



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN**

**Papel de la NETosis en la fisiopatogenia del COVID-19**

**TESIS**

Para obtener el título de  
**ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA**

**PRESENTA:**

María Fernanda García Gutiérrez

**TUTORES DE TESIS:**

Dr. José Jiram Torres Ruiz  
Departamento de Inmunología y Reumatología  
INCMNSZ

Dr. Alfonso Gullas Herrero  
Subdirección de Servicios Médicos  
Profesor titular del curso de Medicina Interna  
INCMNSZ

**Ciudad Universitaria, Ciudad de México, febrero 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.

## ÍNDICE

Resumen .....	3
Marco teórico.....	4
I. COVID-19 .....	4
II. Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). .....	4
III. Granulocitos de baja densidad y NETosis en infecciones virales respiratorias. ....	5
IV. Papel de las NETs en infecciones virales. ....	5
V. Papel de las NETs en la patogenia de COVID-19.....	6
VI. NETosis y SDRA .....	7
VII. Eliminación de NETs .....	7
Planteamiento del problema y justificación .....	8
Objetivos.....	8
Hipótesis.....	8
Material y métodos.....	8
Resultados.....	10
Discusión .....	12
Conclusiones .....	14
Referencias bibliográficas.....	14

## Resumen

Recientemente un nuevo coronavirus denominado SARS-CoV-2, por sus siglas en inglés *severe acute respiratory syndrome* se ha propuesto como causante de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) y ha ocasionado una crisis mundial con la actual pandemia por esta enfermedad.

Los neutrófilos juegan un papel crucial en la inmunidad de los seres humanos. Las trampas extracelulares de neutrófilos (NET) fueron observadas como una forma de muerte celular diferente a la necrosis y la apoptosis.

Las NETs se pueden unir e inmovilizar a los virus por medio de interacciones electrostáticas entre moléculas virales. Las NETs contribuyen a la tormenta de citocinas que se ha visto muy ligada a la patogenia de la COVID-19. Aunque recientemente se ha descrito a la NETosis como un mecanismo de daño tisular en COVID-19, se desconoce si los granulocitos de baja densidad (LDGs) o de densidad normal (NDGs) representan una fuente importante de NETs en dicha enfermedad.

El objetivo de este estudio fue analizar el papel de la NETosis en la fisiopatogenia de la COVID-19. Se realizó un estudio transversal en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, un centro de atención de referencia para pacientes con COVID-19. Se incluyeron 82 pacientes con COVID-19 confirmada por PCR para SARS-CoV-2. Se encontró que la COVID-19 se caracteriza por la producción de LDGs inmaduros, además los NDGs de los pacientes con COVID-19 son la principal fuente de NETosis espontánea en esta enfermedad. En pacientes graves o en estado crítico se vió una degradación deficiente de las NETs que puede ser corregida posterior a la aplicación de DNAsa recombinante humana.

Los pacientes con COVID-19 tienen un enriquecimiento en los granulocitos, incluyendo aquellos de baja densidad y con fenotipo inmaduro. Tanto los LDG como los neutrófilos convencionales producen NETs espontáneas, siendo más largas las de los neutrófilos convencionales. Los pacientes con COVID-19 tienen deficiencia en la degradación de NETs, se requieren nuevos estudios para verificar la causa de la deficiencia de la función de DNasa en dichos pacientes.

## **Marco teórico**

### **I. COVID-19**

En las últimas décadas, los coronavirus han sido asociados a brotes de diferentes enfermedades principalmente en Asia del Este y Medio Oriente.<sup>1</sup> Recientemente, un nuevo coronavirus denominado SARS-CoV-2, por sus siglas en inglés *severe acute respiratory syndrome* se ha propuesto como causante de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) y ha causado una crisis mundial con la actual pandemia por esta enfermedad.

Los coronavirus de reciente aparición representan una amenaza para la salud pública mundial. La COVID-19 es el tercer brote de coronavirus en las últimas dos décadas, precedida por el SARS-CoV (síndrome respiratorio agudo grave) y el MERS-CoV (síndrome respiratorio de Medio Oriente).

El SARS-CoV-2 surgió en China y se extendió rápidamente por todo el país y posteriormente a otros países. Debido a la gravedad de este brote y al potencial de propagación en un a escala internacional, la OMS declaró una emergencia sanitaria mundial el 31 de enero de 2020; posteriormente, el 11 de marzo de 2020, la declararon situación de pandemia.

La transmisibilidad del SARS-CoV-2 es mayor que la de los coronavirus previamente estudiados. En un inicio la COVID-19 fue transmitida como una zoonosis, desde los murciélagos de un mercado de comida en Wuhan, China. Sin embargo, posterior a esto la transmisión humano-humano cobró importancia con el desarrollo de la pandemia.<sup>2</sup>

A lo largo de la pandemia, se han identificado además pacientes cuya infección por el SARS-CoV-2 cursa de manera asintomática, sin embargo, se ha visto que son capaces de transmitir la enfermedad.<sup>3</sup>

Generalmente en humanos los coronavirus causan enfermedad respiratoria de leve a grave. El periodo de incubación suele ir de 3 a 6 días, sin embargo, existen reportes que sugieren que puede ir hasta 11 días.<sup>4</sup> Los síntomas de la COVID-19 incluyen fiebre, tos, mialgias, fatiga, cefalea, hemoptisis, diarrea y anosmia. Los pacientes que cursan con una enfermedad grave presentan además invasión del virus al parénquima pulmonar resultando en inflamación intersticial importante y neumonía. Estos pacientes pueden desarrollar síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (SDRA por sus siglas en inglés).

Los pacientes de edad avanzada con enfermedades crónicas como la hipertensión arterial sistémica y la diabetes mellitus se han identificado como la población más susceptible al desarrollo de SDRA y por lo tanto se han asociado con peores desenlaces<sup>1</sup>. El SDRA en COVID-19 se debe a la tormenta de citocinas derivada de una respuesta inmunológica exagerada y desequilibrio de la regulación inmune, lo que lleva finalmente a falla multiorgánica.<sup>5</sup>

### **II. Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs).**

Los neutrófilos juegan un papel crucial en la inmunidad de los seres humanos. Se caracterizan por su habilidad para participar en diferentes procesos como la fagocitosis, pinocitosis, citotoxicidad y citólisis formando así la primera línea de defensa en la inmunidad contra microorganismos.

Las trampas extracelulares de neutrófilos (NET) fueron observadas por primera vez por Takei et al. en 1996 como una forma de muerte celular diferente a la necrosis y la apoptosis. Se demostró un cambio en la morfología de los neutrófilos tratados con PMA (phorbol miristato acetato) en el que se observó descondensación de la cromatina y ruptura de la membrana nuclear. Posteriormente se describió a las NETs como el producto de un proceso activo de muerte celular observada en los neutrófilos, denominada NETosis, cuya función era atrapar y matar bacterias<sup>6</sup>. Previamente se pensaba que la NETosis era un mecanismo de defensa únicamente contra bacterias y hongos, sin embargo, se ha visto que juega un papel importante en la respuesta a infecciones virales<sup>7</sup>.

Inicialmente se describió que las NETs estaban compuestas por ácido desoxirribonucleico (ADN) extracelular e histonas, que forman hasta el 70% de las proteínas de las NETs<sup>8</sup>. Las NETs se encuentran decoradas por proteínas granulares primarias de neutrófilos como elastasa de neutrófilos (NE), catepsina G, y mieloperoxidasa (MPO)<sup>6</sup>. También se han descrito proteínas granulares secundarias y terciarias<sup>6</sup>. El ADN extracelular forma estructuras fibrilares de 15 a 27 nm de diámetro<sup>6</sup>. La combinación de la cromatina con las proteínas relacionadas con NETs da como resultado una estructura en forma de malla<sup>9</sup>.

Se conocen dos formas de NETosis. La NETosis suicida es un proceso de varias horas en el que los neutrófilos descondensan su cromatina nuclear y su ADN en el citoplasma. Posteriormente se mezclan con péptidos antimicrobianos derivados de gránulos. Finalmente, esta mezcla se libera en el espacio extracelular con formación de abundantes especies reactivas de oxígeno (ERO). La segunda forma es la NETosis vital en la cual se liberan NETs sin ocasionar muerte celular. A diferencia de la NETosis suicida, no requiere generación de ROS por lo que ocurre en 5 a 60 minutos posterior al estímulo. Actualmente se sabe que el contenido proteico de las NETs depende del estímulo que las indujo<sup>8</sup>.

### **III. Granulocitos de baja densidad y NETosis en infecciones virales respiratorias.**

Los granulocitos de baja densidad (LDGs) fueron descritos por primera vez en 1986 por Hacbarth y Kajdacsy-Balla quienes detectaron a estas células en las preparaciones de células mononucleares de sangre periférica de muestras obtenidas de pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG).

Desde entonces se identificaron diferentes características de los LDGs. Comparado con los neutrófilos de densidad normal (NDGs), los LDGs tienen una capacidad de sintetizar interferón tipo I aumentada. Además de esto presentan una disminución de la fagocitosis, pero una capacidad aumentada de formación de NETs<sup>10</sup>. Los LDGs se han asociado con enfermedades autoinmunes como LEG, artritis reumatoide, psoriasis y otras enfermedades como cáncer, infección por VIH y sepsis<sup>11,12</sup>.

### **IV. Papel de las NETs en infecciones virales.**

Las NETs se pueden unir e inmovilizar a los virus por medio de interacciones electrostáticas entre moléculas virales<sup>13</sup>, como se puede ver en el virus sincitial respiratorio<sup>14</sup>. Aunado a esto, las histonas que característicamente poseen una carga positiva pueden unirse a las cápsidas virales con una carga negativa. Por ejemplo, en el virus de la influenza A se ha visto interacción entre las histonas H3 y H4, con la proteína H<sup>15</sup>. Se sabe que existe una liberación de NETs durante la infección por el virus de inmunodeficiencia humana, sin embargo, aún no se tiene evidencia *in vivo* de actividad antiviral de las NETs.

En infecciones virales respiratorias, se han evidenciado NETs en lavados bronqueo-alveolares de pacientes infectados por el virus sincitial respiratorio lo que ha llevado a pensar que las NETs juegan un papel importante en la fisiopatogenia de la enfermedad<sup>16</sup>. Asimismo, se ha observado que dependiendo de la gravedad de la enfermedad se forman diferentes cantidades de NETs. Por ejemplo, en influenza, cuando la infección es leve no se ha evidenciado formación de NETs, sin embargo, en enfermedad grave se forman NETs en la mayoría de los pacientes<sup>15</sup>.

A pesar de esto, aún no se está claro el estímulo desencadenante de la NETosis en infecciones virales y no se sabe si son directamente estimuladas por los microorganismos por sus diferentes vías de activación por medio de receptores tipo Toll (TLR) o si son una respuesta de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) del hospedero<sup>8</sup>.

## **V. Papel de las NETs en la patogenia de COVID-19.**

Se ha encontrado que la neutrofilia es indicativo de gravedad en los pacientes con COVID-19 y que conlleva un mal pronóstico<sup>17,18</sup>. Además de esto se ha observado aumento de NETs en suero de pacientes con COVID-19, medidos a través de los complejos de ADN-MPO, histona H3 citrulinada, entre otros<sup>18</sup>.

La inflamación en parenquima pulmonar es la causa principal de complicaciones respiratorias potencialmente mortales en la COVID-19. En relación a esto, las NETs se han identificado en aspirados traqueales de pacientes hospitalizados con COVID-19 crítico. Además se vio que los neutrofilos en estos pacientes producían concentraciones significativamente mayores de NETs<sup>19</sup>. Estos mismos autores han descrito presencia de NETs en muestras de tejido pulmonar en autopsias de pacientes con COVID-19.

*In vitro*, se ha observado que el SARS-CoV-2 causa producción de NETs por neutrofilos sanos vía PAD-4 y que además, las NETs inducidas por el virus causan la muerte de células epiteliales pulmonares<sup>19</sup>. Otros estudios han demostrado que *in vitro* el suero de pacientes con COVID-19 desencadena la liberación de NETs de neutrófilos sanos<sup>18</sup>.

Además de lo anterior, se ha encontrado una relación entre la NETosis y la trombosis que presentan los pacientes con COVID-19. El término de inmunotrombosis fue usado por primera vez en 2013 por Engelmann y Massberg<sup>20</sup> para definir la estrecha y compleja relación entre el sistema de coagulación y el sistema inmune innato. A pesar de que existen diversos mecanismos implicados, la interacción entre las NETs, las plaquetas y el factor de von Willebrand (FvW) es un mecanismo pivote de la inmunotrombosis<sup>21</sup>.

Los neutrófilos promueven un ambiente procoagulante principalmente por la liberación de NETs<sup>22</sup>. Las NETs proveen un andamio procoagulante formado principalmente por plaquetas, FvW, factor tisular, histonas extracelulares, HMGB-1 y fibrinogeno.

También se ha visto que los NETs promueven la función proteolítica de la elastasa de neutrófilos, la cual degrada y altera la función de anticoagulantes como la trombomodulina<sup>23</sup>. La histona H4 se une a la protrombina y genera trombina por medio de autoactivación<sup>21</sup>. Por último se ha encontrado que las NETs se unen con el factor XII llevando a la activación a FXIIa, activando la cascada de la coagulación<sup>20</sup>.

Las NETs contribuyen a la tormenta de citocinas que se ha visto muy ligada a la patogenia de la COVID-19. El término tormenta de citocinas fue acuñado por primera vez en 1993 para describir la enfermedad de injerto contra huésped<sup>24</sup>, desde entonces se ha extendido su uso para describir la liberación repentina de citocinas que ocurre asociada a enfermedades autoinmunes, linfocitosis hemofagocítica sepsis, cáncer y enfermedades infecciosas<sup>25</sup>. Muchas citocinas inflamatorias se han involucrado con la COVID-19 entre ellas la IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-17, IFN- $\gamma$ , IP-10 entre otras. Se ha visto que los niveles elevados de IL-6 contribuyen al aumento de neutrófilos y disminución de linfocitos. Además tiene un impacto directo en la aparición de SDRA en los pacientes<sup>26</sup>.

## **VI. NETosis y SDRA**

Existen reportes en lo que se ha asociado a la formación aberrante de NETs con el SDRA. Los neutrófilos de pacientes con SDRA parecen estar “preparados” para la formación de NETs y tanto el grado de “sensibilización” como los niveles de NETs en sangre se han correlacionado con la gravedad y la mortalidad de la enfermedad<sup>27,28,29,30</sup>. Además las histonas que se encuentran en las NETs son tóxicas para las células y se han encontrado en niveles elevados en lavados bronquioalveolares y plasma de los pacientes con SDRA.

## **VII. Eliminación de NETs**

Los mecanismos para la eliminación de las NETs son poco entendidos. Durante la infección, las NETs persisten durante varios días<sup>31</sup> y se cree que son degradadas por la nucleasa plasmática DNasa I.<sup>32</sup> La inyección de esta enzima durante la infección por *S. aureus* conduce a una rápida degradación del ADN asociado a NET, pero se desconoce la dinámica del aclaramiento de NET por las enzimas endógenas. Las proteínas de las NETs persisten posterior a la degradación del ADN<sup>33</sup>, lo que sugiere que existen mecanismos de depuración adicionales que podrían involucrar la captación de macrófagos, ya que la DNasa I facilita la ingestión de NET por los macrófagos in vitro.<sup>34</sup>

En resumen, los neutrófilos y la NETosis se ha visto incrementados en pacientes con COVID-19. Se desconoce si existen diferencias en la producción de NETs por LDG y neutrófilos convencionales en dichos pacientes y si su degradación es normal.



## **Planteamiento del problema y justificación**

Actualmente, el mundo se encuentra enfrentando una pandemia por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2, que produce una enfermedad nueva en seres humanos conocida como COVID-19. Aunque recientemente se ha descrito a la NETosis como un mecanismo de daño tisular en COVID-19, se desconoce si los granulocitos de baja densidad representan una fuente importante de NETs en dicha enfermedad. Finalmente, realizar este estudio contribuirá a entender mejor el efecto patogénico de los neutrófilos y NETs en pacientes con COVID-19 y plantear posibles estrategias terapéuticas.

## **Objetivos**

### **Objetivo primario.**

Analizar el papel de la NETosis en la fisiopatogenia del COVID-19

### **Objetivos específicos.**

Evaluar la proporción de granulocitos de baja densidad y NETs circulantes en pacientes con COVID-19

Analizar la capacidad de los granulocitos de baja y normal densidad para producir NETs y su contenido proteico

Determinar la capacidad sérica de eliminación de las NETs

### **Hipótesis.**

Los pacientes con COVID-19 tendrán una mayor producción y menor degradación de las NETs en comparación con controles sanos

## **Material y métodos**

Se realizó un estudio transversal en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, un centro de atención de referencia para pacientes con COVID-19. Se incluyeron 82 pacientes con COVID-19 confirmada por PCR para SARS-CoV-2. La gravedad de la COVID-19 se clasificó de acuerdo a los siguientes criterios<sup>35</sup>:

1. Enfermedad leve/moderada: fiebre, síntomas de infección de vías aéreas superiores con o sin neumonía.
2. Grave: cualquiera de los siguientes: insuficiencia respiratoria, frecuencia respiratoria  $\geq 30$  respiraciones por minuto, saturación de oxígeno en reposo  $\leq 93\%$  o  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$  mmHg.
3. Crítica: cualquiera de las siguientes: requerimiento de ventilación mecánica invasiva (VMI), choque, falla orgánica múltiple.

Se excluyeron a los pacientes con cáncer, enfermedades autoinmunes, embarazo, puerperio, enfermedades virales crónicas e infecciones agudas por bacterias u hongos. En todos los pacientes se realizó una historia clínica completa, pruebas de laboratorio y una tomografía computarizada pulmonar con dosis bajas de radiación previo al inicio de tratamiento farmacológico en el departamento de urgencias.

El protocolo fue aprobado por el comité Institucional de Ética e Investigación (REF: 3341) en conformidad con la declaración de Helsinki. Todos los pacientes y controles firmaron un consentimiento informado previo a la inclusión al estudio.

Con la finalidad de evaluar el papel de las NETs en la hiperinflamación y autoinmunidad en la COVID-19 se realizaron los siguientes procedimientos:

**1. Evaluación de la proporción de LDGs por citometría de flujo multiparamétrica.**

El porcentaje y números absolutos de LDGs se midió mediante citometría de flujo posterior al aislamiento de células mononucleares (CMNs) mediante gradientes de densidad con Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences, Illinois, EE.UU.). Se tomaron como LDGs aquellas células CD14-, CD15+ en el gate de células mononucleares y se usó CD10 como marcador de madurez (todos los anticuerpos de citometría fueron de Biolegend, California, EE.UU.). Un millón de eventos fueron adquiridos en un citómetro de flujo LSR Fortessa (BD Biosciences, Nueva Jersey, EE.UU.). Los datos fueron analizados con el software Flow-Jo v10.7.

**2. Cuantificación de la cantidad de NETs de LDGs y NDGs por microscopía confocal**

Los LDGs fueron aislados de las CMNs por selección con columnas LS (Miltenyi Biotec, Renania del Norte-Westfalia, Alemania) utilizando las perlas magnéticas CD66b (Miltenyi Biotec, Renania del Norte-Westfalia, Alemania) según las instrucciones del fabricante. La viabilidad y pureza fueron >90% de acuerdo con la tinción de azul tripano y citometría de flujo respectivamente. Los granulocitos de densidad normal (NDG) fueron aislados por sedimentación con dextrán. Dos millones de LDGs o NDGs fueron resuspendidos en buffer de incubación de incubación (RPMI sin rojo fenol, 1% suero bovino fetal, 1% de 10 mM HEPES), para posteriormente ser sembrados en cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina (Gibco, Massachusetts, EE.UU.). Las muestras se incubaron durante 40 minutos a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% y se fijaron toda la noche a 4°C con paraformaldehído al 4% (Merck, Nueva Jersey, EE.UU.). Posteriormente, las muestras fueron lavadas tres veces con PBS, se permeabilizaron con tritón X-100 al 0.2% durante diez minutos y los sitios de unión no específicos fueron bloqueados con gelatina porcina al 0.2% (Merck, Nueva Jersey, EE.UU.) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las muestras se incubaron con rabbit anti-MPO (Agilent, California, EE.UU.). Las muestras se montaron en laminillas con ProLong Gold con DAPI (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal Eclipse Ti-E Nikon (Minato, Tokio, Japón). La cantidad de NETs se cuantificó dividiendo el número de estructuras en las que colocalizó MPO-ADN entre el número de núcleos en ocho campos a 40X.<sup>10,39</sup> La longitud de los NET se calculó utilizando el complemento SNT de Fiji como se ha descrito anteriormente<sup>19</sup> mediante el software Fiji.

**3. Evaluación de la degradación de las NETs por suero.**

Se estimularon 3 millones de neutrófilos de controles sanos con 2.5 micromolar forbol miristato acetato (PMA) (Merck, Nueva Jersey, EE.UU.) durante 4 horas para inducir la NETosis. Las muestras fueron incubadas con suero al 10% en RPMI sin fenol rojo *durante la noche* a 37°C y con CO<sub>2</sub> al 5%. Después de fijarse, se marcaron las muestras con rabbit anti-MPO como se describió arriba. Para calcular el porcentaje de degradación de las NETs, se cuantificó la cantidad de NETs restantes posterior a los estímulos con suero 10% con o sin la adición de nucleasa microcócica 1:10000 o DNAsa recombinante humana (1U/mL) (Thermo Scientific, IL, EE.UU.) en comparación con la NETosis inducida por PMA sin estímulos.

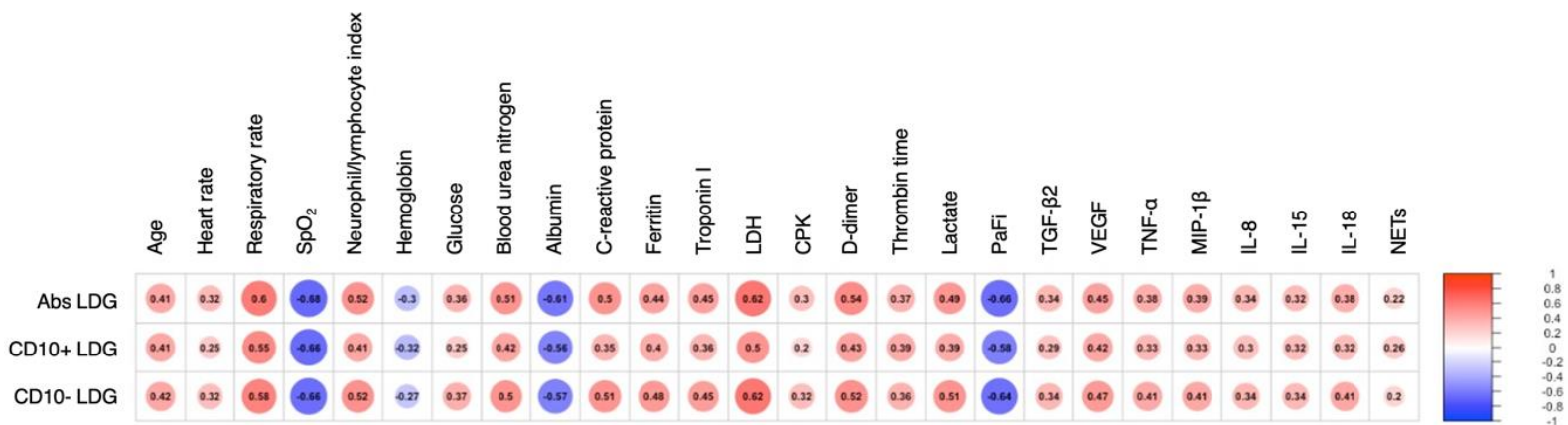
**4. Análisis estadístico.**

Las variables cuantitativas se expresaron como medianas e intervalos intercuartiles (IQR). Las diferencias entre las medianas fueron evaluadas por las pruebas de

Kruskal Wallis y U de Mann-Whitney. La correlación entre las variables cuantitativas fue analizada por la prueba de Spearman Rho y representadas como una matriz de correlación. La asociación entre variables cualitativas se analizó con la prueba Chi-cuadrada.

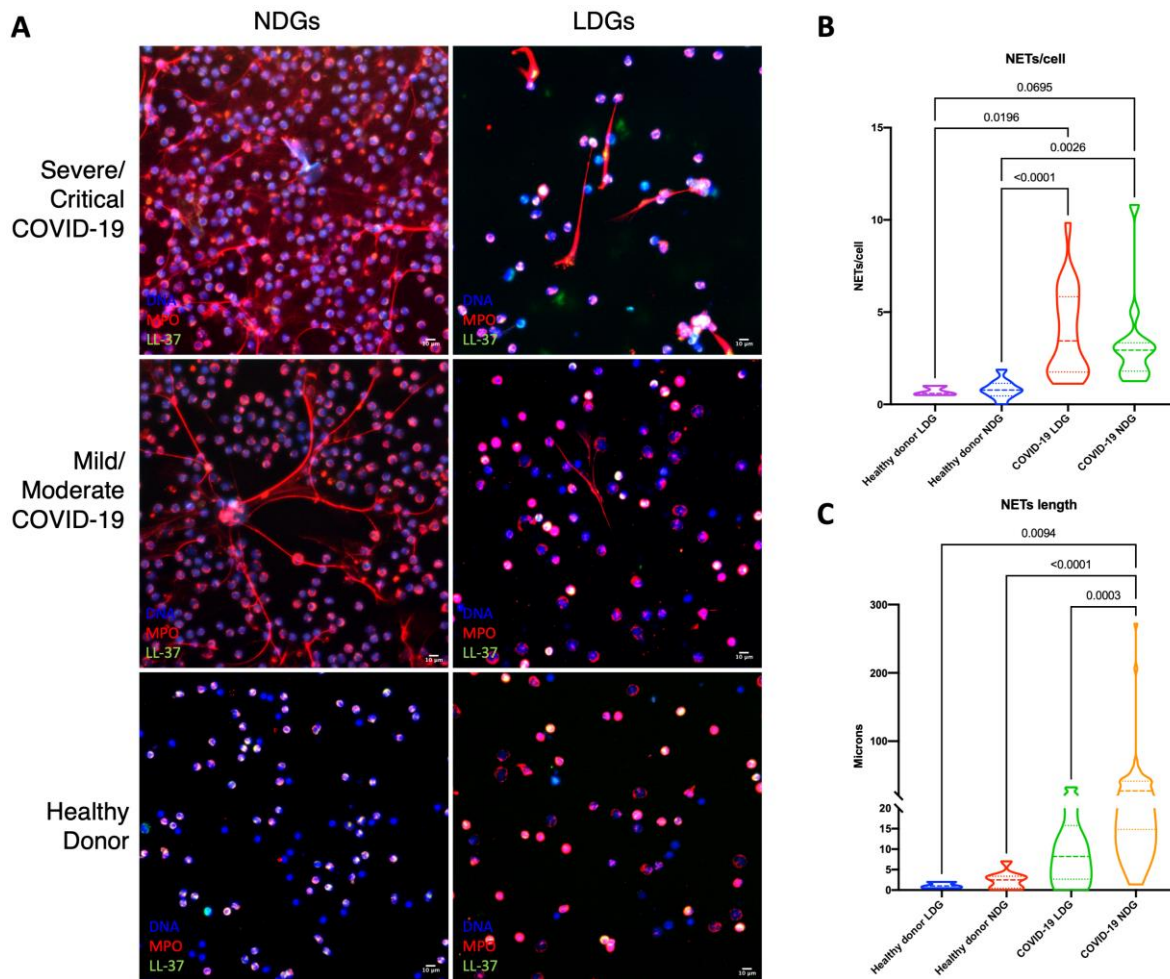
## Resultados

La COVID-19 se caracteriza por la producción de LDGs inmaduros. El porcentaje y el número absoluto de LDGs maduros e inmaduros fue mayor en los pacientes con COVID-19 grave o crítica (Tabla 1). Los LDGs de pacientes con COVID-19 tenían un fenotipo predominantemente inmaduro, como se demostró por la ausencia de expresión de CD10. Como se muestra en la Figura 1, los subconjuntos de LDGs se correlacionaron con características clínicas distintivas de COVID-19.



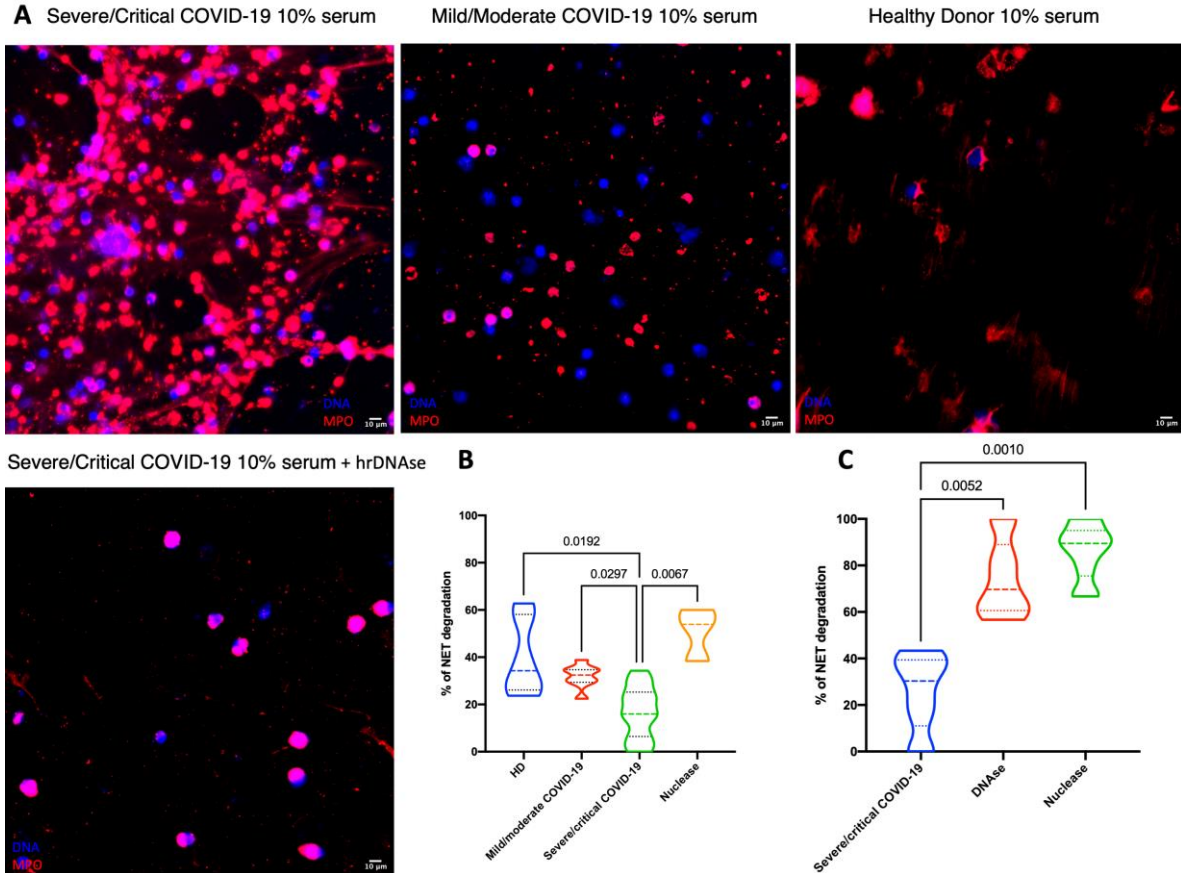
**Figura 1. Los subgrupos de LDGs correlacionan con diferentes características biológicas de la COVID-19.** Se muestra una matriz de correlación con las variables estadísticamente significativas.

Los NDGs de los pacientes con COVID-19 son la principal fuente de NETosis espontánea. Se evaluó la capacidad de los NDGs y los LDGs para producir NETs *ex vivo*. Como se muestra en la Figura 2, tanto los NDGs como los LDGs de pacientes con COVID-19 tienen una NETosis aumentada, sin embargo, las NETs de los NDGs se caracterizan por una mayor longitud.



**Figura 2. Los LDGs y NDGs de los pacientes con COVID-19 son propensos a NETosis espontánea.** A. Imagen representativa de microscopía confocal de NETs espontáneas de los subconjuntos de neutrófilos de COVID-19 según la gravedad de la enfermedad. B. Los LDGs de los pacientes con COVID-19 tienen una mayor cantidad de NETs. C. Los NDGs de los pacientes con COVID-19 tienen una longitud mayor.

*El suero de los pacientes con COVID-19 grave y crítica, tienen una degradación deficiente de las NETs, que se corrige posterior a la aplicación de DNAsa recombinante humana.* Después de encontrar que los pacientes con COVID-19 tienen una NETosis aumentada, se decidió probar si los pacientes con esta infección tenían una degradación deficiente de las NETs. Como se muestra en la Figura 4, el suero de los pacientes con COVID-19 grave o crítica tenían un porcentaje más bajo de degradación de NETs en comparación con donadores sanos y los pacientes con COVID-19 leve o moderada al ser tratados con nucleasa microcócica (15.98 (6.42-25.20) vs 34.29 (26.12-58.11) vs 32.45 (29.39-34.69) y 53.88 (38.88-60.00) respectivamente,  $P=0.0004$ ).



**Figura 3. Los pacientes con COVID-19 grave y crítica tienen una degradación de NETs deficiente.** A. Imagen representativa de microscopía confocal de la capacidad de degradación de NETs de acuerdo con la gravedad de la COVID-19. La degradación deficiente se corrige posterior a la adición de DNAsa humana recombinante. B-C. Los pacientes con COVID-19 grave o crítica tienen una degradación deficiente de las NETs en comparación con los pacientes con COVID 19 leve o moderada y los donadores sanos (B). La degradación deficiente de las NETs se revierte después de la adición de DNAsa humana recombinante y nucleasa microcócica.

## Discusión

En este estudio, se encontró que los pacientes con enfermedad grave o crítica por SARS-CoV-2 tienen una producción aumentada de NETs, así como una degradación deficiente de las mismas.

La respuesta inmune innata contra el SARS-CoV-2 empieza con el reconocimiento de sus ácidos nucleicos por receptores de RNA, incluyendo los TLR2, TLR7, RIG-1 y MDA5, con la consecuente liberación de interferones tipo I y III, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-18.<sup>36</sup> El reconocimiento de los virus por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) promueve y aumenta la liberación de ciertos mediadores inflamatorios como los son la IL-8 e IL-17, lo cual favorece la quimiotaxis de neutrófilos a los pulmones<sup>37</sup> y eventualmente se favorece la mielopoiesis de emergencia con el consecuente inicio de la tormenta de citocinas y daño a diversos órganos.<sup>38</sup>

Dada la mielopoiesis de emergencia los neutrófilos de los pacientes con COVID-19, tienen un fenotipo inmaduro como se ha podido mostrar por la presencia de expresión baja de

CD10<sup>37</sup>, CD16,  $\beta$ -galactosidasa y aumento de la degranulación<sup>39</sup> lo cual se encontró también en este estudio.

En enfermedades autoinmunes se había encontrado que los LDGs se caracterizan por un fenotipo activo más propenso a formar NETs en comparación con los NDGs.<sup>10</sup> Sin embargo, se encontró que en COVID-19, los NDGs son la fuente principal de NETs. Este hallazgo puede ser compatible con que los LDGs de los pacientes con COVID-19 son similares a las células mieloides supresoras dada la expresión de PDL1, lo cual puede explicar su baja capacidad de producción de NETs.

Las citocinas proinflamatorias, complejos inmunes y productos microbianos son moléculas que pueden aumentar la NETosis.<sup>40</sup> Los NDGs de los pacientes con COVID-19 grave o crítico pueden estar cebados *in vivo* para producir espontáneamente NETs, ya que están expuestos a IL-6, IL-2, IL-7, TNF, CXCL10, MCP-1, MIP1a, GM-CSF y M-CSF durante la tormenta de citosinas.<sup>41</sup>

Además, se han detectado productos bacterianos como rRNA 16s y LPS en paciente con COVID grave o crítico sin infecciones bacterianas concomitantes y es sabido que los pacientes con COVID-19 grave tienen disminución en la fucosilación de IgG aumentando los niveles de IgG3, IgM e IgA.<sup>42</sup> La IgG1 con  $\alpha$ -fucosilación e IgG3 favorecen la interacción con los receptores proinflamatorios Fc $\gamma$  que también inducen NETosis espontánea.<sup>40</sup>

En las infecciones virales, las NETs son tanto un mecanismo de defensa como mediadores de daño tisular en los pulmones. Estudios previos han demostrado que el SARS-CoV-2 desencadena la NETosis posterior a la activación de ACE2 e infecta a los neutrófilos, haciendo que estos sean más propensos a la NETosis.<sup>19</sup> En este sentido, las NETs se han detectado en alveolos, intersticio pulmonar, bronquios y vasos sanguíneos pulmonares<sup>43</sup>, hígado y glomérulos de los pacientes con COVID-19.<sup>44</sup>

Las NETs promueven el daño pulmonar por medio de la inducción de apoptosis de células alveolares<sup>19</sup> y aumento de la densidad de las secreciones.<sup>21</sup> Además las NETs promueven la inmunotrombosis por medio de la captura de moléculas protrombóticas incluyendo plaquetas, FvW, factor tisular, histonas, HMGB-1, proteasas de neutrófilos y fibrinógeno; al mismo tiempo se degradan moléculas anticoagulantes como la trombosmodulina.<sup>21</sup>

También encontramos que el suero de los pacientes críticamente enfermos y con COVID -19 grave, tienen alteraciones en el aclaramiento de los componentes de las NETs, esta deficiencia puede ser revertida tras la administración de DNasa humana recombinante. Estos datos sugieren una inhibición *in vivo* o una deficiencia de DNasa endógena. Otros virus como el adenovirus tipo 5 tienen proteínas específicas que se unen al ADN, que actúan como inhibidores de la DNasa.<sup>45</sup> En ese sentido, los niveles plasmáticos de DNasa-1 se reducen notablemente en pacientes con sepsis por SARS-CoV-2.<sup>46</sup> Las nanopartículas de acción prolongada recubiertas de DNasa-1 se han sugerido como una intervención terapéutica para reducir eficientemente la producción de citocinas inducidas por NETosis y NF- $\kappa$ B en un modelo de ratón séptico al mejorar la estabilidad de la enzima.<sup>46</sup> Otro efecto beneficioso de DNasa es su papel potencial en la viscoelasticidad de las secreciones de las vías respiratorias, disminuyendo la gravedad del COVID-19 y mejorando la función pulmonar.<sup>47</sup> Además, la administración de dornasa alfa en pacientes con COVID-19 ha demostrado mejorar la NETosis *in vitro* y el aclaramiento viral, incluso 72 horas después de la aparición del primer síntoma.<sup>47</sup> Se deben realizar más estudios para revelar si las proteínas SARS-CoV-2 son capaces de inhibir la actividad de la DNasa.

## Conclusiones

Los pacientes con COVID-19 tienen un enriquecimiento en los granulocitos, incluyendo aquellos de baja densidad y con fenotipo inmaduro. Tanto los LDG como los neutrófilos convencionales producen NETs espontáneas, siendo más largas las de los neutrófilos convencionales. Los pacientes con COVID-19 tienen deficiencia en la degradación de NETs, se requieren nuevos estudios para verificar la causa de la deficiencia de la función de DNasa en dichos pacientes.

## Referencias bibliográficas

1. Clinical Microbiology Reviews. «Coronavirus Disease 2019–COVID-19». Accedido 20 de marzo de 2021. <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/CMR.00028-20>.
2. Hui, David S., Esam I Azhar, Tariq A. Madani, Francine Ntoumi, Richard Kock, Osman Dar, Giuseppe Ippolito, et al. «The Continuing 2019-NCoV Epidemic Threat of Novel Coronaviruses to Global Health — The Latest 2019 Novel Coronavirus Outbreak in Wuhan, China». *International Journal of Infectious Diseases* 91 (febrero de 2020): 264-66. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.01.009>.
3. Bonilla-Aldana, D. Katterine, Kuldeep Dhama, y Alfonso J. Rodriguez-Morales. «Revisiting the One Health Approach in the Context of COVID-19: A Look into the Ecology of this Emerging Disease». *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 8, n.º 3 (2020). <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2020/8.3.234.237>.
4. Chan, Jasper Fuk-Woo, Shuofeng Yuan, Kin-Hang Kok, Kelvin Kai-Wang To, Hin Chu, Jin Yang, Fanfan Xing, et al. «A Familial Cluster of Pneumonia Associated with the 2019 Novel Coronavirus Indicating Person-to-Person Transmission: A Study of a Family Cluster». *The Lancet* 395, n.º 10223 (febrero de 2020): 514-23. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30154-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9).
5. Wiersinga, W. Joost, Andrew Rhodes, Allen C. Cheng, Sharon J. Peacock, y Hallie C. Prescott. «Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review». *JAMA* 324, n.º 8 (25 de agosto de 2020): 782. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.12839>.
6. Brinkmann, V. «Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria». *Science* 303, n.º 5663 (5 de marzo de 2004): 1532-35. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>.
7. Saitoh, Tatsuya, Jun Komano, Yasunori Saitoh, Takuma Misawa, Michihiro Takahama, Tatsuya Kozaki, Takuya Uehata, et al. «Neutrophil Extracellular Traps Mediate a Host Defense Response to Human Immunodeficiency Virus-1». *Cell Host & Microbe* 12, n.º 1 (julio de 2012): 109-16. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.05.015>.
8. Papayannopoulos, Venizelos. «Neutrophil Extracellular Traps in Immunity and Disease». *Nature Reviews Immunology* 18, n.º 2 (febrero de 2018): 134-47. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.105>.

9. Cooper, Paul R., Lisa J. Palmer, y Iain L. C. Chapple. «Neutrophil Extracellular Traps as a New Paradigm in Innate Immunity: Friend or Foe?» *Periodontology 2000* 63, n.º 1 (octubre de 2013): 165-97. <https://doi.org/10.1111/prd.12025>.
10. Carmona-Rivera, Carmelo, y Mariana J. Kaplan. «Low-Density Granulocytes: A Distinct Class of Neutrophils in Systemic Autoimmunity». *Seminars in Immunopathology* 35, n.º 4 (julio de 2013): 455-63. <https://doi.org/10.1007/s00281-013-0375-7>.
11. Cloke, Thomas, Markus Munder, Graham Taylor, Ingrid Müller, y Pascale Kropf. «Characterization of a Novel Population of Low-Density Granulocytes Associated with Disease Severity in HIV-1 Infection». Editado por Adriano Boasso. *PLoS ONE* 7, n.º 11 (13 de noviembre de 2012): e48939. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048939>.
12. Morisaki, Takashi, Tomomochi Goya, Toshiyuki Ishimitsu, y Motomichi Torisu. «The Increase of Low Density Subpopulations and CD10 (CALLA) Negative Neutrophils in Severely Infected Patients». *Surgery Today* 22, n.º 4 (1992): 322-27. <https://doi.org/10.1007/BF00308740>.
13. Niedźwiedzka-Rystwej, Paulina, Weronika Repka, Beata Tokarz-Deptuła, y Wiesław Deptuła. «“In sickness and in health” – how neutrophil extracellular trap (NET) works in infections, selected diseases and pregnancy». *Journal of Inflammation* 16, n.º 1 (28 de junio de 2019): 15. <https://doi.org/10.1186/s12950-019-0222-2>.
14. Cicco, Sebastiano, Gerolamo Cicco, Vito Racanelli, y Angelo Vacca. «Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs): Two Potential Targets for COVID-19 Treatment». Review Article. *Mediators of Inflammation*, 16 de julio de 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/7527953>.
15. Narasaraju, Teluguakula, Edwin Yang, Ramar Perumal Samy, Huey Hian Ng, Wee Peng Poh, Audrey-Ann Liew, Meng Chee Phoon, Nico van Rooijen, y Vincent T. Chow. «Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Contribute to Acute Lung Injury of Influenza Pneumonitis». *The American Journal of Pathology* 179, n.º 1 (julio de 2011): 199-210. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.03.013>.
16. Schönrich, Günther, y Martin J. Raftery. «Neutrophil Extracellular Traps Go Viral». *Frontiers in Immunology* 7 (19 de septiembre de 2016). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00366>.
17. Mehta, Puja, Daniel F McAuley, Michael Brown, Emilie Sanchez, Rachel S Tattersall, y Jessica J Manson. «COVID-19: Consider Cytokine Storm Syndromes and Immunosuppression». *The Lancet* 395, n.º 10229 (marzo de 2020): 1033-34. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0).
18. Zuo, Yu, Srilakshmi Yalavarthi, Hui Shi, Kelsey Gockman, Melanie Zuo, Jacqueline A. Madison, Christopher N. Blair, et al. «Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19». *JCI Insight*, 24 de abril de 2020. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.138999>.
19. Veras, Flavio Protasio, Marjorie Cornejo Pontelli, Camila Meirelles Silva, Juliana E. Toller-Kawahisa, Mikhael de Lima, Daniele Carvalho Nascimento, Ayda Henriques



- Schneider, et al. «SARS-CoV-2–Triggered Neutrophil Extracellular Traps Mediate COVID-19 Pathology». *Journal of Experimental Medicine* 217, n.º 12 (7 de diciembre de 2020): e20201129. <https://doi.org/10.1084/jem.20201129>.
20. Engelmann, Bernd, y Steffen Massberg. «Thrombosis as an Intravascular Effector of Innate Immunity». *Nature Reviews Immunology* 13, n.º 1 (enero de 2013): 34-45. <https://doi.org/10.1038/nri3345>.
  21. Jayarangaiah, Apoorva, Pramod Theetha Kariyanna, Xiaoyi Chen, Amog Jayarangaiah, y Abhishek Kumar. «COVID-19-Associated Coagulopathy: An Exacerbated Immunothrombosis Response». *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 26 (1 de enero de 2020): 1076029620943293. <https://doi.org/10.1177/1076029620943293>.
  22. Swystun, Laura L., y Patricia C. Liaw. «The Role of Leukocytes in Thrombosis». *Blood* 128, n.º 6 (11 de agosto de 2016): 753-62. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-05-718114>.
  23. Takano, S., S. Kimura, S. Ohdama, y N. Aoki. «Plasma Thrombomodulin in Health and Diseases». *Blood* 76, n.º 10 (15 de noviembre de 1990): 2024-29.
  24. Ferrara, J. L., S. Abhyankar, y D. G. Gilliland. «Cytokine Storm of Graft-versus-Host Disease: A Critical Effector Role for Interleukin-1». *Transplantation Proceedings* 25, n.º 1 Pt 2 (febrero de 1993): 1216-17.
  25. Chousterman, Benjamin G., Filip K. Swirski, y Georg F. Weber. «Cytokine Storm and Sepsis Disease Pathogenesis». *Seminars in Immunopathology* 39, n.º 5 (julio de 2017): 517-28. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0639-8>.
  26. Wang, Jin, Mengmeng Jiang, Xin Chen, y Luis J. Montaner. «Cytokine Storm and Leukocyte Changes in Mild versus Severe SARS-CoV-2 Infection: Review of 3939 COVID-19 Patients in China and Emerging Pathogenesis and Therapy Concepts». *Journal of Leukocyte Biology* 108, n.º 1 (julio de 2020): 17-41. <https://doi.org/10.1002/JLB.3COVR0520-272R>.
  27. Bendib, Inès, Luc de Chaisemartin, Vanessa Granger, Frédéric Schlemmer, Bernard Maitre, Sophie Hüe, Mathieu Surenaud, et al. «Neutrophil Extracellular Traps Are Elevated in Patients with Pneumonia-Related Acute Respiratory Distress Syndrome». *Anesthesiology* 130, n.º 4 (1 de abril de 2019): 581-91. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000002619>.
  28. Ebrahimi, Fahim, Stavros Giaglis, Sinuhe Hahn, Claudine A. Blum, Christine Baumgartner, Alexander Kutz, Shane Vontelin van Breda, et al. «Markers of Neutrophil Extracellular Traps Predict Adverse Outcome in Community-Acquired Pneumonia: Secondary Analysis of a Randomised Controlled Trial». *European Respiratory Journal* 51, n.º 4 (abril de 2018): 1701389. <https://doi.org/10.1183/13993003.01389-2017>.
  29. Lefrançois, Emma, Beñat Mallavia, Hanjing Zhuo, Carolyn S. Calfee, y Mark R. Looney. «Maladaptive Role of Neutrophil Extracellular Traps in Pathogen-Induced

- Lung Injury». *JCI Insight* 3, n.º 3 (8 de febrero de 2018): e98178. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.98178>.
30. Mikacenic, Carmen, Richard Moore, Victoria Dmyterko, T. Eoin West, William A. Altemeier, W. Conrad Liles, y Christian Lood. «Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Are Increased in the Alveolar Spaces of Patients with Ventilator-Associated Pneumonia». *Critical Care* 22, n.º 1 (diciembre de 2018): 358. <https://doi.org/10.1186/s13054-018-2290-8>.
  31. Branzk, Nora, Aleksandra Lubojemska, Sarah E Hardison, Qian Wang, Maximiliano G Gutierrez, Gordon D Brown, y Venizelos Papayannopoulos. «Neutrophils Sense Microbe Size and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps in Response to Large Pathogens». *Nature Immunology* 15, n.º 11 (noviembre de 2014): 1017-25. <https://doi.org/10.1038/ni.2987>.
  32. Hakkim, A., B. G. Furnrohr, K. Amann, B. Laube, U. A. Abed, V. Brinkmann, M. Herrmann, R. E. Voll, y A. Zychlinsky. «Impairment of Neutrophil Extracellular Trap Degradation Is Associated with Lupus Nephritis». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, n.º 21 (25 de mayo de 2010): 9813-18. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909927107>.
  33. Kolaczowska, Elzbieta, Craig N. Jenne, Bas G. J. Surewaard, Ajitha Thanabalasuriar, Woo-Yong Lee, Maria-Jesus Sanz, Kerri Mowen, Ghislain Opendakker, y Paul Kubes. «Molecular Mechanisms of NET Formation and Degradation Revealed by Intravital Imaging in the Liver Vasculature». *Nature Communications* 6, n.º 1 (mayo de 2015): 6673. <https://doi.org/10.1038/ncomms7673>.
  34. Farrera, Consol, y Bengt Fadeel. «Macrophage Clearance of Neutrophil Extracellular Traps Is a Silent Process». *The Journal of Immunology* 191, n.º 5 (1 de septiembre de 2013): 2647-56. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300436>.
  35. Liu, Wei, Zhao-Wu Tao, Lei Wang, Ming-Li Yuan, Kui Liu, Ling Zhou, Shuang Wei, et al. «Analysis of Factors Associated with Disease Outcomes in Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus Disease». *Chinese Medical Journal* 133, n.º 9 (5 de mayo de 2020): 1032-38. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000775>.
  36. Vabret, Nicolas, Graham J. Britton, Conor Gruber, Samarth Hegde, Joel Kim, Maria Kuksin, Rachel Levantovsky, et al. «Immunology of COVID-19: Current State of the Science». *Immunity* 52, n.º 6 (junio de 2020): 910-41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.05.002>.
  37. Pelaia, Corrado, Caterina Tinello, Alessandro Vatrella, Giovambattista De Sarro, y Girolamo Pelaia. «Lung under Attack by COVID-19-Induced Cytokine Storm: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Implications». *Therapeutic Advances in Respiratory Disease* 14 (enero de 2020): 175346662093350. <https://doi.org/10.1177/1753466620933508>.
  38. Mann, Elizabeth R., Madhvi Menon, Sean Blandin Knight, Joanne E. Konkel, Christopher Jagger, Tovah N. Shaw, Siddharth Krishnan, et al. «Longitudinal Immune Profiling Reveals Distinct Features of COVID-19 Pathogenesis». Preprint.

Infectious Diseases (except HIV/AIDS), 16 de junio de 2020.  
<https://doi.org/10.1101/2020.06.13.20127605>.

39. Parackova, Zuzana, Irena Zentsova, Petra Vrabcova, Adam Klocperk, Zdenek Sumnik, Stepanka Pruhova, Lenka Petruzekova, Robert Hasler, y Anna Sediva. «Neutrophil Extracellular Trap Induced Dendritic Cell Activation Leads to Th1 Polarization in Type 1 Diabetes». *Frontiers in Immunology* 11 (14 de abril de 2020): 661. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00661>.
40. Kaplan, Mariana J., y Marko Radic. «Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity». *The Journal of Immunology* 189, n.º 6 (15 de septiembre de 2012): 2689-95. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201719>.
41. Korakas, Emmanouil, Ignatios Ikonomidis, Foteini Kousathana, Konstantinos Balampanis, Aikaterini Kountouri, Athanasios Raptis, Lina Palaiodimou, Alexander Kokkinos, y Vaia Lambadiari. «Obesity and COVID-19: Immune and Metabolic Derangement as a Possible Link to Adverse Clinical Outcomes». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 319, n.º 1 (1 de julio de 2020): E105-9. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00198.2020>.
42. Chakraborty, Saborni, Joseph C. Gonzalez, Benjamin L. Sievers, Vamsee Mallajosyula, Megha Dubey, Bowie Yik-Ling Cheng, Kim Quyen Thi Tran, et al. «Divergent Early Antibody Responses Define COVID-19 Disease Trajectories». Preprint. *Immunology*, 25 de mayo de 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.05.25.445649>.
43. Radermecker, Coraline, Nancy Detrembleur, Julien Guiot, Etienne Cavalier, Monique Henket, Céline d'Emal, Céline Vanwinge, et al. «Neutrophil Extracellular Traps Infiltrate the Lung Airway, Interstitial, and Vascular Compartments in Severe COVID-19». *Journal of Experimental Medicine* 217, n.º 12 (7 de diciembre de 2020): e20201012. <https://doi.org/10.1084/jem.20201012>.
44. Leppkes, Moritz, Jasmin Knopf, Elisabeth Naschberger, Aylin Lindemann, Jeeshan Singh, Irmgard Herrmann, Michael Stürzl, et al. «Vascular Occlusion by Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19». *EBioMedicine* 58 (agosto de 2020): 102925. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102925>.
45. Nass, K, y G D Frenkel. «Adenovirus-Induced Inhibition of Cellular DNase». *Journal of Virology* 26, n.º 2 (mayo de 1978): 540-43. <https://doi.org/10.1128/jvi.26.2.540-543.1978>.
46. Lee, Yun Young, Hee Ho Park, Wooram Park, Hyelim Kim, Jong Geol Jang, Kyung Soo Hong, Jae-Young Lee, et al. «Long-Acting Nanoparticulate DNase-1 for Effective Suppression of SARS-CoV-2-Mediated Neutrophil Activities and Cytokine Storm». *Biomaterials* 267 (enero de 2021): 120389. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120389>.
47. Okur, H.K., K. Yalcin, C. Tastan, S. Demir, B. Yurtsever, G.S. Karakus, D.D. Kancagi, et al. «Preliminary Report of in Vitro and in Vivo Effectiveness of Dornase Alfa on SARS-CoV-2 Infection». *New Microbes and New Infections* 37 (septiembre de 2020): 100756. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100756>