y camarón *Litopenaeus vannamei*, se observó la participación de ácidos nucleicos extracelulares en la respuesta inmune, estas estructuras se describieron como moléculas de DNA con dominios globulares asociadas a elongamiento de fibras lisas, posteriormente fueron caracterizados como histonas (Ng et al., 2013)(Ng et al., 2015)(Altincicek et al., 2008). Posterior de estos reportes, la información sobre ETs en invertebrados ha ido en aumento y se ha intensificado la búsqueda de su papel en la respuesta inmune de los invertebrados hacia patógenos.

2.1 Moléculas que activan a formación de ETs.
Se han identificado diferentes estímulos para la formación de ETs en invertebrados. Se ha reportado que patógenos como: bacterias, virus, hongos

tienen la capacidad de generar esta respuesta. Además, estímulos químicos como: luz ultravioleta, ionóforos, acetato de forbol-miristato (PMA), peróxido de hidrógeno, entre otros pueden estar involucrados en la formación de ETs (Bornhöfft & Galuska, 2019; Romero et al., 2020)(Tabla 1.).

Tabla 1. Estímulos inductores de trampas extracelulares en invertebrados.

Organismo (Clase)	Estímulo	Referencia
<i>Mnemiopsis leidyi</i> (Tentaculata)	<i>Staphylococcus aureus</i>	(L. Vandepas et al., 2020a)
	LPS	
	Nigericina (Ionoforo)	
	<i>E. coli</i>	
<i>Dictyostelium discoideum</i> (Dictyostelia)	Zymosan	(X. Zhang et al., 2016)
	LPS de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Limax maximus</i> (Gastropoda)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Lange et al., 2017)
	<i>Angiostrongylus vasorum</i>	
	<i>Aelurostrongylus abstrusus</i>	
<i>Achatina fulica</i> (Gastropoda)	<i>Troglostrongylus brevior</i>	(Lange et al., 2017)
	<i>Angiostrongylus vasorum</i>	
<i>Arion lusitanicus</i> (Gastropoda)	<i>Aelurostrongylus abstrusus</i>	(Lange et al., 2017)
<i>Lymnaea stagnalis</i> (Gastropoda)	LPS	(Skála et al., 2018)
	<i>S. saprophyticus</i>	
	<i>T. regenti</i> helminto	
<i>Radix lagotis</i> (Gastropoda)	PMA	(Skála et al., 2018)
<i>Planorbarius corneus</i> (Gastropoda)	LPS	(Skála et al., 2018)
<i>Crassostrea gigas</i> (Bivalvia)	<i>Vibrio tasmaniensis</i>	(Poirier et al., 2014a)
	<i>Brevibacterium stationis</i>	
	Zymosan	
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (Bivalvia)	LPS <i>E. coli</i>	(Romero et al., 2020)
	ZymA de <i>S. cerevisiae</i>	
	<i>E. coli</i>	

	A23187 (Ionóforo)	
	Luz UV	
	Zymosan	
<i>Ruditapes philippinarum</i> (Bivalvia)	<i>Vibrio anguillarum</i> <i>Vibrio harveyi</i> <i>E. coli</i> <i>Micrococcus luteus</i>	(Han, Chen, et al., 2021; Han, Zhang, et al., 2021a)
	PMA	
	<i>E. coli</i>	
<i>Eisenia Andrei</i> (Clitellata)	LPS Zymosan de <i>S. cerevisiae</i> Peróxido de hidrógeno	(Homa et al., 2016)
	PMA	
<i>Litopenaeus vannamei</i> (Malacostraca)	<i>E. coli</i> LPS	(Ng et al., 2013, 2015)
	PMA + <i>Listonella anguillarum</i> vivo	
<i>Carcinus maenas</i> (Malacostraca)	LPS de <i>E. coli</i>	(Robb et al., 2014)
	PMA	
	LPS de <i>E. coli</i> <i>E. coli</i>	
<i>Marsupenaeus japonicus</i> (Malacostraca)	PGN de <i>Bifidobacterium thermophilum</i>	(Koiwai et al., 2016)
	LPS de <i>E. coli</i> deslipidado-LPS <i>E. coli</i> <i>E. coli</i>	
<i>Peirplaneta americana</i> (Insecta)		(Nascimento et al., 2018)
	Jbtx	
	LPS <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	
<i>Rhodnius prolixus</i> (Insecta)	Jbtx + <i>S. aureus</i>	(Coste Grahl et al., 2020)
	Bacteria <i>P. luminescens</i>	
<i>Galleria mellonella</i> (Insecta)	RNA DNA	(Altincicek et al., 2008)

LPS-lipopolisacárido, *E. coli*- *Escherichia coli*, PMA- acetato forbol mirístico, PGN-peptidoglucano, Jbtx- Jaburetox,

DNA- ácido desoxirribonucleico, ARN- ácido ribonucleico.

En el ctenóforo *Mnemiopsis leidyi* se observó la producción de ETs por células inmunitarias cuando se exponen a la bacteria *S. aureus*, LPS y Zymosan (L.

Vandepas et al., 2020a). En la amebozoa *Dictyostelium discoideum*, se observó la producción de ETs por las células centinela en presencia de LPS de *Klebsiella pneumoniae* (X. Zhang & Soldati, 2016).

Se obtuvieron hemocitos de las babosas *Arion lusitanicus*, *Limax maximus* y el caracol *Achatina fulica* y se estimularon con larvas patogénicas de *Angiostrongylus vasorum*, *Aelurostrongylus abstrusus* y *Troglostrongylus brevior*; los hemocitos liberaron estructuras similares a ETs en presencia de estos parásitos (Lange et al., 2017). Interesantemente, en hemocitos de caracoles *Lymnaea stagnalis*, *Radix lagotis* y *Planorbarius corneus* se probaron varios estímulos y rara vez se observaron ETs, los hemocitos produjeron bajo número de fibras de ADN extracelular, lo que sugiere que este proceso celular juega un papel marginal como mecanismo de defensa (Skála et al., 2018).

En los hemocitos del molusco *Crassostrea gigas*, se indujo la formación de ETs en presencia de diferentes bacterias como *Brevibacterium stationis* y *Vibrio tasmaniensis* (Poirier et al., 2014a). En el molusco *Mytilus galloprovincialis*, la formación de ETs fue inducida con Zymosan proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* y con la bacteria *E. coli*; además, se reportó que la luz ultravioleta indujo rápidamente la liberación de ETs (Romero et al., 2020). En el molusco *Ruditapes philippinarum* se demostró la formación de ETs en la presencia de

bacterias Gram (+), Gram (-) y con Zymosan (Han, Zhang, et al., 2021c)(Han, Chen, et al., 2021).

En anélidos, se comprobó la presencia de ETs en coelomocitos (células del sistema inmune) de la lombriz *Eisenia andrei* induciendo su formación con LPS, Zymosan, bacterias vivas *Xenorhabdus bovienii* y *Micrococcus luteus*; por otro lado, el peróxido de hidrógeno que se genera durante el estallido respiratorio también estimula la formación de ETs, demostrando la participación de ROS en este mecanismo (Homa et al., 2016).

En decápodos, las ETs formadas por hemocitos del camarón *L. vannamei* fueron inducidas en presencia de LPS de *E. coli*, así como la bacteria completa, también los hemocitos fueron expuestos al virus causante del síndrome de la mancha blanca (WSSV) y no observó la generación de ETs, esto sugiere que las partículas virales podrían no tener relación con este mecanismo celular (Ng et al., 2013). Las células hialinas provenientes del cangrejo *Carcinus maenas*, liberan cromatina como respuesta al estímulo de LPS y la bacteria viva *Listonella anguillarum* (Robb et al., 2014). Los hemocitos del camarón *Marsupenaeus japonicus* fueron estimulados con peptidoglicanos (PGN), LPS y *E. coli*, estos estímulos generaron ETs (Koiwai et al., 2016).

En insectos, se observó que en los hemocitos de cucaracha *Periplaneta americana* estimulados con d-LPS (LPS sin cadena A lipídica) indujo la liberación de ETs de manera dosis dependiente, sin embargo, LPS induce ETs solo en la concentración más alta que se utilizó, esto sugiere la presencia de un factor en la hemolinfa que obstaculice la liberación de ETs vía LPS (Nascimento et al., 2018).

Se ha probado la combinación de diferentes estímulos como precursores de ETs; el insecto *Rhodnius prolixus* fue retado con ácidos nucleicos extracelulares y/o entomotoxina Jaburetox (Jbtx), se identificó que existía una inmuno compensación de los efectos causados por la toxina sobre las defensas de los insectos ante el desafío de una bacteria patógena, se observó un papel protector de los ácidos nucleicos extracelulares en la respuesta inmune (Coste Grahl et al., 2020). Se demostró que en la polilla *Galleria mellonella*, en presencia de ácidos nucleicos propios en combinación con bacterias aumentan la respuesta de las trampas extracelulares (Altincicek et al., 2008).

2.2 Participación de PRRs en la formación de ETs.

En vertebrados, los PRRs que participan en la formación de NETs incluye receptores asociados a membrana como: TLRs, Receptores de lectina tipo C (CLRs) (T. Chen et al., 2021). La interacción lectina-carbohidrato desempeña un papel importante en la modulación de NETs. La Dectina 2 reconoce manano

en la pared celular de patógenos y conduce a la liberación de NETs (Loures et al., 2015). La proteína D surfactante (SP-D), una colectina soluble, se une a las bacterias y promueve la captura por NETs (Douda et al., 2011) La lectina tipo C miembro 5A (CLEC5A) participa en la producción de ROS y recientemente se ha demostrado su participación en la NETosis (Chen et al., 2017; Sung & Hsieh, 2021). Sin embargo, algunas otras lectinas parecen regular la formación de NETs, la deficiencia de Dectina 1 condujo a una liberación exacerbada de NETs, generando daño tisular durante la infección (Branzk et al., 2015). En la actualidad, no se ha explicado completamente cuál es la participación de las lectinas en la formación de NETs, siendo necesario esclarecer cual es el papel del reconocimiento de carbohidratos en este proceso.

En contraste, la información sobre la participación de PRRs en la formación de ETs en invertebrados es limitada. El único reporte descrito hasta la fecha se ha realizado en la amiba *Dictyostelium discoideum*, donde se identificó la participación del dominio de receptor Toll/interleucina-1 (TIR); el dominio TIR fue identificado como señal de traducción en presencia de LPS, lo que promueve la formación de ROS, y finalmente ETs; al eliminar los genes relacionados con el dominio TIR, la capacidad de eliminación de patógenos se vio disminuida, lo que sugiere su participación como un mecanismo de inmunidad de la célula de invertebrados (X. Zhang et al., 2016). Las lectinas son la familia de PRRs más

estudiada en invertebrados, estos receptores participan en la activación de múltiples respuestas celulares, por lo cual, es necesario identificar la participación de lectinas en la formación de ETs, ya que no existen reportes sobre su participación en este mecanismo.

2.3 Mecanismos intracelulares en la formación de ETs.

En vertebrados, la identificación de PAMPs y/o patrones moleculares asociados a patógenos (DAMPs) desencadena principalmente dos vías de señalización que lleva a la formación de NETs, estas vías son dependientes o independientes de la NADPH-oxidasa (Poirier et al., 2014b) (Papayannopoulos, 2018). A continuación, se menciona las características identificadas de estas vías de señalización en ETs de invertebrados (Tabla 2).

2.3.1 Vía de señalización dependiente de NADPH.

En vertebrados, la proteína cinasa C (PKC) conduce a la activación del complejo NADPH oxidasa generando ROS, que desencadena la activación y disociación del complejo que contiene MPO, lactoferrina, lisozimas y proteinasa 3, la MPO ayuda a disociar otro complejo molecular formado por elastasa, catepsina G y azurocidina, esto permite la translocación de la elastasa del citosol al núcleo (Metzler et al., 2014; Papayannopoulos, 2018). La elastasa colabora en la descondensación del ADN y su posterior expulsión de la célula; este mecanismo se denomina NETosis suicida ya que conduce a la ruptura de la membrana y la

muerte celular (Hakkim et al., 2011)(Parker & Winterbourn, 2012)(Sollberger et al., 2018).

En invertebrados, la proteína PKC ha sido identificada en diferentes especies, en el ctenóforo o comúnmente conocida como medusa de peines, *M. leidyi* (Vandepas et al., 2020b), en la ostra *C. gigas* (Poirier et al., 2014a), en el gusano *E. andrei* (Homa et al., 2016), en el camarón *L. vannamei* (Ng et al., 2015) y *M. japonicus* (Koiwai et al., 2016). En presencia de acetato forbol mirístico (PMA), se ha confirmado la participación de PKC en la formación de ETs en invertebrados. También, en *L. vannamei* (Robb et al., 2014), se utilizó Ro-31-8220, un inhibidor de pan-proteína cinasa C, y se observó una disminución en la formación de ETs, esta información sugiere que PKC es relevante para realizar este proceso celular.

En diferentes modelos de estudio en invertebrados, la participación del complejo de NADPH-oxidasa se ha demostrado al utilizar cloruro de difenileniodonio (DPI), un inhibidor de NADPH oxidasa, en *C. gigas* (Poirier et al., 2014a), *M. galloprovincialis* (Romero et al., 2020), *R. philippinarum* (Han, Chen, et al., 2021), y el cangrejo *C. maenas* (Robb et al., 2014), la eliminación de la formación de ROS por DPI disminuyó la formación de ETs. En la ameba *D. discoideum*, la producción de ETs por parte de las células centinela requiere ROS generadas por NADPH oxidasa (X. Zhang et al., 2016).

La participación de otras moléculas ha sido estudiada en la almeja *R. philippinarum*, con la presencia de un inhibidor para fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) y la proteína cinasa regulada extracelular (ERK), se observó la disminución de ETs, demostrando que MEK / ERK son fundamentales en este proceso (Han, Chen, et al., 2021). En *M. leidy*, los resultados indicaron que la vía de la caspasa no está involucrada en la producción de ETs, sin embargo, en los vertebrados se ha observado que las caspasas llevan a la muerte de los neutrófilos por NETosis (Burgener & Schroder, 2020; Vandepas et al., 2020). Se necesitan más investigaciones para aclarar si esta vía se activa en presencia de otros estímulos y en otros organismos invertebrados.

2.3.2 Vía de señalización independiente de NADPH.
En vertebrados, se ha identificado una vía independiente de NADPH-oxidasa, la producción de ROS se genera por mecanismos mitocondriales (Douda et al., 2015). Se denomina NETosis vital debido a que después de liberar componentes internos como histonas, DNA, MPO, elastasa, entre otros; las células mantienen su capacidad fagocítica (Brinkmann, 2018). Este mecanismo está mediado por calcio en un canal de potasio (SK), la activación de la proteína arginina deiminasa 4 (PAD4) y la producción de ROS mitocondriales (Douda et al., 2015).

Recientemente en invertebrados, fue identificado esta vía de señalización en *M. leidyi*, en hemocitos de *M. galloprovincialis* y *E. andrei*, la generación de ETs se lleva cabo mediante la producción de ROS mitocondriales (Romero et al., 2020)(L. Vandepas et al., 2020a)(Homa et al., 2016) Además, en los hemocitos de la almeja *R. philippinarum*, la estimulación con Zymosan indujo un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial y en presencia de un inhibidor de ROS mitocondrial, se inhibió la formación de ETs (Han, Zhang, et al., 2021c).

La participación de otras moléculas relacionadas al metabolismo celular de invertebrados en la formación de ETs han sido estudiadas en los hemocitos de *R. philippinarum*, la estimulación con bacterias aumentó la actividad de piruvato cinasa (PK) y la hexocinasa (HK); además, una regulación positiva de HK, PK y transportador de glucosa (GLUT), lo que sugiere que el metabolismo podría estar involucrado en la producción de ETs (Han, Chen, et al., 2021).

Hasta el momento, no están esclarecidas por completo las vías de señalización intracelular que juegan un papel en la formación de ETs en invertebrados, se debe abordar la identificación de moléculas que participan en los mecanismos dependientes o independientes de NADPH-oxidasa; las vías de señalización son esenciales para comprender si existe una relación con otros mecanismos celulares en respuesta a las infecciones por patógenos.

2.4 Proteínas involucradas en la estructura de ETs

En vertebrados existen varias proteínas que caracterizan la estructura de las NETs, como: ADN, histonas, elastasa, MPO, lactotransferrina, catepsina G, defensinas, entre otras (Estúa-Acosta et al., 2019). En invertebrados, se han identificado varias de estas proteínas con las ETs (Tabla 2). Diferentes reportes han identificado que el ADN y las histonas son moléculas conformacionales de las trampas extracelulares, se han identificado diferentes histonas en invertebrados; en la ostra *C. gigas*, histonas H1 y H5 (Poirier et al., 2014a), en el camarón *L. vanammei*, histonas H2A y H1 (Robb et al., 2014)(Ng et al., 2015), en el gasterópodo *Limax maximus*, histonas H1, H2A / H2B, H3, H4 (Lange et al., 2017). En *M. leidy* también se identificaron histonas (Vandepas et al., 2020a). En coelomocitos de *E. andrei* y los hemocitos de la cucaracha *P. americana* se identificó histonas H3 relacionadas con las ETs (Homa et al., 2016; Nascimento et al., 2018)

La citrulinización de histonas es un proceso importante durante la NETosis (Fonseca et al., 2018). Este mecanismo inicia cuando se activa PAD4 y migra del citoplasma al núcleo para adicionar una molécula de citrulina en las histonas, promoviendo la descondensación de cromatina y formación de las NETs (de Bont et al., 2018).

Los coelomocitos de *E. andrei* presentan la capacidad de generar la citrulinación de histona H3 relacionado con el mecanismo de ETs, sin embargo, en presencia del inhibidor (Cl-amidina) de PAD4 se observó una disminución significativa de la liberación de ADN, lo que sugiere que esta molécula podría desempeñar un papel importante en las ETs; aún no es claro cómo actúa el proceso de citrulinización en los organismos invertebrados, hasta la fecha, no se ha descrito la importancia de las histonas citrulinadas en la formación de ETs (Homa et al., 2016). Se han encontrado varias histonas que participan en la estructura de las ETs; sin embargo, no está claro cuáles mecanismos participan en la reubicación de estas proteínas hacia el citosol e interactúan con otras proteínas que conducen a la formación de ETs.

Otras proteínas se han asociado con la estructura de las ETs. En el camarón *M. japonicus*, se ha observado la presencia de lisozima tipo C, que actúa como molécula antimicrobiana y colabora en la respuesta antimicrobiana de los ET (Koiwai et al., 2016). En los coelomocitos de *E. andrei*, se ha identificado la proteína de choque térmico 27 (HSP27) y la elastasa asociada a las ETs (Homa et al., 2016). En los hemocitos de *L. vannamei*, se ha encontrado peroxinectina, un homólogo de la proteína MPO humana, interactuar con las ETs (Robb et al., 2014). Además, se ha observado que el ADN extracelular colocaliza con MPO, defensinas y lectinas, lo que sugiere su participación como respuesta

antimicrobiana (Lange et al., 2017)(Han, Chen, et al., 2021)(Han, Zhang, et al., 2021b). En las células inmunes de invertebrados, la MPO juega un papel relevante en la formación de ETs; para identificar si MPO participa en la formación de ETs (Han, Zhang, et al., 2021b).

Tabla 2. Vías de señalización y proteínas involucradas en las trampas extracelulares de invertebrados.

Organismo (Clase)	Moléculas de señalización	ROS dependiente	ROS independiente	Proteínas	Referencia
<i>Mnemiopsis leidyi</i> (Tentaculata)	Vía MAP cinasa, PKC (PMA)	X	X	Histonas DNA	(L. Vandepas et al., 2020a)
<i>Dictyostelium discoideum</i> (Dictyostelia)	-	X	-	DNA Familia NOX	(X. Zhang et al., 2016)
<i>Limax maximus</i> (Gastropoda)	-	-	-	DNA Histonas MPO	(Lange et al., 2017)
<i>Lymnaea stagnalis</i> (Gastropoda)	-	-	-	DNA	(Skála et al., 2018)
<i>Crassostrea gigas</i> (Bivalvia)	PKC (PMA)	X	-	NADPH-oxidasa (DPI) DNA Histona 1 Histona 5	(Poirier et al., 2014a)
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (Bivalvia)	-	X	X	NADPH-oxidasa (DPI) DNA	(Romero et al., 2020)
<i>Ruditapes philippinarum</i> (Bivalvia)	PI3K, ERK, glucolisis	X	-	NADPH-oxidasa (DPI) DNA MPO	(Han, Chen, et al., 2021)
<i>Ruditapes philippinarum</i> (Bivalvia)	-	-	X	DNA Defensina Lectina	(Han, Zhang, et al., 2021a)
<i>Eisenia Andrei</i> (Clitellata)	PKC (PMA)	X	X	NADPH-oxidasa (DPI) PAD4 DNA HSP27 Histona 3 Elastasa	(Homa et al., 2016)

<i>Litopenaeus vannamei</i> (Malacostraca)	PKC (PMA)	-	-	DNA Histona 1	(Ng et al., 2013, 2015)
<i>Carcinus maenas</i> (Malacostraca)	PKC (PMA) (Ro-31)	X	-	NADPH- oxidasa (DPI) DNA Histona 2A Actina Peroxinectina	(Robb et al., 2014)
<i>Marsupenaeus japonicus</i> (Malacostraca)	PKC (PMA)	-	-	DNA Lisozima tipo C	(Koiwai et al., 2016)
<i>Peirplaneta americana</i> (Insecta)	-	-	-	DNA Histona 3	(Nascimento et al., 2018)
<i>Rhodnius prolixus</i> (Insecta)	-	-	-	DNA RNA	(Coste Grahl et al., 2020)
<i>Galleria mellonella</i> (Insecta)	-	-	-	DNA Apolipoproteínas	(Altincicek et al., 2008)

Vía MAP - Proteínas cinasas activadas por mitógenos, PAD4- Proteína arginina deiminasa 4, DPI- Cloruro de difenileno yodonio, HSP27- Proteína de choque térmico 27, MPO- Mieloperoxidasa, NOX- NADPH oxidasas, PMA- acetato forbol mirístico, DNA- ácido desoxirribonucleico, ARN- ácido ribonucleico, PKC- proteína cinasa C.

2.5 ETs y los mecanismos de defensa de invertebrados

La formación de ETs se ha asociado con otros mecanismos inmunológicos en invertebrados (Tabla 3). Varios reportes identifican su participación en el proceso de eliminación de bacterias. En la ostra *C. gigas*, utilizando microscopia con focal, se observó la formación de ETs en el tejido donde se localiza la infección por la bacteria *Vibrio tasmaniensis*, lo que sugiere su probable participación en el mecanismo de defensa contra la infección bacteriana (Poirier et al., 2014a).

Organismos de *L. maximus* fueron expuestos a larvas *Angiostrongylus vasorum* vivas, esta exposición *in vivo* resultó en la formación de ETs visualizadas mediante microscopía electrónica de barrido, se observaron hemocitos en el moco de *L. maximus* y adheridos a la cutícula de las larvas invasoras, lo que sugiere su papel como mecanismo efector contra parásitos (Lange et al., 2017).

En *D. discoideum*, las células centinela presentan actividad fagocítica; actualmente se ha identificado en estudios *in vitro* que estas células también producen ETs a través de la producción de ROS, las ETs formadas se cuantificaron mediante la tinción de ADN con MitoSox Red, un indicador de superóxido mitocondrial de células vivas (Zhang et al., 2016). La interrupción de los genes TirA y NOX mediante la técnica Cre-Lox, la proteína TirA es importante en la eliminación de bacterias por las células S, ya que contiene un dominio receptor Toll de interleucina (TIR), el gen NOX es importante en humanos para la formación de ETs, y los genes NOX de *D. discoideum* y de humano son homólogos, por lo que la interrupción de estos genes da como resultado una disminución de la eliminación de las infecciones por la bacteria *K. pneumoniae* (Zhang et al., 2016).

En el camarón *M. japonicus*, los hemocitos fueron estimulados con la bacteria *E. coli* y se observó mediante microscopía de fluorescencia que las bacterias son atrapadas por ETs, esta asociación sugirió que ETs podrían atrapar

bacterias, que posteriormente son lisadas por proteínas antimicrobianas (Koiwai et al., 2016). En el camarón *L. vanammei*, se observó mediante microscopia de fluorescencia que *E. coli* puede ser capturada por trampas extracelulares, indicando una participación en la eliminación bacteriana; es importante mencionar que, en presencia de altas densidades bacterianas, las ETs de camarón eran más eficaces que la fagocitosis como respuesta antibacteriana (Ng et al., 2015). Las ETs de las almejas *R. philippinarum* pueden atrapar y eliminar bacterias, los hemocitos fueron estimulados con la bacteria Gram negativa *V. anguillarum* y mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), se observó la formación de ETs (Han, Chen, et al., 2021). En los hemocitos de las almejas *R. philippinarum*, se comprobó la función de las ETs para atrapar y eliminar bacterias Gramnegativas y Gram-positivas, las ETs mostraron una mayor letalidad contra *V. anguillarum* que a otras cepas bacterianas (Han, Zhang, et al., 2021c) . Estos reportes sugieren una asociación entre los ET y la eliminación bacteriana, se necesita más investigación para identificar otras moléculas que participan en este mecanismo de defensa.

La formación de ETs podría estar relacionada con otros mecanismos celulares como la encapsulación. Los hemocitos del caracol *L. stagnalis* fueron estimulados con *T. regenti* durante 3 horas, se observó por microscopia de

fluorescencia, la expulsión de fibras similares a NETs que encapsulaban el parásito, estos resultados sugieren que las fibras son parte de los mecanismos de defensa (Skála et al., 2018). En otro reporte realizado en la cavidad celómica del gusano *E. aendrei*, se inyectó la bacteria *X. bovienii* y se observó que los coelomocitos se agregaron a las bacterias, los agregados formados estaban interconectados por ETs; es importante mencionar que la agregación celular es un proceso que precede a la encapsulación (Homa et al., 2016). En el cangrejo *C. maenas*, se observó una expulsión de cromatina de las células hialinas y la formación de cápsulas, en este reporte se realizó un estímulo con LPS en un modelo *in vivo*, las cápsulas tempranas se formaron después de 3 horas posteriores a la inoculación de LPS; después de 24 horas, se formó la cápsula alojada en las láminas branquiales de los organismos, lo que sugiere que la encapsulación y las ETs podrían estar relacionadas (Robb et al., 2014).

En la cucaracha *P. americana*, la inyección de *E. coli* estimuló la formación de trampas extracelulares; posteriormente, empezó el proceso de nodulación en la zona estimulada. Se realizaron dos análisis para ver la relación entre nodulación-ETs, el primero fue realizado con microscopía con focal donde se demostró que las ETs estaban asociados con la estructura del nódulo; posteriormente, mediante microscopía electrónica de barrido, se visualizaron fibras delgadas y alargadas que soportaban un nódulo con bacterias sumergidas

en la red. Se concluyó que las ETs formadas, independientemente del estímulo, podría estar relacionadas con la nodulación, controlando la propagación bacteriana (Nascimento et al., 2018). Estos resultados proponen que un primer paso en la respuesta inmune sea la formación de ETs seguida de un proceso de encapsulación destinado a contener y eliminar las infecciones por patógenos.

Se ha identificado que el proceso de coagulación está relacionado con el proceso de encapsulación, en la polilla *G. mellonella*, los ácidos nucleicos extracelulares inducen la coagulación de la hemolinfa, lo que prolonga significativamente la tasa de supervivencia del organismo infectado, se observó la formación de una estructura similar a ETs cuando la coagulación se ha desencadenado, estas ETs en insectos por este mecanismo son similares en apariencia y función a NETs de invertebrados (Altincicek et al., 2008).

Tabla 3. Mecanismos inmunológicos relacionados con la formación de trampas extracelulares en invertebrados.

Organismo (Clase)	Sistema inmune	Referencia
<i>Dictyostelium discoideum</i> (Dictyostelia)	Aclaramiento	(X. Zhang et al., 2016)
<i>Marsupenaeus japonicus</i> (Malacostraca)	Lisis	(Koiwai et al., 2016)
<i>Crassostrea gigas</i> (Bivalvia)	Atrapamiento	(Poirier et al., 2014a)
<i>Ruditapes philippinarum</i> (Bivalvia)	Atrapamiento	(Han, Chen, et al., 2021)
<i>Ruditapes philippinarum</i> (Bivalvia)	Atrapamiento	(Han, Zhang, et al., 2021c)
<i>Limax maximus</i> (Gastropoda)	Atrapamiento	(Lange et al., 2017)
<i>Rhodnius prolixus</i> (Insecta)	Agregación	(Coste Grahl et al., 2020)
<i>Litopenaeus vannamei</i> (Malacostraca)	Captura	(Ng et al., 2013, 2015)
<i>Eisenia Andrei</i> (Clitellata)	Encapsulación	(Homa et al., 2016)
<i>Carcinus maenas</i> (Malacostraca)	Encapsulación	(Robb et al., 2014)
<i>Lymnaea stagnalis</i> (Gastropoda)	Encapsulación	(Skála et al., 2018)
<i>Peirplaneta americana</i> (Insecta)	Nodulación	(Nascimento et al., 2018)
<i>Galleria mellonella</i> (Insecta)	Coagulación	(Altincicek et al., 2008)

VI. Discusión

Los mecanismos de la respuesta inmune innata se conservan entre varios organismos invertebrados, la respuesta inmune innata es tiene la característica de ser inmediata y de amplio espectro. Los mecanismos celulares del sistema inmune innato en invertebrados son realizados por diferentes tipos de células como las intestinales, hepatopancreáticas, epiteliales, pero principalmente los hemocitos realizan diferentes mecanismos como: fagocitosis, encapsulación y liberación de trampas extracelulares (Burgos-Aceves et al., 2021; Canesi & Procházková, 2013; Smith, 2016). El sistema inmunológico presenta similitudes entre vertebrados e invertebrados, lo que confirma que algunos mecanismos

se han conservado en la escala evolutiva (Mandujano-Tinoco et al., 2021). Hasta el momento, las ETs podría ser uno de estos mecanismos inmunológicos conservados en el reino animal.

La investigación sobre ETs en invertebrados se ha centrado en la identificación de PAMPs o DAMPs que promueven la formación de estas trampas. Hasta la fecha, se encuentran pocos estudios relacionados a la participación PRRs en las ETs. Es necesario ampliar la información sobre la participación de estas moléculas de reconocimiento que llevan a cabo la formación de ETs. En humanos, las interacciones carbohidrato-lectina juegan un papel importante en la modulación de los NET; las lectinas de invertebrados podrían estar estrechamente relacionadas con este proceso. En invertebrados, se ha confirmado que las lectinas solubles participan en los mecanismos celulares inmunitarios (Pees et al., 2016). Sería relevante identificar si estas proteínas pueden modular la formación de ETs.

En vertebrados, se han estudiado las vías dependiente e independiente de NADPH oxidasa para la liberación de NETs. En invertebrados, la forma de identificar la participación de estas vías es a través del uso de inhibidores específicos, Para la vía dependiente de NADPH-oxidasa o también conocida como NOX-dependiente, se identificaron las moléculas: PKC, PI3K, MAPK y ERK. Sin embargo, hasta la fecha, no hay un estudio donde se compruebe la vía de

señalización por completo. En la vía de señalización NOX- independiente es aún menor la información con la que se cuenta, únicamente se conoce la participación de MAPK, una forma de obtener ROS es a través de la mitocondria, pero aún no se conoce cuál es el mecanismo completo por el cual estas ROS desencadenan la formación de las ETs. Las ROS lideran las principales vías de señalización de los ETs, pero aún no está esclarecido si son las únicas vías (Han, Zhang, et al., 2021c). Se planteó la relación entre el metabolismo y la formación de ETs a través de la actividad de PK, HK Y GLUT mientras se formaban las trampas, hubo un aumento en su actividad, pero no se esclareció cual es la relación o el papel que tiene el metabolismo en el mecanismo. Se abre una nueva perspectiva de la posible participación del metabolismo celular relacionado con la formación de ETs, pero aún falta mucho para entender su relación.

Se han identificado numerosas proteínas que conforman la estructura de las ETs en invertebrados, sin embargo, no se conoce a profundidad la función de estas moléculas en la activación de las ETs. Las principales proteínas identificadas en NETs de vertebrados han sido las histonas, molécula fundamental de estas estructuras, las principales proteínas identificadas en invertebrados también son las histonas. En vertebrados, las histonas deben ser citrulinadas para que se lleve a cabo la descondensación de la cromatina y

posterior liberación del ADN. En invertebrados, únicamente se ha estudiado la participación de PAD4 como molécula relacionada con este mecanismo, Hasta la fecha, no se ha logrado esclarecer la participación de la citrulinización de histonas es las ETs. La mayoría de las proteínas estudiadas e identificadas en invertebrados se han clasificado como homólogas a las proteínas humanas, como MPO, peroxinectina y elastasa, sin embargo, tampoco se ha estudiado con profundidad las funciones que desempeñan.

Las ETs se han estudiado como un mecanismo de defensa independiente de la nodulación o la coagulación, sin embargo, se ha observado que las ETs pueden generar una cápsula que limita la propagación del microorganismo en el hospedero. Se ha sugerido que las ETs están relacionadas como precursores del proceso de la nodulación, es necesario que nuevas investigaciones se enfoquen en dilucidar si existe una relación con la formación de cápsula/nódulo mediante las ETs.

Hay todo un nuevo campo de investigación, han surgido nuevas perspectivas para avanzar en el conocimiento de los mecanismos que participan en la formación de las ETs, incrementando los estudios en modelos *in vivo*, identificando vías de señalización y la relación con otros mecanismos inmunes en presencia de diferentes patógenos. Esta información podría contribuir a la comprensión de los mecanismos de las ETs en presencia de enfermedades

infecciosas en otras especies. En este trabajo se ha identificado que las investigaciones relacionadas con las ETs se han enfocado en identificar los estímulos, vías de señalización, proteínas específicas que conforman las ETs y otros posibles mecanismos inmunes asociados a este proceso, aún falta mucho para llegar a comprender en su totalidad el mecanismo.

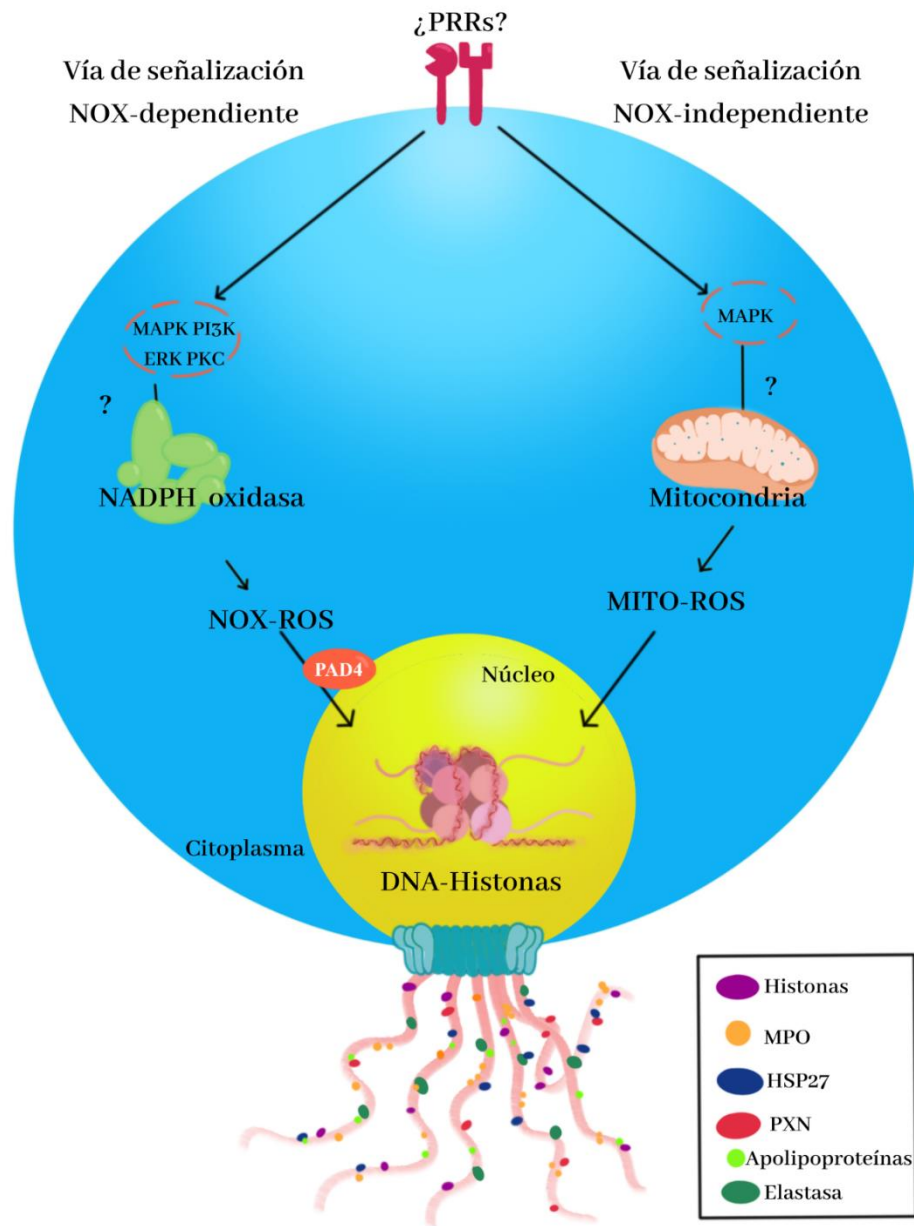


Figura 1. Representación esquemática de la formación de ETs en invertebrados.

Vía MAP- ERK - Proteínas cinasas activadas por mitógenos, PAD4- Proteína arginina deiminasa 4, HSP27- Proteína de choque térmico 27, MPO- Mieloperoxidasa, NOX- NADPH oxidasas, PKC- proteína cinasa C, NOX-ROS- Especies reactivas de oxígeno dependientes de NADPH oxidasas, PI3K- Fosfoinositol 3-cinasa.

VII. Conclusión

Este trabajo monográfico de actualización se enfocó en la revisión de la información relacionada con las ETs, las cuales participan como un mecanismo celular en presencia de patógenos, se abarcó desde la identificación de estímulos, las vías de señalización, las proteínas específicas que conforman la estructura de las ETs y los posibles mecanismos inmunes asociados a este proceso, el trabajo monográfico de actualización presentado nos brinda muchas oportunidades que deben seguir investigando, como los patrones de reconocimiento que activan este mecanismo, identificar con mayor claridad cuáles son las vías de señalización y las moléculas que participan en ellas, comprender la función y activación de moléculas identificadas en ETs, finalmente juntar toda esta información para comprender la función de las trampas extracelulares en invertebrados , los invertebrados son un buen modelo de estudio ya que son fácil de mantener, cuidar y obtener células y tejidos para analizar, el uso de estos organismos ayudará a comprender de mejor manera el mecanismos de las ETs en la respuesta inmunológica.

VIII. Bibliografía

- Alpuche, J., Rosas, C., Vázquez, L., Guevara, J., Pereyra, A., Agundis, C., Pascual, C., & Zenteno, E. (2009). Activation of immunological responses in *Litopenaeus setiferus* hemocytes by a hemocyanin like-lectin. *Aquaculture*, 292(1-2), 11-15.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.03.022>
- Altincicek, B., Stötzel, S., Wygrecka, M., Preissner, K. T., & Vilcinskas, A. (2008). Host-Derived Extracellular Nucleic Acids Enhance Innate Immune Responses, Induce Coagulation, and Prolong Survival upon Infection in Insects. *The Journal of Immunology*, 181(4), 2705-2712.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2705>
- Amparyup, P., Charoensapsri, W., & Tassanakajon, A. (2009). Two prophenoloxidasases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(2), 247-256. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.09.003>
- Bornhöfft, K. F., & Galuska, S. P. (2019). Glycans as Modulators for the Formation and Functional Properties of Neutrophil Extracellular Traps: Used by the Forces of Good and Evil. *Frontiers in Immunology*, 10(MAY), 1-9.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00959>

- Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S. E., Wang, Q., Maximiliano, G., Brown, G. D., & Papayannopoulos, V. (2015). Neutrophils sense microbial size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol.*, *15*(11), 1017–1025. <https://doi.org/10.1038/ni.2987>.Neutrophils
- Brinkmann, V. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, *303*(5663), 1532–1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
- Brinkmann, V. (2018). Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade. *Journal of Innate Immunity*, *10*(5–6), 414–421. <https://doi.org/10.1159/000489829>
- Buchmann, K. (2014). Evolution of innate immunity: Clues from invertebrates via fish to mammals. *Frontiers in Immunology*, *5*(SEP), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00459>
- Buckley, K. M., & Rast, J. P. (2012). Dynamic evolution of toll-like receptor multigene families in echinoderms. *Frontiers in Immunology*, *3*(JUN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00136>
- Burgener, S. S., & Schroder, K. (2020). Neutrophil extracellular traps in host defense. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *12*(7), 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037028>

Burgos-Aceves, M. A., Abo-Al-Ela, H. G., & Faggio, C. (2021). Impact of phthalates and bisphenols plasticizers on haemocyte immune function of aquatic invertebrates: A review on physiological, biochemical, and genomic aspects. *Journal of Hazardous Materials*, 419(June), 126426. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126426>

Cai, S., Huang, Y., Jian, J., & Yang, S. (2020). The functional characterization of peroxinectin in the defense of *Fenneropenaeus penicillatus* against pathogens. *Developmental and Comparative Immunology*, 104(1), 103538. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103538>

Canesi, L., & Procházková, P. (2013). The Invertebrate Immune System as a Model for Investigating the Environmental Impact of Nanoparticles. In *Nanoparticles and the Immune System: Safety and Effects*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408085-0.00007-8>

Cerenius, L., Lee, B. L., & Söderhäll, K. (2008a). The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*, 29(6), 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.02.009>

Cerenius, L., Lee, B. L., & Söderhäll, K. (2008b). The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*, 29(6), 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.02.009>

- Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2018). Crayfish immunity – Recent findings. *Developmental and Comparative Immunology*, 80, 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.010>
- Chen, S. T., Li, F. J., Hsu, T. Y., Liang, S. M., Yeh, Y. C., Liao, W. Y., Chou, T. Y., Chen, N. J., Hsiao, M., Yang, W. bin, & Hsieh, S. L. (2017). CLEC5A is a critical receptor in innate immunity against *Listeria* infection. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00356-3>
- Chen, T., Li, Y., Sun, R., Hu, H., Liu, Y., Herrmann, M., Zhao, Y., & Muñoz, L. E. (2021). Receptor-Mediated NETosis on Neutrophils. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.775267>
- Cooper, E. L. (2003). *Comparative Immunology*.
- Coste Grahl, M. v., Perin, A. P. A., Lopes, F. C., Porto, B. N., Uberti, A. F., Canavoso, L. E., Stanisçuaski, F., & Fruttero, L. L. (2020). The role of extracellular nucleic acids in the immune system modulation of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 167(April), 104591. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104591>
- de Bont, C. M., Koopman, W. J. H., Boelens, W. C., & Pruijn, G. J. M. (2018). Stimulus-dependent chromatin dynamics, citrullination, calcium signalling

and ROS production during NET formation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1865(11), 1621–1629.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.08.014>

Dong, C., Wei, Z., & Yang, G. (2011). Involvement of peroxinectin in the defence of red swamp crayfish *Procambarus clarkii* against pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(6), 1223–1229.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.04.014>

Douda, D. N., Jackson, R., Grasemann, H., & Palaniyar, N. (2011). Innate Immune Collectin Surfactant Protein D Simultaneously Binds Both Neutrophil Extracellular Traps and Carbohydrate Ligands and Promotes Bacterial Trapping. *The Journal of Immunology*, 187(4), 1856–1865.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1004201>

Douda, D. N., Khan, M. A., Grasemann, H., & Palaniyar, N. (2015). SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(9), 2817–2822.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1414055112>

- Dubovskiy, I. M., Kryukova, N. A., Glupov, V. V., & Ratcliffe, N. A. (2016). Encapsulation and nodulation in insects. *Invertebrate Survival Journal*, *13*, 229–246. <https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v13i1.229-246>
- Estúa-Acosta, G. A., Zamora-Ortiz, R., Buentello-Volante, B., García-Mejía, M., & Garfias, Y. (2019). Neutrophil Extracellular Traps: Current Perspectives in the Eye. *Cells*, *8*(9). <https://doi.org/10.3390/cells8090979>
- Flajnik, M. F. (2018). A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/s41577>
- Fonseca, Z., Díaz-Godínez, C., Mora, N., Alemán, O. R., Uribe-Querol, E., Carrero, J. C., & Rosales, C. (2018). Entamoeba histolytica Induce Signaling via Raf/MEK/ERK for Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *8*(JUL). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00226>
- Gerardo, N. M., Hoang, K. L., & Stoy, K. S. (2020). Evolution of animal immunity in the light of beneficial symbioses: Host immune evolution and symbiosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *375*(1808). <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0601rstb20190601>

- Goldmann, O., & Medina, E. (2013). The expanding world of extracellular traps: Not only neutrophils but much more. *Frontiers in Immunology*, 3(JAN), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00420>
- Hakim, A., Fuchs, T. A., Martinez, N. E., Hess, S., Prinz, H., Zychlinsky, A., & Waldmann, H. (2011). Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nature Chemical Biology*, 7(2), 75–77. <https://doi.org/10.1038/nchembio.496>
- Han, Y., Chen, L., Zhang, Q., Yu, D., Yang, D., & Zhao, J. (2021). Hemocyte extracellular traps of Manila clam *Ruditapes philippinarum*: Production characteristics and antibacterial effects. *Developmental & Comparative Immunology*, 116(August 2020), 103953. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103953>
- Han, Y., Zhang, Q., Chen, L., Yang, D., & Zhao, J. (2021a). Mitochondria are essential for antibacterial extracellular trap formation mediated by zymosan in hemocytes of *Ruditapes philippinarum*. *Developmental and Comparative Immunology*, 121, 135907. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104094>
- Han, Y., Zhang, Q., Chen, L., Yang, D., & Zhao, J. (2021b). Mitochondria are essential for antibacterial extracellular trap formation mediated by zymosan

in hemocytes of *Ruditapes philippinarum*. *Developmental and Comparative Immunology*, 121, 135907. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104094>

Han, Y., Zhang, Q., Chen, L., Yang, D., & Zhao, J. (2021c). Mitochondria are essential for antibacterial extracellular trap formation mediated by zymosan in hemocytes of *Ruditapes philippinarum*. *Developmental & Comparative Immunology*, 121, 104094. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104094>

Hanington, P. C., & Zhang, S.-M. (2011). The Primary Role of Fibrinogen-Related Proteins in Invertebrates Is Defense, Not Coagulation. *Journal of Innate Immunity*, 3(1), 17–27. <https://doi.org/10.1159/000321882>

Hernández-Gurrola, J. A., Naranjo-Páramo, J., Vargas-Mendieta, M., Cruz-Hernández, P., Villarreal-García, A., Mora-Castrejón, G., & Villarreal-Colmenares, H. (2020). Effect of crossbreeding three divergent populations on the juvenile production and rearing performance of the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture*, 527(April), 735420. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735420>

Hillyer, J. F. (2016a). Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental & Comparative Immunology*, 58, 102–118. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.006>

- Hillyer, J. F. (2016b). Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental & Comparative Immunology*, 58, 102–118.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.006>
- Homa, J., Ortmann, W., & Kolaczkowska, E. (2016). Conservative Mechanisms of Extracellular Trap Formation by Annelida *Eisenia andrei*: Serine Protease Activity Requirement. *PLOS ONE*, 11(7), e0159031.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159031>
- Huang, Y., & Ren, Q. (2021). Innate immune responses against viral pathogens in *Macrobrachium*. *Developmental and Comparative Immunology*, 117(August 2020), 103966. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103966>
- Jeyachandran, S., Park, K., Kwak, I. S., & Baskaralingam, V. (2020). Morphological and functional characterization of circulating hemocytes using microscopy techniques. *Microscopy Research and Technique*, 83(7), 736–743. <https://doi.org/10.1002/jemt.23463>
- Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., & Söderhäll, K. (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191(1–3), 45–52. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00418-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00418-X)
- Koiwai, K., Alenton, R. R. R., Kondo, H., & Hirono, I. (2016). Extracellular trap formation in kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) hemocytes is

coupled with c-type lysozyme. *Fish and Shellfish Immunology*, *52*, 206–209. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.039>

Lange, M. K., Penagos-Tabares, F., Muñoz-Caro, T., Gärtner, U., Mejer, H., Schaper, R., Hermosilla, C., & Taubert, A. (2017). Gastropod-derived haemocyte extracellular traps entrap metastrongyloid larval stages of *Angiostrongylus vasorum*, *Aelurostrongylus abstrusus* and *Troglostrongylus brevior*. *Parasites and Vectors*, *10*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1961-z>

Li, C., Weng, S., & He, J. (2019). WSSV–host interaction: Host response and immune evasion. *Fish and Shellfish Immunology*, *84*(October 2018), 558–571. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.043>

Little, A. G., Pamerter, M. E., Sitaraman, D., Templeman, N. M., Willmore, W. G., Hedrick, M. S., & Moyes, C. D. (2021). Utilizing comparative models in biomedical research. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, *255*(March), 110593. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2021.110593>

Liu, H., Guo, S., He, Y., Shi, Q., Yang, M., & You, X. (2021). Toll protein family structure, evolution and response of the whiteleg shrimp (*Litopenaeus*

vannamei) to exogenous iridescent virus . *Journal of Fish Diseases*, March, 1–15. <https://doi.org/10.1111/jfd.13374>

Liu, S., Zheng, S.-C., Li, Y.-L., Li, J., & Liu, H.-P. (2020). Hemocyte-Mediated Phagocytosis in Crustaceans. *Frontiers in Immunology*, 11(March), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00268>

Loures, F. v., Röhm, M., Lee, C. K., Santos, E., Wang, J. P., Specht, C. A., Calich, V. L. G., Urban, C. F., & Levitz, S. M. (2015). Recognition of *Aspergillus fumigatus* Hyphae by Human Plasmacytoid Dendritic Cells Is Mediated by Dectin-2 and Results in Formation of Extracellular Traps. *PLoS Pathogens*, 11(2), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004643>

Mandujano-Tinoco, E. A., Sultan, E., Ottolenghi, A., Gershoni-Yahalom, O., & Rosental, B. (2021). Evolution of Cellular Immunity Effector Cells; Perspective on Cytotoxic and Phagocytic Cellular Lineages. *Cells*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/cells10081853>

Max-Aguilar, A., Villarreal, H., Leyva-Valencia, I., Valencia-Valdez, R., Naranjo-Páramo, J., Vargas-Mendieta, M., Villarreal-García, A., & Cruz-Hernández, P. (2021). Genetic diversity of divergent redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Von martens, 1868) populations evaluated to initiate a

breeding program in Mexico. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 49(2), 272–279. <https://doi.org/10.3856/vol49-issue2-fulltext-2630>

Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (1998). An ancient system of host defense. *Current Opinion in Immunology*, 10(1), 12–15. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80024-1](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80024-1)

Melillo, D., Marino, R., Italiani, P., & Boraschi, D. (2018). Innate Immune Memory in Invertebrate Metazoans: A Critical Appraisal. *Frontiers in Immunology*, 9(August), 1915. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01915>

Metzler, K. D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A., & Papayannopoulos, V. (2014). Myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Reports*, 8(3), 883–896. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.044>

Nascimento, M. T. C., Silva, K. P., Garcia, M. C. F., Medeiros, M. N., Machado, E. A., Nascimento, S. B., & Saraiva, E. M. (2018). DNA extracellular traps are part of the immune repertoire of *Periplaneta americana*. *Developmental and Comparative Immunology*, 84, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.01.012>

- Neumann, A., Brogden, G., & Köckritz-Blickwede, M. von. (2020). Extracellular Traps : An Ancient Weapon of multiple kingdoms. *Biology*.
- Ng, T. H., Chang, S. H., Wu, M. H., & Wang, H. C. (2013). Shrimp hemocytes release extracellular traps that kill bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(4), 644–651. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.06.014>
- Ng, T. H., Wu, M. H., Chang, S. H., Aoki, T., & Wang, H. C. (2015). The DNA fibers of shrimp hemocyte extracellular traps are essential for the clearance of *Escherichia coli*. *Developmental and Comparative Immunology*, 48(1), 229–233. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.10.011>
- Omae, Y., Hanada, Y., Sekimizu, K., & Kaito, C. (2013). Silkworm apolipoprotein inhibits hemolysin gene expression of *Staphylococcus aureus* via binding to cell surface lipoteichoic acids. *Journal of Biological Chemistry*, 288(35), 25542–25550. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.495051>
- Osaki, T., & Kawabata, S. (2004). Structure and function of coagulogen, a clottable protein in horseshoe crabs. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 61, Issue 11, pp. 1257–1265). <https://doi.org/10.1007/s00018-004-3396-5>

- Palmieri, B., Vadala', M., & Palmieri, L. (2021). Immune memory: an evolutionary perspective. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 17(6), 1604–1606. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1846396>
- Papayannopoulos, V. (2018). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology*, 18(2), 134–147. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.105>
- Parker, H., & Winterbourn, C. C. (2012). Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Frontiers in Immunology*, 3(JAN), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00424>
- Pees, B., Yang, W., Zárata-Potes, A., Schulenburg, H., & Dierking, K. (2016). High Innate Immune Specificity through Diversified C-Type Lectin-Like Domain Proteins in Invertebrates. *Journal of Innate Immunity*, 8(2), 129–142. <https://doi.org/10.1159/000441475>
- Perdomo-Morales, R., Montero-Alejo, V., & Perera, E. (2019). The clotting system in decapod crustaceans: History, current knowledge and what we need to know beyond the models. *Fish and Shellfish Immunology*, 84(September 2018), 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.060>

Poirier, A. C., Schmitt, P., Rosa, R. D., Vanhove, A. S., Kieffer-Jaquinod, S., Rubio, T. P., Charrière, G. M., & Destoumieux-Garzón, D. (2014a). Antimicrobial histones and DNA traps in invertebrate immunity: Evidences in *Crassostrea gigas*. *Journal of Biological Chemistry*, 289(36), 24821–24831. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.576546>

Poirier, A. C., Schmitt, P., Rosa, R. D., Vanhove, A. S., Kieffer-Jaquinod, S., Rubio, T. P., Charrière, G. M., & Destoumieux-Garzón, D. (2014b). Antimicrobial Histones and DNA Traps in Invertebrate Immunity. *Journal of Biological Chemistry*, 289(36), 24821–24831. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.576546>

Prochazkova, P., Roubalova, R., Skanta, F., Dvorak, J., Pacheco, N. I. N., Kolarik, M., & Bilej, M. (2019). Developmental and immune role of a novel multiple cysteine cluster TLR from *Eisenia Andrei* Earthworms. *Frontiers in Immunology*, 10(JUN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01277>

Robb, C. T., Dyrynda, E. A., Gray, R. D., Rossi, A. G., & Smith, V. J. (2014). Invertebrate extracellular phagocyte traps show that chromatin is an ancient defence weapon. *Nature Communications*, 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms5627>

- Romero, A., Novoa, B., & Figueras, A. (2020). Extracellular traps (ETosis) can be activated through NADPH-dependent and -independent mechanisms in bivalve mollusks. *Developmental and Comparative Immunology*, 106(October 2019), 103585. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103585>
- Sánchez-Salgado, J. L., Pereyra, M. A., Agundis, C., Vivanco-Rojas, O., Rosales, C., Pascual, C., Alpuche-Osorno, J. J., & Zenteno, E. (2018). The effect of the lectin from *Cherax quadricarinatus* on its granular hemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 77(March), 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.050>
- Sánchez-Salgado, J. L., Pereyra, M. A., Alpuche-Osorno, J. J., & Zenteno, E. (2021). Pattern recognition receptors in the crustacean immune response against bacterial infections. *Aquaculture*, 532, 735998. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735998>
- Schulenburg, H., Kurz, C. L., & Ewbank, J. J. (2004). Evolution of the innate immune system: The worm perspective. *Immunological Reviews*, 198, 36–58. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0125.x>
- Sierra, C., Lascurain, R., Pereyra, A., Guevara, J., Martínez, G., Agundis, C., Zenteno, E., & Vázquez, L. (2005). Participation of serum and membrane lectins on the oxidative burst regulation in *Macrobrachium rosenbergii*

hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 29(2), 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.06.008>

Sirikharin, R., Söderhäll, K., & Söderhäll, I. (2020). The N-terminal peptide generated after activation of prophenoloxidase affects crayfish hematopoiesis. *Developmental and Comparative Immunology*, 108(March), 103687. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103687>

Skála, V., Walker, A. J., & Horák, P. (2018). Extracellular trap-like fiber release may not be a prominent defence response in snails: evidence from three species of freshwater gastropod molluscs. *Developmental & Comparative Immunology*, 79, 137–141. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.10.011>

Smith, V. J. (2016). Immunology of Invertebrates: Cellular. *ELS*, 1–13. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002344.pub3>

Söderhäll, K., & Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10(1), 23–28. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80026-5](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80026-5)

Sollberger, G., Tilley, D. O., & Zychlinsky, A. (2018). Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization. *Developmental Cell*, 44(5), 542–553. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.01.019>

- Sung, P.-S., & Hsieh, S.-L. (2021). C-type lectins and extracellular vesicles in virus-induced NETosis. *Journal of Biomedical Science*, 28(1), 46.
<https://doi.org/10.1186/s12929-021-00741-7>
- Tassanakajon, A., Rimphanitchayakit, V., Visetnan, S., Amparyup, P., Somboonwiwat, K., Charoensapsri, W., & Tang, S. (2018). Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. *Developmental and Comparative Immunology*, 80, 81–93.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.009>
- Touffeeq, S., Wang, J., Zhang, S. Z., Li, B., Hu, P., Zhu, L. B., You, L. L., & Xu, J. P. (2019). Bmserpin2 is involved in BmNPV infection by suppressing melanization in *Bombyx mori*. *Insects*, 10(11).
<https://doi.org/10.3390/insects10110399>
- Ueki, S., Tokunaga, T., Fujieda, S., Honda, K., Hirokawa, M., Spencer, L. A., & Weller, P. F. (2016). Eosinophil ETosis and DNA Traps: a New Look at Eosinophilic Inflammation. *Current Allergy and Asthma Reports*, 16(8).
<https://doi.org/10.1007/s11882-016-0634-5>
- Vandepas, L. E., Stefani, C., Traylor-Knowles, N., Goetz, F. W., Browne, W. E., & Lacy-Hulbert, A. (2020). Ctenophore immune cells produce chromatin

traps in response to pathogens and NADPH- independent stimulus Authors and Affiliations: Lauren E. Vandepas. *BioRxiv*, 8–13.

Vandepas, L., Stefani, C., Traylor-Knowles, N., Goetz, F., Browne, W., & Lacy-Hulbert, A. (2020a). Ctenophore immune cells produce chromatin traps in response to pathogens and NADPH-independent stimulus. *BioRxiv*, 8–13. <https://doi.org/10.1101/2020.06.09.141010>

Vandepas, L., Stefani, C., Traylor-Knowles, N., Goetz, F., Browne, W., & Lacy-Hulbert, A. (2020b). Ctenophore immune cells produce chromatin traps in response to pathogens and NADPH-independent stimulus. *BioRxiv*, 8–13. <https://doi.org/10.1101/2020.06.09.141010>

Wang, X., Zhang, Y., Zhang, R., & Zhang, J. (2019). The diversity of pattern recognition receptors (PRRs) involved with insect defense against pathogens. *Current Opinion in Insect Science*, 33, 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.05.004>

Wu, M., Zhu, K. C., Guo, H. Y., Guo, L., Liu, B., Jiang, S. G., & Zhang, D. C. (2021). Characterization, expression and function analysis of the TLR3 gene in golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *Developmental and Comparative Immunology*, 117(December 2020), 103977. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103977>

Zhang, K., Shen, L., Wang, X., Yang, H., Zhang, X., Pan, G., Li, C., Ji, H., Abbas, M. N., Li, C., & Cui, H. (2021). Scavenger receptor C regulates antimicrobial peptide expression by activating toll signaling in silkworm, *Bombyx mori*. *International Journal of Biological Macromolecules*, *191*(May), 396–404. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.084>

Zhang, X., & Soldati, T. (2016). Of amoebae and men: Extracellular DNA traps as an ancient cell-intrinsic defense mechanism. *Frontiers in Immunology*, *7*(JUL), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00269>

Zhang, X., Zhuchenko, O., Kuspa, A., & Soldati, T. (2016). Social amoebae trap and kill bacteria by casting DNA nets. *Nature Communications*, *7*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms10938>