



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Biotecnología

Estudio in vitro de la modulación ejercida por los neutrófilos  
y la NETosis sobre las células en el  
cáncer vesical

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Biomédica

AUTOR/A: Ibiza Guijarro, Patricia

Tutor/a: Sirera Pérez, Rafael

Cotutor/a externo: MEDINA BADENES, PILAR

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**

**Departamento de Biotecnología**



**Trabajo de fin de Máster del máster en Biotecnología Biomédica**

**Estudio *in vitro* de la modulación ejercida por los neutrófilos y la NETosis sobre las células en el cáncer vesical**

**Alumna: Patricia Ibiza Guijarro**

**Tutor UPV: Rafael Sirera Pérez**

**Tutora externa: Pilar Medina Badenes**

**Curso Académico: 2022-2023**

**VALENCIA, 2023**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a todo el grupo de Hemostasia, Trombosis, Arterioesclerosis y Biología Vascular del IIS La Fe el haberme dado la oportunidad de poder realizar el TFM con ellos, he aprendido mucho durante todos estos meses siempre guiada por los miembros del grupo. Con ellos he aprendido cómo es el trabajo en un grupo de investigación, el compañerismo y el trabajo en equipo que todo ello conlleva. Por todo ello gracias a mi tutora Pili por haberme guiado durante todo el camino, a Raquel por el trabajo codo con codo y a Emma, Fernando, María e Isabel por el compañerismo, la ayuda, los consejos, el buen ambiente y las risas durante estos meses. Gracias también a Rafa mi tutor académico por haber resuelto siempre mis dudas al momento.

También agradecer siempre a mi familia y amigos, su apoyo constante en mis decisiones y objetivos. Mis valores y principios son gracias a vosotros. Que decir que no sepáis ya, gracias.

Por último, Lucia y Carlota, agradeceros la familia que habéis sido para mí este año, lo mejor de esta etapa, sin duda, ha sido sentirme comprendida y arropada con vosotras, siempre juntas y ayudándonos las unas a las otras cuando fuese necesario tanto con el trabajo como en lo personal. El descubrimiento más bonito en estos meses de investigación, habéis sido vosotras.

## RESUMEN

El cáncer vesical es la enfermedad urológica más letal, encontrándose dentro del grupo de las neoplasias más frecuentes a nivel mundial. Existen diferentes mecanismos asociados a los distintos tipos de cáncer y que, por ende, favorecen la progresión de la enfermedad, entre los que cabe destacar la presencia de neutrófilos y sus funciones asociadas. Los neutrófilos son el tipo de glóbulo blanco más abundante del sistema inmunitario. Tras su activación presentan mecanismos de defensa del organismo como la fagocitosis, degranulación y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). Los NETs son redes extracelulares liberadas por el propio neutrófilo en un proceso denominado NETosis. Estas redes están formadas por ADN recubierto de histonas y diversas proteínas presentes en el citoplasma o en los gránulos de los neutrófilos. Aunque los NETs presentan un papel crucial a la hora de defender al organismo contra las infecciones, también se ha visto su implicación en condiciones no infecciosas como en la progresión del cáncer y la inmunotrombosis, entre otras.

En este trabajo se ha estudiado el efecto de los NETs, en la proliferación, migración e invasión de las células de cáncer vesical. Para ello se obtuvieron NETs a partir de neutrófilos de voluntarios sanos estimulados con PMA. Se realizaron ensayos *in vitro* de migración, proliferación e invasión con tres líneas celulares: T24 (cáncer vesical transicional de grado 3), 5637 (cáncer vesical de grado 2) y SV-HUC1 (urotelio sano), las cuales se trataron con diferentes concentraciones de NETs. El tratamiento con NETs de las células T24 de subtipo más grave disminuyó su capacidad de migración, mientras que no modificó su capacidad de proliferación o invasión. El tratamiento con concentraciones altas de NETs de las células de cáncer vesical 5637 de subtipo más leve disminuyó su capacidad de invasión, mientras que no modificó su capacidad de proliferación o migración. Por último, el tratamiento con concentraciones bajas de NETs de las células SV-HUC-1 de urotelio sano aumentó su capacidad de proliferación, mientras que las concentraciones altas de NETs parecen ser citotóxicas, disminuyendo su capacidad de proliferación. Los NETs no modifican su capacidad de invasión.

Así mismo, para evaluar el entorno procoagulante en el ambiente tumoral se realizaron ensayos de test de generación de trombina (TGT), para estudiar en primer lugar, el efecto tanto de las líneas celulares como de sus medios condicionados y los NETs en la generación de trombina. En un segundo ensayo se quiso estudiar la posible alteración del estado procoagulante del entorno tumoral tras tratar las células con NETs. Se observó que las células tumorales y sus medios condicionados, estos últimos en menor medida, incrementan la generación de trombina por la vía extrínseca de la coagulación y de manera mucho más rápida en comparación con el pool de plasma. Los NETs por su parte generaron un aumento en la generación de trombina por la vía intrínseca de la coagulación. El tratamiento con NETs de las células de cáncer vesical T24 de subtipo más grave disminuyó el estado procoagulante del entorno tumoral, posiblemente porque promuevan la supervivencia celular. El tratamiento con NETs de las células de cáncer vesical 5637 de subtipo más leve no modificó el estado procoagulante del entorno tumoral. Mientras que el tratamiento con concentraciones altas de NETs de las células SV-HUC-1 de urotelio sano aumentó el estado procoagulante de su entorno, posiblemente por resultar citotóxicos promoviendo la muerte celular, resultados que concuerdan con los obtenidos en los ensayos de proliferación.

**Palabras clave:** Cáncer vesical, coagulación inmunotrombosis, invasión, NETs, neutrófilo, metástasis, migración test de generación de trombina, trampas extracelulares de neutrófilos, proliferación.

## ABSTRACT

Bladder cancer is the most lethal urological disease and is one of the most frequent neoplasms worldwide. There are different mechanisms associated with different types of cancer and thus favour disease progression, including the presence of neutrophils and their associated functions. Neutrophils are the most abundant type of white blood cell in the immune system. Upon activation, they exhibit defence mechanisms of the organism such as phagocytosis, degranulation and the formation of neutrophil extracellular traps (NETs). NETs are extracellular networks released by the neutrophil itself in a process called NETosis. These networks consist of histone-coated DNA and various proteins present in the cytoplasm or granules of neutrophils. Although NETs play a crucial role in defending the body against infection, they have also been implicated in non-infectious conditions such as cancer progression and immunothrombosis, among others.

In this work, the effect of NETs on the proliferation, migration and invasion of bladder cancer cells was studied. For this purpose, NETs were obtained from neutrophils of healthy volunteers stimulated with PMA. *In vitro* migration, proliferation and invasion assays were performed with three cell lines: T24 (transitional grade 3 bladder cancer), 5637 (grade 2 bladder cancer) and SV-HUC1 (healthy urothelium), which were treated with different concentrations of NETs. NETs treatment of the most severe subtype T24 cells decreased their ability to migrate, while it did not change their ability to proliferate or invade. Treatment of the mildest subtype 5637 bladder cancer cells with high concentrations of NETs decreased their invasiveness, while it did not change their ability to proliferate or migrate. Finally, treatment of healthy urothelial SV-HUC-1 cells with low concentrations of NETs increased their proliferative capacity, whereas high concentrations of NETs appear to be cytotoxic, decreasing their proliferative capacity. NETs do not modify their invasiveness.

In addition, to evaluate the procoagulant status of the tumour environment, thrombin generation tests (TGT) were performed to study the effect of both the cell lines and their conditioned media and NETs on thrombin generation. In a second assay, we wanted to study the possible alteration of the procoagulant state of the tumour environment after treating the cells with NETs. It was observed that tumour cells and their conditioned media, the latter to a lesser extent, increase thrombin generation via the extrinsic coagulation pathway and much more rapidly compared to a healthy plasma pool. NETs, on the other hand, increased thrombin generation via the intrinsic coagulation pathway. NETs treatment of the more severe subtype T24 bladder cancer cells with NETs decreased the procoagulant state of the tumour environment, possibly because they promote cell survival. NETs treatment of the milder subtype 5637 bladder cancer cells did not change the procoagulant status of the tumour environment. While treatment of healthy SV-HUC-1 urothelial cells with high concentrations of NETs increased the procoagulant status of their environment, possibly because they are cytotoxic and promote cell death, results that are consistent with those obtained in the proliferation assays.

**Keywords:** Bladder cancer, coagulation, immunothrombosis, invasion, NETs, neutrophil, neutrophil extracellular traps, metastasis, migration, thrombin generation test, proliferation.

## **ABREVIATURAS**

ADN: Ácido desoxirribonucleico  
APC: Proteína C activada  
BCG: Bacillus Calmette-Guerin  
CAT: Trombograma automatizado calibrado  
CM: Medio condicionado  
ECM: Matriz extracelular  
ETP: Potencial endógeno de trombina  
FBS: Suero bovino fetal  
FT: Factor tisular  
FvW: Factor von Willebrand  
G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos  
IL-6: Interleucina 6  
IL-8: Interleucina-8  
LPS: Lipopolisacárido  
MIBC: Cáncer de vejiga músculo infiltrante  
MPO: Mieloperoxidasa  
NETs: Trampas extracelulares de neutrófilos  
NIMBC: Cáncer de vejiga no músculo infiltrante  
NK: Natural killer  
PAD4: Peptidil arginina deiminasa 4  
PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica  
PBS: Tampón fosfato salino  
PMA: Forbol miristato acetato  
PMNs: Neutrófilos polimorfonucleares  
RE: Retículo endoplasmático  
RT: Temperatura ambiente  
SEM: Error estándar de la media  
TAN: Neutrófilos asociados al tumor  
TEV: Enfermedad tromboembólica venosa  
TGT: Test de generación de trombina  
TM: Trombomodulina  
TME: Microambiente tumoral  
TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral Alpha

TNM: Tumor, nódulos linfáticos y metástasis

## Índice de figuras y tablas

Figura 1: Sistema de clasificación de tumores en cáncer de vejiga.....	10
Figura 2: Eventos celulares en neutrófilos durante el proceso de NETosis.....	12
Figura 3: Activación de la coagulación por la vía intrínseca y la vía extrínseca.....	14
Figura 4: Los NETs promueven la coagulación y la trombosis asociada al cáncer.....	15
Figura 5: Las células tumorales pueden atraer los neutrófilos hacia el microambiente tumoral.....	16
Figura 6: Papel de los neutrófilos en la progresión tumoral.....	17
Figura 7: Líneas celulares empleadas. A. SV-HUC-1, B. 5637, C. T24 a confluencia 70-80%.....	20
Figura 8: Ensayo de proliferación.....	23
Figura 9: Ensayo <i>in vitro</i> de invasión con los insertos en la placa de 24 pocillos.....	24
Figura 10: Parámetros resultantes del test de generación de trombina.....	26
Figura 11 Resultados obtenidos en el ensayo <i>in vitro</i> de proliferación con las líneas T24, 5637 y SV-HUC-1, tratadas con las diferentes concentraciones de NETs indicadas.....	29
Figura 12: Resultados obtenidos en el ensayo <i>in vitro</i> de migración con las líneas T24 y 5637, tratadas con las diferentes concentraciones de NETs indicadas.....	31
Figura 13: Resultados obtenidos en el ensayo <i>in vitro</i> de invasión con las líneas T24, 5637 y SV-HUC-1, tratadas con las diferentes concentraciones de NETs indicadas.....	33
Figura 14: Resultados obtenidos en el TGT por la vía extrínseca realizado con las líneas T24, 5637, SV-HUC-1, y sus medios condicionados correspondientes (MC).....	35
Figura 15: Resultados obtenidos en el TGT por la vía intrínseca realizado con NETs.....	36
Figura 16: Resultados obtenidos en el TGT por la vía extrínseca realizado con los medios condicionados (MC) de las líneas celulares T24 y SV-HUC-1 tratadas con las concentraciones de NETs indicadas.....	37
Anexo 1.....	48
Anexo 2.....	49
Tabla 1: Tabla representativa del volumen de NETs y <i>DNA</i> obtenidos de los NETs de cada individuo voluntario presentado.....	27
Tabla 2: Resultados obtenidos en el ensayo <i>in vitro</i> de proliferación con las líneas celulares T24, 5637 y SV-HUC-1.....	30
Tabla 3: Resultados obtenidos en el ensayo <i>in vitro</i> de migración con las líneas celulares T24 y 5637.....	32
Tabla 4: Resultados obtenidos en el ensayo <i>in vitro</i> de invasión con las líneas celulares T24, 5637 y SV-HUC-1.....	34

## Índice:

RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN .....	339
1.    Cáncer de vejiga.....	9
2.    Inmunotrombosis.....	100
2.1 Neutrófilos y trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) .....	100
2.1.1 NETosis.....	11
2.2 Inmunotrombosis de los NETs .....	12
3.    Hemostasia .....	13
4.    Relación de los NETs con el cáncer .....	14
4.1 Inmunotrombosis asociada al cáncer.....	14
4.2 NETs y progresión del cancer .....	15
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
1.    Líneas celulares.....	20
2.    Obtención de neutrófilos y NETs .....	21
2.1 Aislamiento de neutrófilos .....	21
2.2 Obtención de NETs.....	21
2.3 Disgregación de NETs .....	22
3.    Ensayos <i>in vitro</i> para confirmar la implicación de los NETs en la progresión, migración e invasión del cancer vesical.....	22
3.1 Ensayo de proliferación.....	22
3.2 Ensayo de migración .....	23
3.3 Ensayo de invasión.....	23
4.    Evaluación del estado procagulante del entorno tumoral.....	25
5.    Análisis estadístico.....	26
RESULTADOS .....	27
1.    Características de los individuos sanos voluntarios y la obtención de sus NETs.....	27
2.    Ensayos <i>in vitro</i> para confirmar la implicación de los NETs en la progresión, migración e invasión del cancer vesical.....	27
2.1 Ensayo <i>in vitro</i> de proliferación en cáncer vesical .....	28
2.2 Ensayo <i>in vitro</i> de migración de cancer vesical .....	30
2.3 Ensayo <i>in vitro</i> de invasión en células de cancer vesical .....	32
3.    Evaluación del estado procoagulante del entorno tumoral.....	34

DISCUSIÓN .....	38
CONCLUSIONES .....	42
BIBLIOGRAFIA.....	43
ANEXO 1.....	48
ANEXO 2 .....	49

# INTRODUCCIÓN

## 1. Cáncer de vejiga

El cáncer de vejiga se encuentra dentro del grupo de neoplasias más frecuentes a nivel mundial, siendo la malignidad urológica más letal (1). Es el décimo cáncer más común en todo el mundo, siendo aproximadamente cuatro veces más común en hombres que en mujeres (2). Para el año 2023 se estimó un diagnóstico de 21.694 casos nuevos de cáncer de vejiga, de los cuales 81,7% serán hombres.

El cáncer de vejiga tiene lugar cuando las células que componen este órgano empiezan a crecer sin un control aparente, llegando a formar el tumor que con el tiempo podría diseminarse a otras partes del organismo, lo que se conoce como metástasis. El cáncer se puede diseminar en el cuerpo de diferentes formas, en primer lugar, a través del tejido es capaz de diseminar desde la zona en que se originó hacia áreas cercanas, por otro lado, a través de los vasos linfáticos o los vasos sanguíneos el cáncer puede empezar a diseminarse a otras partes del organismo (3).

Este tipo de cáncer puede clasificarse teniendo en cuenta dos aspectos: el grado y el estadio del tumor. En lo referente al grado, la diferenciación celular de las células presentes en el tumor se puede clasificar en tres grupos diferentes, yendo desde G1 a G3, siendo este último el grado más alto, es decir donde las células presentes en el tumor se encuentran menos diferenciadas lo que hace más propensa su diseminación. El estadio es una forma de indicar cuánto se ha propagado el cáncer en el tejido. Existen diferentes sistemas de estadificación, el más usado comúnmente es el TNM (Del inglés, *tumor, lymph nodes and metastasis*) (Figura 1). Así, existen dos tipos de cáncer vesical: no músculo infiltrante (NIMBC, del inglés, *non-muscle invasive bladder cancer*) y músculo infiltrante (MIBC, del inglés, *muscle-invasive bladder cancer*) (4). Existen diferentes estadios para indicar cuánto se ha propagado el cáncer. En lo referente al NIMBC, el estadio tipo 0 se caracteriza por la presencia de células anormales en el tejido que reviste el interior de la vejiga y se divide en dos subconjuntos: el carcinoma papilar no infiltrante, con células tumorales solo en la capa interna del revestimiento de la vejiga (Ta), y el carcinoma *in situ*, con células tumorales presentes en la capa interna del revestimiento de la vejiga o urotelio (Tis). El estadio tipo I indica que el tumor ha comenzado a crecer en la capa de tejido conectivo que se encuentra después del revestimiento de la vejiga. En lo referente al MIBC, en el estadio tipo II el tumor se disemina a las capas de tejido muscular de la vejiga, seguidamente se encuentran los estadios tipo III y IV donde va aumentando el nivel de infiltración de las células cancerosas a otras partes del organismo.

Por otro lado, la N va a indicar el grado de invasión de los nódulos linfáticos cercanos, pudiendo encontrar desde N0 hasta N3, asimismo la M indicará el grado de metástasis en el cuerpo, siendo M0 sin metástasis y M1 con metástasis (4).

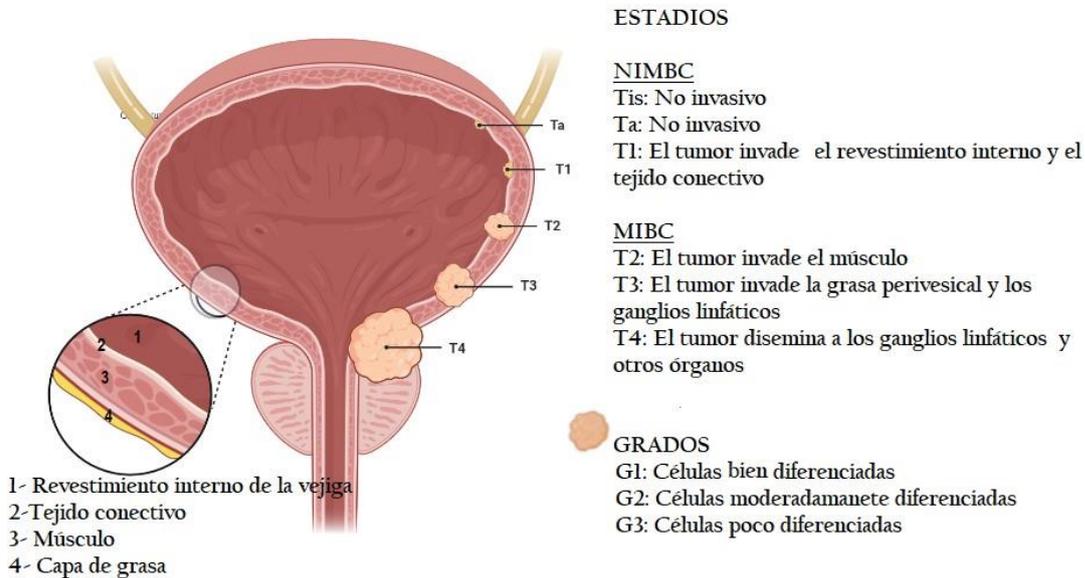


Figura 1: Sistema de clasificación de tumores en cáncer de vejiga. NIMBC, del inglés, *non-muscle invasive bladder cancer*. MIBC, del inglés, *muscle-invasive bladder cancer*. Imagen adaptada (5).

## 2. Inmunotrombosis

El término inmunotrombosis fue introducido en 2013 por Engelman y colaboradores (6), y describe la relación existente entre la respuesta inmunitaria innata y la coagulación. Las células del sistema inmunitario innato pueden presentar un fenotipo protrombótico tras su exposición a diferentes factores (7).

### 2.1 Neutrófilos y trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)

Los neutrófilos son las primeras células del sistema inmunitario innato en actuar, comprenden entre el 40% y 70% de los glóbulos blancos en los humanos y son esenciales en la defensa del organismo contra patógenos externos (8). Se encargan de eliminar los patógenos mediante tres formas de actuación: fagocitosis, degranulación y formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, del inglés, *neutrophil extracellular traps*). Los NETs fueron descubiertos por Brinkman en 2004, (9) donde se descubrió su implicación en la captura y eliminación de patógenos presentes en el organismo. Son redes extracelulares compuestas por ácido desoxirribonucleico (ADN), histonas y proteínas granulares y citoplasmáticas, como pueden ser la calprotectina, mieloperoxidasa (MPO) y elastasa entre otras, que son liberadas por neutrófilos activados, en un proceso denominado NETosis (10,11) (Figura 2). En este proceso los neutrófilos experimentan una descondensación de la cromatina realizada por ciertas enzimas, entre las que

se encuentra la peptidil arginina deiminasa 4 (PAD4), la cual hipercitrulina la histona H3 y como consecuencia se produce la descondensación.

La NETosis puede ser inducida por una amplia variedad de estímulos como son la interleucina-8 (IL-8), lipopolisacrido (LPS), forbol miristato acetato (PMA, del inglés *phorbol myristate acetate*), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, del inglés *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) entre otras (12).

### **2.1.1 NETosis**

Existen dos tipos de NETosis la lítica o suicida y la vital. En la NETosis lítica se produce una rotura de la membrana nuclear, liberándose de esta manera la cromatina al citoplasma, también se produce la rotura de la membrana plasmática de los neutrófilos por lo que el ADN, las histonas y proteínas granulares y citoplasmáticas quedan expuestos al exterior. El neutrófilo pierde así sus funciones fagocíticas y quimiotácticas, acabando este proceso con la vida de la célula. Por otro lado a través de la NETosis vital se forman los NETs en ausencia de rotura de la membrana nuclear y citoplasmática del neutrófilo, por lo que este es capaz de conservar sus funciones (12).

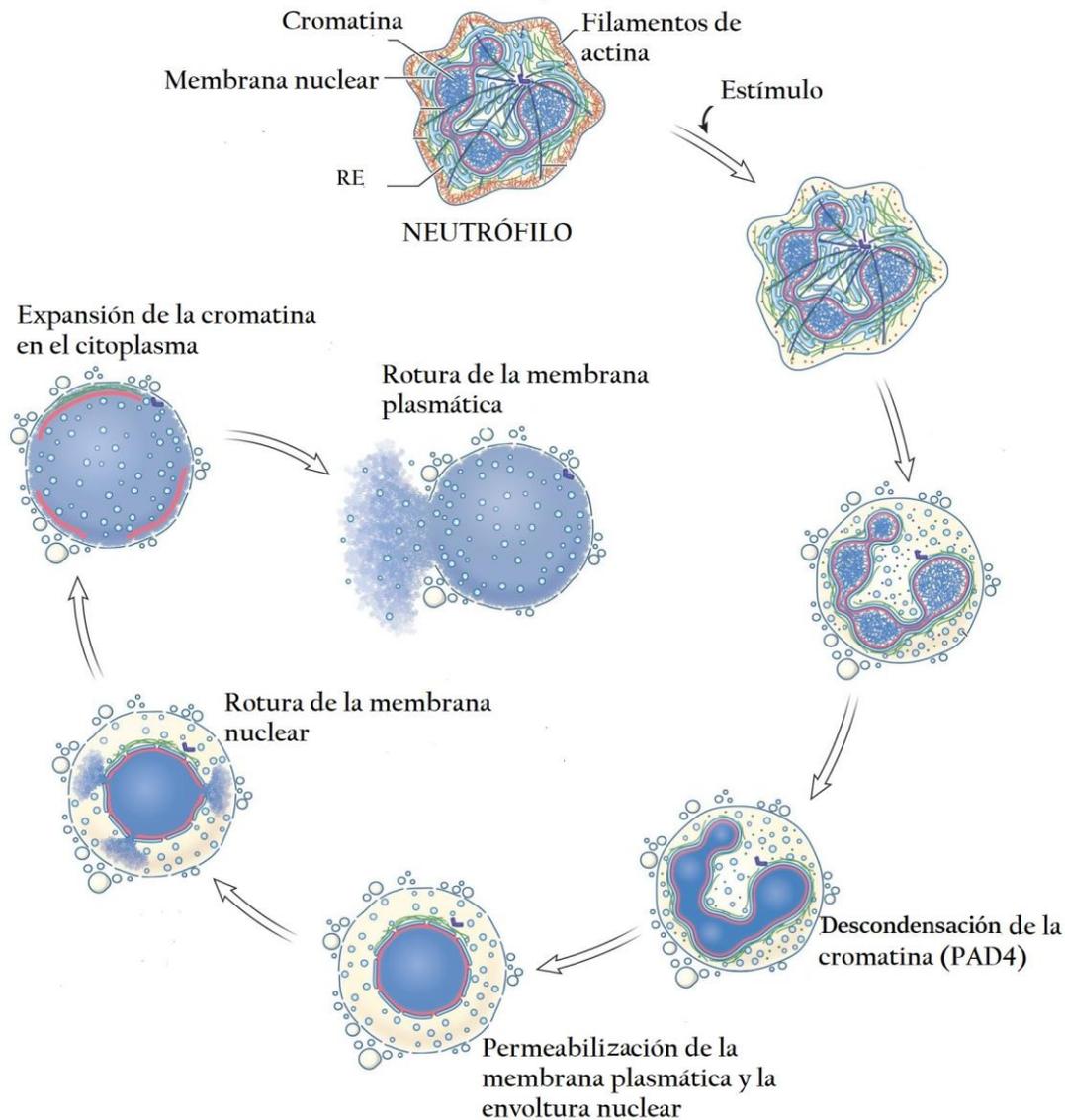


Figura 2: Eventos celulares en neutrófilos durante el proceso de NETosis. RE, retículo endoplasmático. Imagen adaptada (13).

## 2.2 Inmunotrombosis de los NETs

Aunque en un primer momento fueron identificados exclusivamente como mecanismo de defensa para atrapar y eliminar patógenos de forma localizada, se ha descrito que los NETs también son capaces de activar la coagulación, tanto por la vía intrínseca como por la extrínseca. Esto se debe a que proporcionan un andamio que estimula la adhesión y agregación plaquetaria, la captura de microvesículas, así como la formación y depósito de fibrina (10). Así mismo, la superficie polianiónica de los NETs es capaz de activar proteínas, factores de coagulación como el FXII, y

estimula la unión de vesículas ricas en factor tisular (FT), permitiendo así el inicio de la coagulación (6). Además, los NETs también son capaces de inhibir anticoagulantes naturales, la elastasa y MPO, asociadas a los NETs, son capaces de degradar al inhibidor del FT y la trombomodulina (TM), por lo que limitan su función anticoagulante. Así mismo, las histonas presentes en los NETs son capaces de inhibir la función anticoagulante de la proteína C activada (APC, del inglés, *activated protein C*) al interactuar con la TM y la proteína C e impedir su activación. Al restringirse la activación de estas proteínas se produce un aumento de la generación de trombina y por lo tanto aumenta la posibilidad de riesgo trombótico (14).

Cabe destacar que los NETs también son una pieza clave en el proceso de degradación de los coágulos, los cuales deben ser eliminados para una correcta restauración del flujo sanguíneo. El activador tisular del plasminógeno que se encarga de disgregar la fibrina no es capaz de eliminar completamente el coágulo, es necesario también degradar otros factores como el factor von Willebran (FvW) y los NETs, ya que la interacción de ambos ha demostrado contribuir a la formación de trombos venosos y arteriales, así como a la inflamación.

Todos estos mecanismos ponen de manifiesto el papel de los neutrófilos y sus NETs en la trombosis, demostrando la relación existente entre el sistema inmunitario y la trombosis.

### **3. Hemostasia**

La hemostasia comprende el conjunto de procesos fisiológicos encargados de mantener la sangre en estado fluido, para así garantizar la permeabilidad de los vasos y prevenir el sangrado en caso de rotura (12). En un primer lugar se da la hemostasia primaria, donde se produce la vasoconstricción y la agregación plaquetaria en la zona de rotura. La hemostasia secundaria desencadena la coagulación dando lugar al coágulo de fibrina y por último la fibrinólisis elimina el coágulo una vez este ha realizado su función. Todos estos mecanismos están perfectamente sincronizados entre sí y una alteración de los mismos puede dar lugar a trombosis o hemorragias (15).

Cuando se produce una lesión se exponen proteínas adhesivas como, por ejemplo, el colágeno, el FvW, la fibronectina y la laminina, entre otras, que van a favorecer la adhesión y activación plaquetaria sobre la matriz expuesta. Gracias a esta activación se puede unir el fibrinógeno, creando puentes entre dos o más plaquetas lo que da lugar al agregado plaquetario. Tras la activación, las plaquetas liberan sustancias proagregantes y procoagulantes.

Con el daño endotelial se expone una gran cantidad de factor FT al torrente sanguíneo, habitualmente encriptado dentro de las células endoteliales. El FT, junto con los fosfolípidos presentes en las plaquetas agregadas da lugar a una concentración de cargas negativas capaz de activar la coagulación de forma casi simultánea a la hemostasia primaria. La cascada de la coagulación se puede clasificar en dos vías: intrínseca y extrínseca (Figura 3). La intrínseca se

inicia por la activación del FXII sobre superficies cargadas negativamente y la extrínseca por la exposición del FT al torrente sanguíneo que provoca la activación del FVII. Ambas vías convergen en la generación de trombina que activa el fibrinógeno para formar la malla de fibrina, dando lugar al coágulo sanguíneo o tapón hemostático, el cual atrapa las plaquetas y es más estable que el tapón primario anteriormente formado. Las primeras trazas de trombina generada son esenciales para el inicio de la coagulación, así mismo la trombina también es capaz de iniciar una de las vías anticoagulantes más potentes, la de la proteína C, la cual reduce la propia formación de trombina (15).

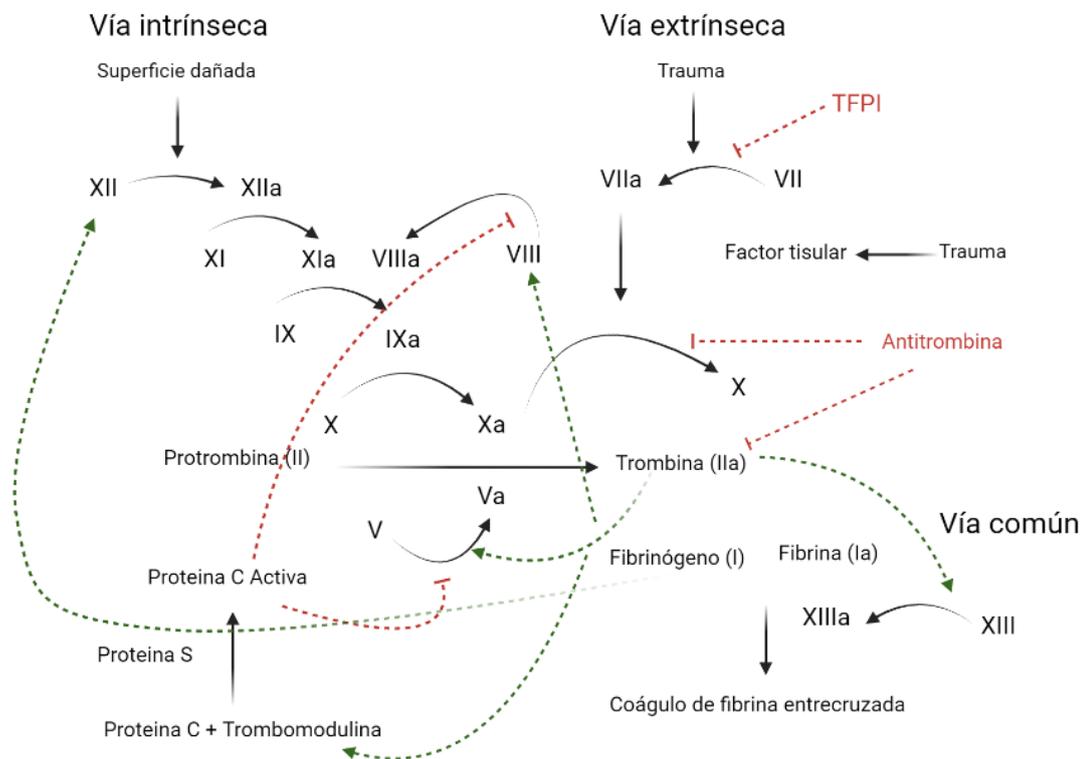


Figura 3: Activación de la coagulación por la vía intrínseca y la vía extrínseca. Imagen creada en BioRender.

#### 4. Relación de los NETs con el cáncer

##### 4.1 Inmunotrombosis asociada al cáncer

En lo referente a la progresión del cáncer, se ha evidenciado como el sistema inmunológico tiene una clara implicación. En concreto las células inmunitarias más abundantes presentes en el microambiente tumoral son los neutrófilos (16).

La trombosis es la segunda causa de muerte en pacientes con cáncer (17). Entre los diferentes tipos de trombosis presentes en estos pacientes, la más frecuente es la enfermedad

tromboembólica venosa (TEV), en una menor proporción también se encuentra la trombosis arterial, y ambas conllevan un aumento de la mortalidad (18).

Los diferentes factores liberados por el tumor promueven un estado de hipercoagulabilidad a través de múltiples mecanismos, entre los que se encuentra la producción de moléculas procoagulantes y proagregantes como, por ejemplo, FT y la liberación de sustancias proinflamatorias, citoquinas que activan a las células endoteliales, plaquetas y leucocitos (19). De esta manera al promoverse las actividades procoagulantes, así como al activarse la cascada de coagulación, se produce un aumento de trombosis en pacientes con cáncer (Figura 4) (16).

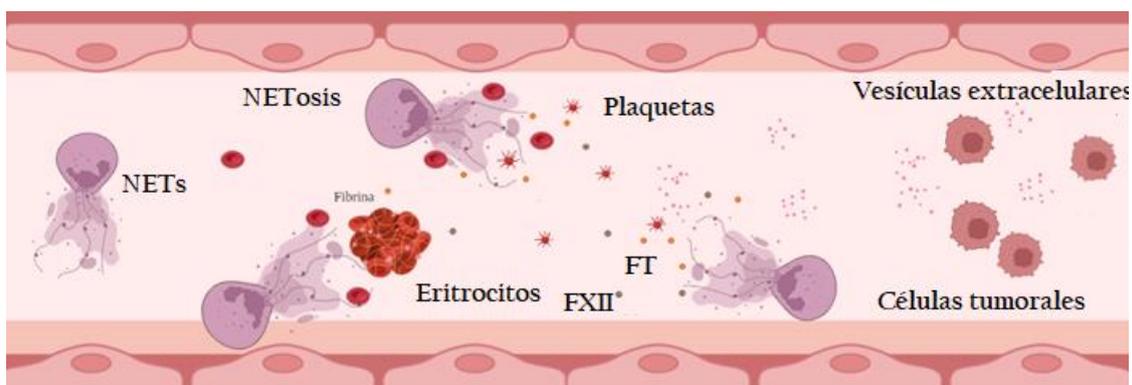


Figura 4: Los NETs promueven la coagulación y la trombosis asociada al cáncer al proporcionar un andamio que estimula la adhesión y agregación plaquetaria, la captura de microvesículas, así como la formación y el depósito de fibrina. Las citoquinas liberadas por las células tumorales promueven la aparición de NETs. La superficie polianiónica de los NETs es capaz de activar factores de coagulación como el FXII y estimular la unión de vesículas ricas en FT, dándose así una activación para el inicio de la coagulación. NETs del inglés *neutrophil extracellular traps*. FT, factor tisular. Imagen creada en BioRender, adaptada (20).

## 4.2 NETs y progresión del cáncer

Diferentes moléculas liberadas por las células tumorales son capaces de atraer a los neutrófilos hacia el microambiente tumoral (TME, del inglés, *tumor microenvironment*), estos neutrófilos son conocidos como neutrófilos asociados a tumores (TAN, del inglés, *tumor associated-neutrophils*), los cuales son capaces de activarse y dar lugar a NETs (Figura 5) (21).

Entre las moléculas inflamatorias liberadas en el TME, que son capaces de promover la NETosis se encuentran: IL-8, IL-6, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , del inglés, *tumoral necrosis factor Alpha*) y G-CSF, entre otras (16). Los neutrófilos presentes en el microambiente tumoral pueden presentar diferentes fenotipos ya que pueden actuar tanto promoviendo como inhibiendo el crecimiento tumoral, esto va a depender de la señalización de las citoquinas liberadas, y otros factores presentes en el TME que pueden modificar la función y morfología de estas células. Así,

al estimularse la proliferación de neutrófilos y la aparición de sus NETs puede promover el crecimiento tumoral (22).

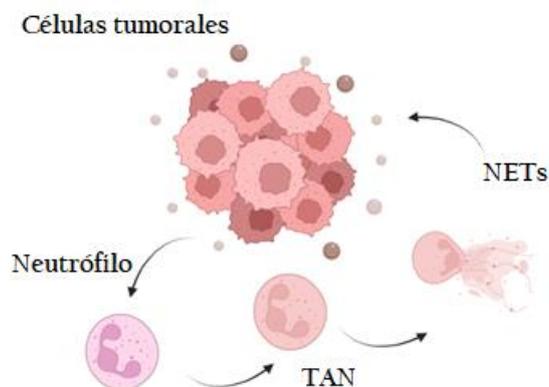


Figura 5: Las células tumorales pueden atraer los neutrófilos hacia el microambiente tumoral, conociéndose estos neutrófilos como “asociados a tumores”, la liberación de diferentes moléculas por parte del tumor es capaz de inducir la NETosis en los TAN. TAN, del inglés *tumor associated-neutrophils*. Imagen creada en BioRender.

Los NETs, en su implicación en el cáncer, parecen proteger a las células tumorales al formar las redes a su alrededor. De esta manera los NETs ocultan los sitios de interacción entre las células efectoras del sistema inmunitario y su diana, impidiendo así la acción de los linfocitos T citotóxicos (CD8+) y las *natural killer* (NK) sobre las células tumorales, consiguiendo así favorecer su proliferación (8). Por lo que los NETs podrían ejercer funciones inmunosupresoras sobre las células de la respuesta inmunitaria (23). Así mismo, los NETs se han visto implicados en la extravasación de las células tumorales al torrente sanguíneo, al estar las células tumorales envueltas en los NETs, y cubriéndose estos de plaquetas, son capaces de escapar de la respuesta del sistema inmunológico y no ser detectadas, pudiendo llegar al nicho metastásico e incluso llegando a despertar células tumorales latentes que promueven el crecimiento del tumor (24, 25).

De esta manera los NETs son capaces de regular el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la invasividad. De hecho, el ADN de los NETs actúa como factor quimiotáctico para atraer a las células tumorales y favorecer la formación de metástasis a distancia (Figura 6) (21).

En 1989 Steven Pagen Con propuso la teoría de que las zonas que acaban siendo invadidas por las células tumorales en la metástasis y progresión del cáncer suelen presentar un microambiente favorable antes de la llegada de las células tumorales (26). Siguiendo esta teoría se ha podido demostrar que los tumores primarios son capaces de liberar factores para reclutar neutrófilos e inducir su NETosis en sitios premetastásicos. Posteriormente, los NETs formados sirven como soporte para las células tumorales circulantes y proporcionan un ambiente favorable para el crecimiento y la metástasis (19). Este mecanismo se ha propuesto para explicar en diferentes

ensayos la metástasis de distintos tipos de cáncer, como en el caso del cáncer de ovario al omento (27), y en los cánceres colorrectal, de pulmón y de mama al hígado (21, 28).

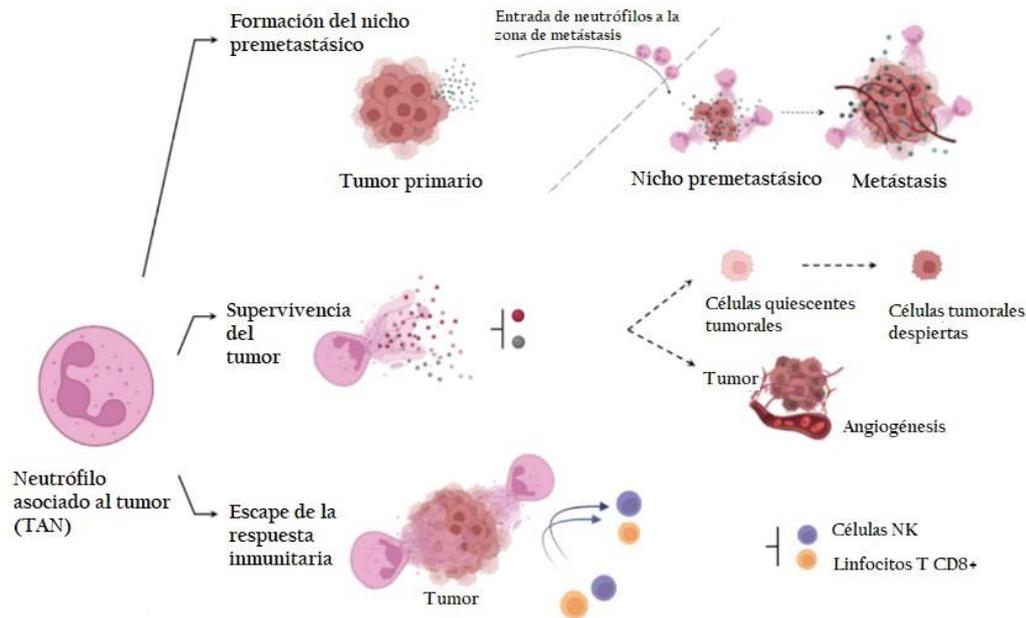


Figura 6: Papel de los neutrófilos en la progresión tumoral. Las células tumorales reclutan neutrófilos al ambiente tumoral, conocidos como TAN, los cuales pueden formar NETs. Entre el papel de los NETs en la progresión del cáncer, se encuentran la formación de nichos premetastásicos, la promoción de procesos de supervivencia y la inhibición de la respuesta inmunitaria. TAN, del inglés *tumor associated-neutrophils*, NETs, del inglés *neutrophil extracellular traps*. Imagen adaptada (19).

Por lo tanto, los NETs inducidos por las células tumorales son capaces de promover, no solo la progresión del cáncer, sino también la hipercoagulabilidad. El papel de los neutrófilos en el desarrollo tumoral es un factor reconocido, puesto que un recuento alto de neutrófilos se considera un marcador de progresión de la enfermedad, asociado con un pronóstico peor. Así mismo, los marcadores de NETosis también se han propuesto como biomarcadores para otros procesos relacionados con el cáncer, como es la trombosis ya comentada (19). De esta manera el mecanismo por el cual los neutrófilos modulan el cáncer y la inmunotrombosis es la NETosis.

En lo referente al cáncer vesical recientemente se ha demostrado que existe un aumento significativo del recuento de neutrófilos, así como marcadores de NETs en pacientes con esta neoplasia en comparación con controles sanos (29). Observando a su vez una alta infiltración de neutrófilos en el tejido y evidenciado la aparición de NETosis en el microambiente tumoral, lo cual se ha relacionado con un peor pronóstico (30).

Es por ello que el presente trabajo busca demostrar la relación de los NETs como componentes del sistema inmunológico en la progresión del cáncer vesical, analizando tanto la alteración de la

proliferación, la migración y la invasión de las células tumorales en ensayos *in vitro*, así como en la generación de un ambiente procoagulante en el microambiente tumoral.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Los NETs presentan una implicación clara en la progresión y supervivencia de distintos tipos de tumores, así como un papel clave en la inmunotrombosis.

Es por ello que en el presente estudio se plantean dos hipótesis:

- 1- Los NETs pueden favorecer la progresión, migración e invasión del cáncer vesical.
- 2- Los NETs pueden promover la creación de un estado procoagulante en el entorno tumoral.

Para confirmar estas hipótesis se plantean los siguientes objetivos:

- Analizar el efecto de los NETs sobre el comportamiento de las células de tumor vesical mediante ensayos *in vitro* de proliferación, migración e invasión.
- Analizar si los NETs promueven un estado procoagulante, tanto por sí mismos, como en el entorno tumoral mediante el test de generación de trombina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Líneas celulares

Se dispuso de tres líneas celulares para la realización de los distintos ensayos, con sus respectivos medios específicos. Células inmortalizadas de urotelio sano (SV-HUC-1, ATCC, Virginia, EE. UU) suplementadas con medio F-12 Nut Mix (Gibco, Life Technologies, Massachusetts, EE. UU), células de cáncer vesical transicional de grado 3 (T24, ATCC) suplementadas con medio McCoy's 5A (Gibco) y células de cáncer vesical de grado 2 (5637, ATCC) suplementadas con medio RPMI-1640 (Gibco). Los medios se suplementaron con 10% de suero bovino fetal (FBS, del inglés, *fetal bovine serum*) (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Alemania) y 1% de penicilina/streptomomicina (Gibco), medio completo.

Las líneas celulares se mantuvieron mediante dos pases semanales y cambios de medio en los días consecutivos a los pases, de esta manera se pudo trabajar con ellas en los diferentes ensayos, siempre teniendo en cuenta el número de pases realizado. Los pases se realizaban con lavados de tampón fosfato salino estéril al 10% (PBS, del inglés, *sterile phosphate-buffered saline*) (Gibco) y tripsinizando las células con tripsina al 0,25% (Gibco), para sembrar se realizaba un conteo con el contador de células Cytosmart (Axion biosystems, Georgia, EE. UU), añadiéndole azul tripán (Merck, Darmstadt, Alemania). Las células se sembraron en frascos de cultivos, T25, T75 y T175 (ThermoFisher) según la cantidad de las mismas que se quisiese sembrar. La concentración de células que se sembraba para cada pase se optimizó al inicio de descongelar y empezar a trabajar con cada línea celular, buscando que estuviesen a una confluencia del 70-80% en los días de pase (Figura 7).

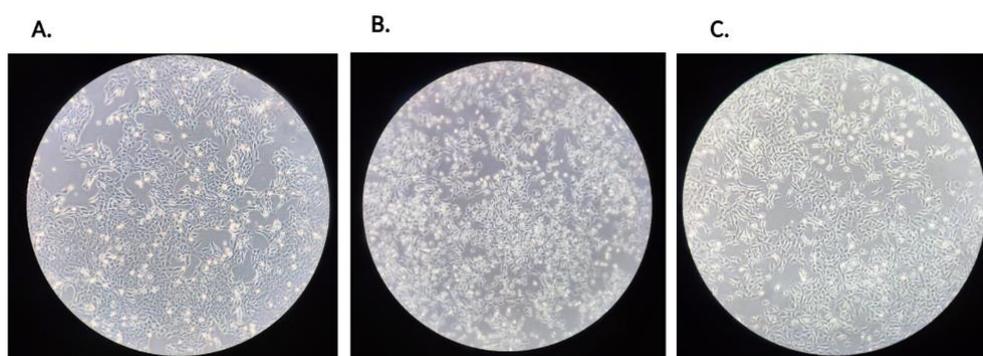


Figura 7: Líneas celulares empleadas. A. SV-HUC-1, B. 5637, C. T24 a confluencia 70-80%.

## **2. Obtención de neutrófilos y NETs**

### **2.1 Aislamiento de neutrófilos**

Se obtuvieron 40 ml de sangre anticoagulada con EDTA de cada uno de los 6 voluntarios sanos participantes, en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Tras atemperar 30-45 minutos, se añadieron 5 ml de Polymorphoprep (Serumwerk Bernburg, Bernung, Alemania) a un tubo de 15 ml, depositando a continuación 5 ml de sangre en la parte superior. Se centrifugó a 500 x g, 40 minutos a temperatura ambiente (RT, del inglés, *room temperature*), con velocidad mínima de aceleración y freno. Al terminar la centrifugación, en el tubo se forma un gradiente con las diferentes capas de células presentes en la muestra de sangre. Se aspiró y descartó toda la capa de plasma, conservando la capa de células polimorfonucleares (PMNs) la cual está constituida en su mayoría por neutrófilos y se transfirió a un tubo nuevo de 15 ml. En este tubo se realizaron dos lavados con PBS 1X (Gibco), invirtiendo con cuidado el tubo un par de veces en el proceso. A continuación, se centrifugó a 200 x g RT durante 10 minutos con velocidad mínima de aceleración y freno. Una vez acabada la centrifugación se eliminó el sobrenadante.

Posteriormente se añadió 1 ml de Cell Lysis Solution (Promega Biotech Ibérica S.L, Madrid, España), para lisar los eritrocitos presentes en la capa de PMNs. Seguidamente el tubo se dejó en el agitador orbital (FINEPCR, Gyeonggi-do, Corea del Sur) durante 10 minutos, pasado este tiempo se volvió a centrifugar 10 minutos a 160 x g RT a velocidad mínima de aceleración y freno, para después eliminar el sobrenadante. Una vez realizado este paso, se resuspendió el pellet en PBS 1X (Gibco), para volver a centrifugar en las mismas condiciones. Una vez terminada la centrifugación, se resuspendió el pellet en un 1 ml de DMEM (Thermo Fisher, Massachusetts, EE. UU), para posteriormente contar las células en una cámara bürker (Hirschmann Laborgerate, Eberstadt, Alemania), usando azul tripán (Merck). Tras el conteo se sembraron en placas de 6 pocillos (Greiner Bio-One CELLSTAR) a una concentración de  $7,5 \times 10^6$  células/ml en cada pocillo, sembrando 2 ml de suspensión de neutrófilos por pocillo.

### **2.2 Obtención de NETs**

Tras sembrar los pocillos correspondientes la placa se dejó incubando 1h a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, para que las células se adhieran a los pocillos. Posteriormente se añadieron 500 µl de PMA por pocillo, dejando la placa 4 horas a 37 °C 5% de CO<sub>2</sub> en incubador. Transcurrido este tiempo se traspasó a 4 °C en nevera.

Al día siguiente se sacó la placa de la nevera y se despegaron los NETs del fondo de los pocillos mediante rascadores estériles, juntando todos los NETs de un mismo individuo en tubos de 50 ml.

### **2.3 Disgregación de NETs**

Dado que los NETs forman una estructura compacta, se probaron diferentes métodos para disgregarlos: sonicación o digestión con DNasa Turbo (Ambion, Life Technologies), Pulmozyme® (Roche, Mannheim, Alemania), DNasa micrococcal (New England Biolabs, Massachusetts, EE. UU) y tres concentraciones distintas de DNasa micrococcal sobre NETs previamente sonicados (31). El método finalmente elegido de disgregación de los NETs fue la sonicación al obtenerse una suspensión de NETs más homogénea. Así, los NETs fueron sonicados en 3 pulsos de 5 segundos, y posteriormente se disgregaron de nuevo con agujas de insulina, buscando de esta manera que la solución se quedase lo más homogénea posible, una vez disgregados se realizaron alícuotas para guardar a -80 °C.

La concentración de ADN de los NETs obtenidos de cada individuo se midió mediante PicoGreen (Thermo Fisher) en el fluorímetro Fluoroskan Ascent FL (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, EE. UU), para poder calcular las concentraciones de NETs empleadas en el resto de los ensayos.

### **3. Ensayos *in vitro* para evaluar la implicación de los NETs en la progresión, migración e invasión del cáncer vesical.**

Los protocolos para la realización de los ensayos *in vitro* han sido obtenidos y modificados de McNamee & O'Driscoll, 2021 (32) y las concentraciones de los NETs elegidas se obtuvieron de Tonello *et al.*, 2017 (33).

#### **3.1 Ensayo de proliferación**

Para este ensayo se sembraron las células en medio completo en placa de 96 pocillos (Greiner bio-one CELLSTAR®) al 70-80% de confluencia:  $5 \times 10^3$  células T24/ pocillo,  $7,5 \times 10^3$  células 5637/ pocillo y  $1 \times 10^4$  células SV-HUC-1/pocillo. Transcurridas 24h, se añadieron 100  $\mu$ l de NETs en medio completo a las siguientes concentraciones: 200 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,05 ng/ml, 0,01 ng/ml, 0,005 ng/ml y 0,001 ng/ml, 0 ng/ml. Se incubó la placa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24, 29 o 48 horas dependiendo la línea utilizada (T24, 24 h), (5637, 29 h) y (SV-HUC-1, 48 h).

Pasado el tiempo de incubación, se desechó el medio presente en los pocillos y a continuación se lavaron dos veces con PBS 1X. Una vez realizados los lavados se añaden 100  $\mu$ l de tampón sustrato fosfatasa a cada pocillo (0,2693 g de 4-Nitrofenilfosfato (VWR chemicals, Pensilvania, EE. UU) por cada 100 ml de acetato sódico). La placa se dejó en oscuridad 90 min a 37 °C y 5%

de CO<sub>2</sub>, pasado ese tiempo se añadió 50 µl 1M NaOH a cada pocillo para así parar la reacción, por último, se midió la absorbancia en un lector de placas a 405 nm (ThermoFisher) (Figura 8).

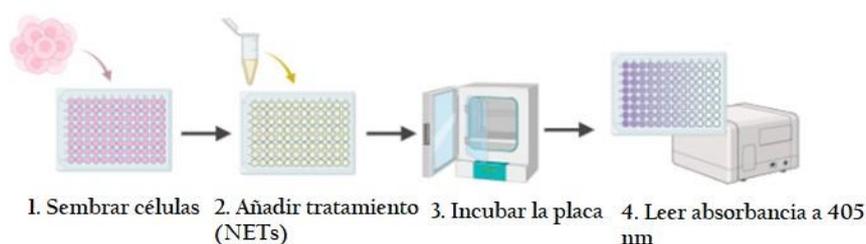


Figura 8: Ensayo de proliferación. Imagen creada en BioRender.

### 3.2 Ensayo de migración

En este ensayo se sembraron las células en sus medios completos en placa de 24 pocillos (Greiner bio-one CELLSTAR®). Se sembró cada línea celular para obtener el 100% de confluencia a las 24h:  $4 \times 10^5$  células T24/pocillo,  $4,5 \times 10^5$  células 5637/pocillo y  $4 \times 10^5$  células SV-HUC-1/pocillo. Tras incubar 24h a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> se realizó una “herida” en el cultivo usando una punta de micropipeta de 200 µl. Se realizaron dos lavados con 500 µl de medio completo para retirar las células desprendidas. A continuación, se añadió el tratamiento de NETs en medio con 1% FBS a las siguientes concentraciones: 200 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 1 ng/ml, 0,5 ng/ml. El medio con 1% FBS busca que las células no sean capaces de proliferar y solo migren en el pocillo, para que así se dé el cierre de la herida. La placa se incubó durante 24h en el microscopio Las X Time-Lapse (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y obteniendo una foto de cada pocillo cada hora.

Las fotos obtenidas fueron analizadas con el programa ImageJ para calcular el área cubierta de células en cada condición experimental, teniendo en cuenta el área a tiempo inicial y a tiempo final. Se consideró tiempo final de los experimentos aquel en que se cerró una de las heridas.

### 3.3 Ensayo de invasión

En este ensayo se empleó matriz extracelular (ECM, del inglés, *extracellular matrix*) (Merck) a una concentración de 1 mg/ml en medio libre de FBS, para cada línea celular con la que se fuese a trabajar, manipulándola siempre en frío para mantener las propiedades de la ECM.

Tras la descongelación de la ECM, al día siguiente se colocaron los insertos o cámaras de invasión de 8 µm en una placa de 24 pocillos (Greiner bio-one CELLSTAR®), la placa se precintó y se

dispuso a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se pipetearon en frío  $100\ \mu\text{l}$  de ECM a cada inserto/cámara de invasión, volviendo a precintar la placa y dejándola durante 24 h a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Pasadas las 24 h, se pasó la placa al incubador a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  5% de  $\text{CO}_2$  durante 1 h para que la ECM polimerizara. Transcurrido este tiempo, se retiró el exceso de ECM y se lavaron los insertos tres veces con medio libre de suero. Tras los lavados, se sembraron los insertos con las células resuspendidas en medio al 1% FBS a una confluencia del 70-80%:  $4 \times 10^4$  células T24/inserto,  $3 \times 10^4$  células 5637/inserto y  $4 \times 10^4$  células SV-HUC-1/inserto. A continuación, a los pocillos de debajo de cada inserto se les añadió  $500\ \mu\text{l}$  de NETs a las siguientes concentraciones: 50 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0 ng/ml). Una vez añadido el tratamiento, la placa se dejó en el incubador 24 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ .

Posteriormente se limpió cada inserto y pocillo tres veces con PBS 1X, usando hisopos de algodón para eliminar las células que no hubiesen invadido la matriz extracelular y la membrana del inserto. Una vez terminados los lavados se añadieron  $500\ \mu\text{l}$  de cristal violeta 0,1% (Merck), a cada pocillo dejando la placa en agitación durante 10 min, pasado este tiempo se retiró el cristal violeta y se lavaron los pocillos tres veces con PBS 1X, dejándolos en agitación durante 5 minutos en cada lavado.

Una vez terminados los lavados, los insertos se pasaron a una placa nueva a la cual se le añadieron  $200\ \mu\text{l}$  de ácido acético glacial al 10%/pocillo dejando esta placa de nuevo diez minutos en agitación. Pasado este tiempo, se transfirieron  $100\ \mu\text{l}$  bien homogeneizados de cada condición a los pocillos de una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a  $570\ \text{nm}$  para obtener el número de células que atravesaron la cámara de invasión recubierta con ECM (Figura 9).

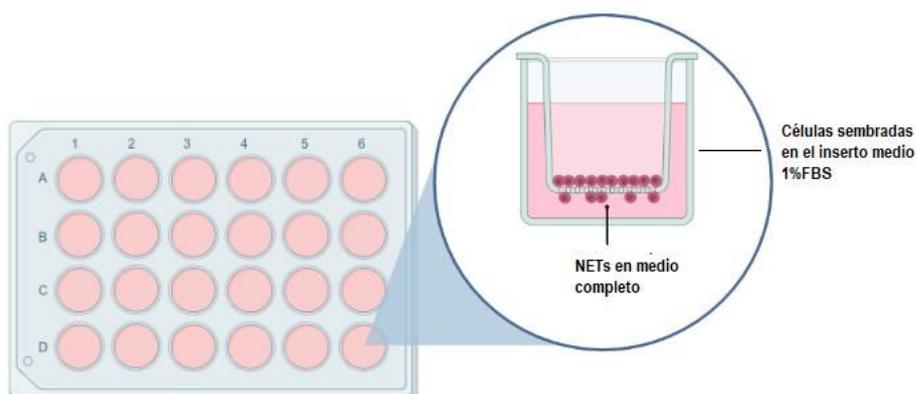


Figura 9: Ensayo *in vitro* de invasión con los insertos en la placa de 24 pocillos, Las células sembradas dentro del inserto y los NETs en las diferentes condiciones en el pocillo.

#### 4. Evaluación del estado procoagulante en el entorno tumoral e inducido por los NETs

Para evaluar la capacidad de los NETs de inducir un estado procoagulante por ellos mismos o en el ambiente tumoral, empleamos el test de generación de trombina mediante trombograma calibrado automatizado (CAT) en un Fluorimetro Fluoroskan Ascent FL. En cada pocillo de la placa 60  $\mu$ l de un pool de plasma, 20  $\mu$ l de PRP reagent 1pM (factor tisular, para analizar la activación de la coagulación por la vía extrínseca) o MP reagent (fosfolípidos, para analizar la activación de la coagulación por la vía intrínseca) y 20  $\mu$ l de la muestra a ensayar: NETs, células (1000 cels/pocillo), medio condicionado de estas células o medio condicionado de las células tratadas con NETs (200 ng/ml, 1 ng/ml, 0,1 ng/ml y 0,01 ng/ml) en el ensayo de proliferación.

La placa con las muestras incubó 10 minutos a 37 °C y, seguidamente, el equipo dispensó 20  $\mu$ l de FluCa Reagent que contiene 100 mmol/l de CaCl<sub>2</sub> y 2.5 mmol/l de ZGGR-AMC para iniciar la reacción de coagulación y, por tanto, de generación de trombina. El volumen final de todas las reacciones fue de 120  $\mu$ l. Cada muestra se evaluó por duplicado. Para corregir el efecto matriz de la muestra y el consumo de sustrato, cada muestra se normalizó con un calibrador consistente en un complejo de trombina-B2-macroglobulina (Thrombin Calibrator 750 nM, Thrombinoscope BV).

Se tomaron medidas cada 20 segundos durante 1 hora y los datos de generación de trombina fueron analizados con el programa Thrombinoscope (BV, Maastricht, Países Bajos). Un experimento típico de TGT da como resultado los parámetros mostrados en la figura 10 que son: el potencial endógeno de trombina (ETP, nmol\*min) que es la cantidad neta de trombina generada por el plasma estudiado en base al efecto de los agentes protrombóticos y antitrombóticos presentes en la muestra y el tiempo de la reacción (área bajo la curva de generación de trombina); el pico (Peak, nmol) se define como la concentración máxima de trombina formada durante la reacción; el tiempo de latencia (lagtime, min), que es el tiempo que corresponde a 1/6 de la altura del pico, y refleja aproximadamente el tiempo de coagulación; el tiempo al pico (time to Peak, min) es el tiempo que tarda la reacción en alcanzar el pico de generación de trombina; el inicio de la cola (start tail, min) que es el tiempo que tarda la reacción en alcanzar el final; finalmente, el índice de velocidad (VelIndex, nmol/min) indica la velocidad de la formación de trombina activa, aunque es el parámetro con mayor variación interindividual incluso en individuos sanos. Además, siguiendo el trabajo de Rousseau (34), calculamos el parámetro MRI, que indica la ratio de la fase de propagación de generación de trombina, mediante la fórmula

$$\text{MRI} = \text{Peak} / (\text{ttPeak} - \text{lagtime})$$

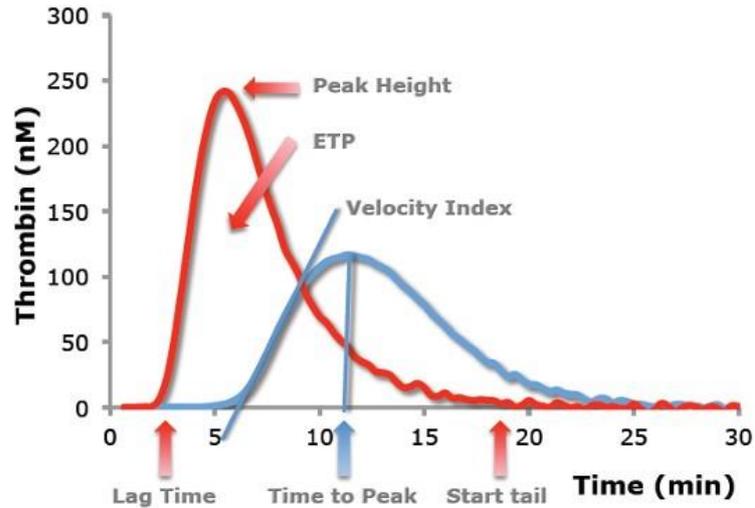


Figura 10: Parámetros resultantes del test de generación de trombina. Imagen obtenida de Stago.

## 5. Análisis estadístico

Los resultados se muestran como medias y error estándar de la media (SEM), puesto que corresponden al promedio de 3 experimentos diferentes, cada uno de ellos por triplicado. Para las comparaciones no pareadas de dos grupos se realizó una prueba t-test y para más de dos grupos no pareados se realizó un test de ANOVA unidireccional.

Los análisis se realizaron con Graphpad Prism. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

### 1. Características de los voluntarios sanos y de los NETs obtenidos

Se presentaron 6 voluntarios sanos con edades comprendidas entre los 20 y 30 años, a los que se les extrajeron 40 ml de sangre a cada uno para el aislamiento de los neutrófilos y la posterior obtención de NETs. Los valores obtenidos de la cuantificación mediante el protocolo de PicoGreen de las diferentes muestras de NETs se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1: Tabla representativa del volumen de NETs y *DNA* obtenidos de los NETs de cada individuo voluntario presentado

Muestra	Volumen NETs (ml)	DNA (ng/ml)
1	4,5 ml	32418 ng/ml
2	6,8 ml	29103 ng/ml
3	4,0 ml	31653 ng/ml
4	6,9ml	20351 ng/ml
5	2,2 ml	25915 ng/ml
6	2,5 ml	25480 ng/ml

Para la realización de todos los ensayos *in vitro* de proliferación, migración e invasión se seleccionaron los NETs obtenidos de los tres primeros individuos de la Tabla 1 al ser las muestras que presentaban mayor semejanza entre sus concentraciones y de las que más volumen de muestra se recogió. El método elegido de disgregación de los NETs fue la sonicación al obtenerse una disgregación más homogénea de los NETs (datos no mostrados), y no encontrarse ninguna eficacia significativa en el uso de las diferentes DNAsas.

### 2. Ensayos *in vitro* para evaluar la implicación de los NETs en la progresión, migración e invasión del cáncer vesical.

Cada ensayo *in vitro* de proliferación, migración e invasión se realizó 3 veces con cada línea celular, a su vez dentro de cada experimento se realizó por triplicado. Debido a problemas logísticos a la hora de hacer uso de los equipos necesarios para la realización de algunos ensayos, no se pudo llegar a una N de 3 en el ensayo de migración.

## 2.1 Ensayo *in vitro* de proliferación celular

Para analizar la implicación de los NETs en la proliferación de las líneas celulares se probaron las siguientes concentraciones de NETs: 200 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,05 ng/ml, 0,01 ng/ml, 0,005 ng/ml y 0,001 ng/ml, 0 ng/ml.

La Figura 11 muestra el porcentaje de proliferación celular obtenido para cada línea celular tratada con las diferentes concentraciones de NETs, tomando la proliferación del control como el 100%. En la Tabla 2 se muestran los valores de la media y el error estándar de la media de cada condición.

De manera general, en las tres líneas celulares (T24, 5637 y SV-HUC-1) puede verse una tendencia a disminuir la proliferación a concentraciones altas de NETs en comparación con concentraciones más bajas donde puede vislumbrarse un ligero incremento a concentraciones dosis-dependientes, presentando una proliferación más baja a concentraciones intermedias.

En la línea SV-HUC-1, se produjo un aumento de la proliferación tras el tratamiento con 50 ng/ml y 10 ng/ml de NETs, mientras que el tratamiento con 200 ng/ml de NETs disminuyó la proliferación celular (Figura 11C). No observamos diferencias en la proliferación de las células T24 y 5637 con las concentraciones de NETs estudiadas.

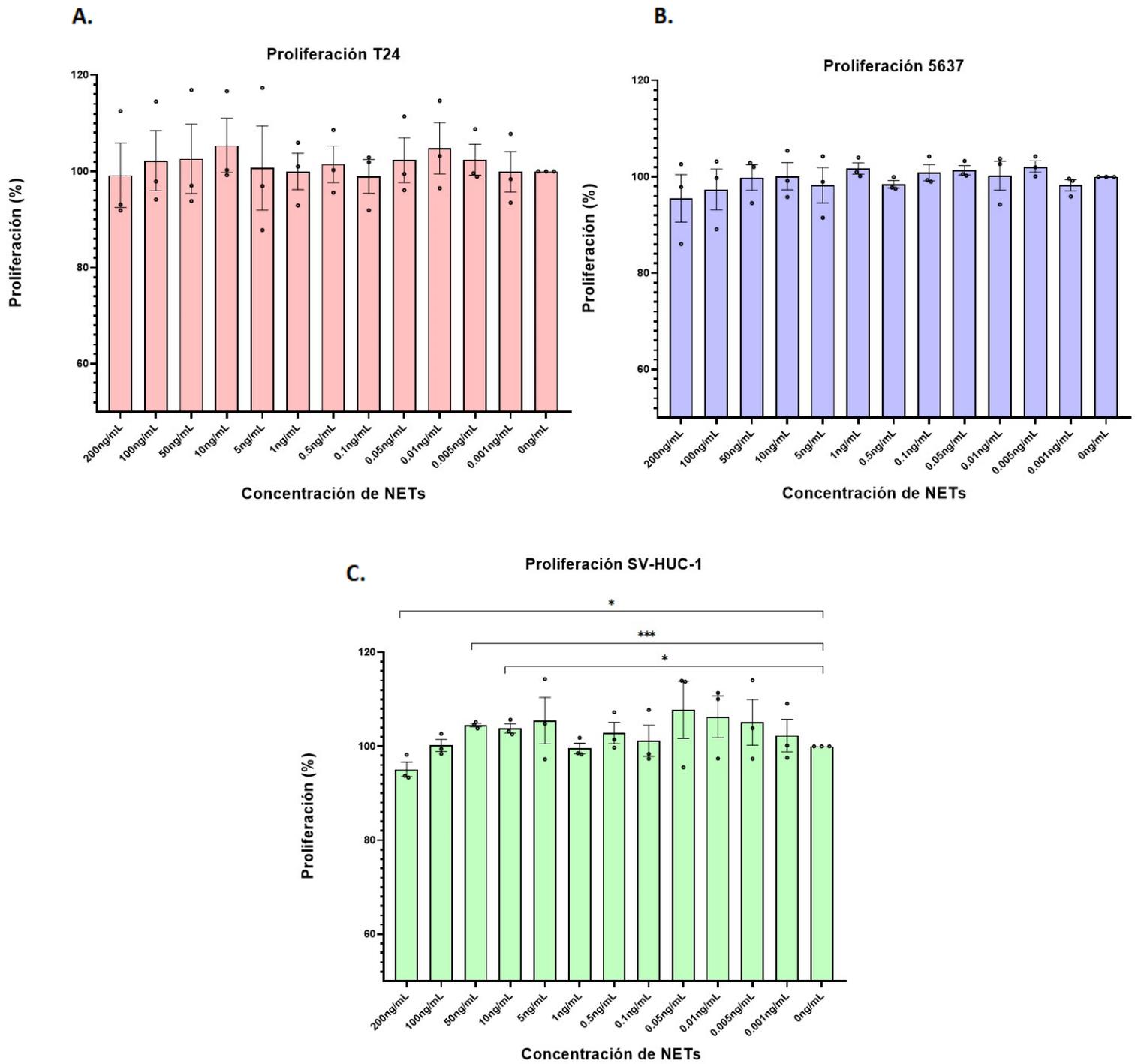


Figura 11 A.B.C Resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* de proliferación con las líneas T24, 5637 y SV-HUC-1, tratadas con las diferentes concentraciones de NETs indicadas. \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Tabla 2: Resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* de proliferación con las líneas celulares T24, 5637 y SV-HUC-1.

NETs	T24	5637	SV-HUC-1
200 ng/ml	99,17 (6,70)	95,54 (4,93)	95,11 (1,56) *
100 ng/ml	10,20 (6,26)	97,36 (4,24)	100,20 (1,29)
50 ng/ml	102,60 (7,22)	99,83 (2,65)	104,50 (0,39) ***
10 ng/ml	105,40 (5,64)	100,10 (2,82)	103,80 (0,95) *
5 ng/ml	100,70 (8,74)	98,24 (3,70)	105,50 (4,94)
1 ng/ml	99,97 (6,57)	101,70 (1,16)	99,56 (1,13)
0,5 ng/ml	101,50 (3,80)	98,43 (0,77)	102,80 (2,28)
0,1 ng/ml	98,92 (3,51)	100,90 (1,69)	101,20 (3,30)
0,05 ng/ml	102,30 (4,65)	101,40 (0,96)	107,80 (6,11)
0,01 ng/ml	104,80 (5,31)	100,20 (3,00)	106,30 (4,45)
0,005 ng/ml	102,40 (3,19)	102,10 (1,19)	105,10 (4,86)
0,001 ng/ml	99,89 (4,19)	98,23 (1,17)	102,30 (3,49)
0 ng/ml	100,00 (3,58x10 <sup>-8</sup> )	100,00 (6,20x10 <sup>-8</sup> )	100,00 (4,04x10 <sup>-8</sup> )

Los resultados se muestran como medias y error estándar medio. \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

## 2.2 Ensayo *in vitro* de migración celular

En la realización de este ensayo se trabajó con dos líneas celulares 5637 y T24. Para analizar la implicación de los NETs en la migración del cáncer vesical, se probaron las siguientes condiciones por triplicado: 200 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 1 ng/ml, 0,5 ng/ml. Por problemas técnicos con el microscopio time-lapse solo se pudieron realizar dos experimentos con las líneas 5637 y T24.

La Figura 12 muestra el % de migración de cada una de las líneas celulares tratadas con NETs, tomando la proliferación del control como el 100%. En la Tabla 3 se muestran los valores de la media y el error estándar de la media de cada condición.

En la línea T24 se produjo una disminución en la migración tras tratar las células con prácticamente todas las concentraciones de NETs evaluadas (Figura 12A). Por el contrario, el tratamiento con NETs no alteró la capacidad de migrar de las células 5637 (Figura 12B).

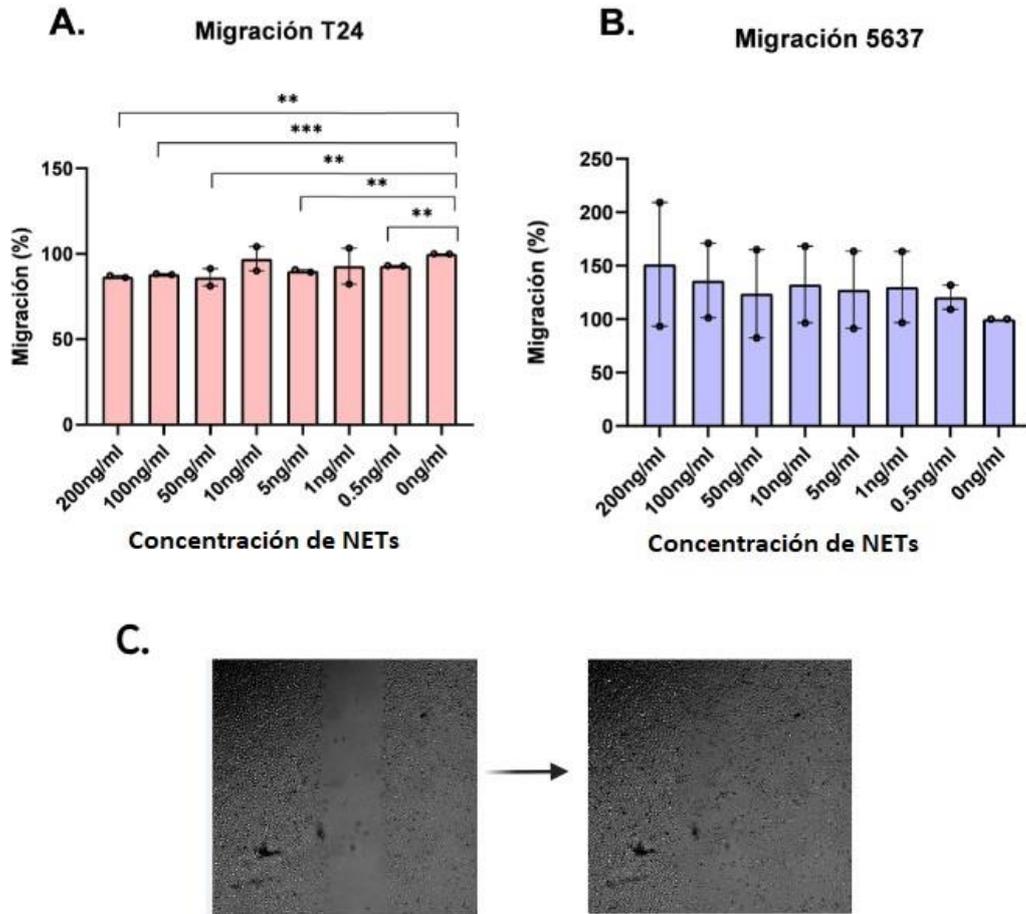


Figura 12: A. B. Resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* de migración con las líneas T24 y 5637, tratadas con las diferentes concentraciones de NETs indicadas. C. Evolución del cierre de la herida en un ensayo de migración. \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Tabla 3: Resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* de migración con las líneas celulares T24 y 5637.

[NETs]	T24	5637
<b>200ng/ml</b>	86,61 (0,54) **	151,40 (57,96)
<b>100ng/ml</b>	88,03 (0,28) ***	136,20 (34,87)
<b>50ng/ml</b>	90,47 (0,82) **	123,80 (41,20)
<b>10ng/ml</b>	97,11 (7,06)	132,50 (35,84)
<b>5ng/ml</b>	89,95 (0,78) ***	127,50 (36,19)
<b>1ng/ml</b>	92,81 (10,55)	130,10 (33,35)
<b>0,5ng/ml</b>	92,98 (0,12) **	120,50 (11,34)
<b>0 ng/ml</b>	100,00 (3,33x10 <sup>-8</sup> )	100,00 (5x10 <sup>-8</sup> )

Los resultados se muestran como medias y error estándar medio. \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

### 2.3 Ensayo *in vitro* de invasión celular

Para analizar la implicación de los NETs en la invasión del cáncer vesical, se probaron distintas concentraciones de los mismos: 100 ng/ml, 50 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 0,1 ng/ml y 0 ng/ml.

La Figura 13 muestra el % de invasión de cada una de las líneas celulares tratadas con NETs, tomando la invasión del control como el 100%. En la Tabla 4 se muestran los valores de la media y el error estándar de la media de cada condición.

El tratamiento de las células 5637 con 50 ng/ml de NETs redujo la capacidad de invasión de las células (Figura 13B). Sin embargo, los valores obtenidos para las líneas T24 (Figura 13A) y SV-HUC-1 (Figura 13C) muestran una elevada dispersión, por lo que no se ven efectos significativos del tratamiento con NETs.

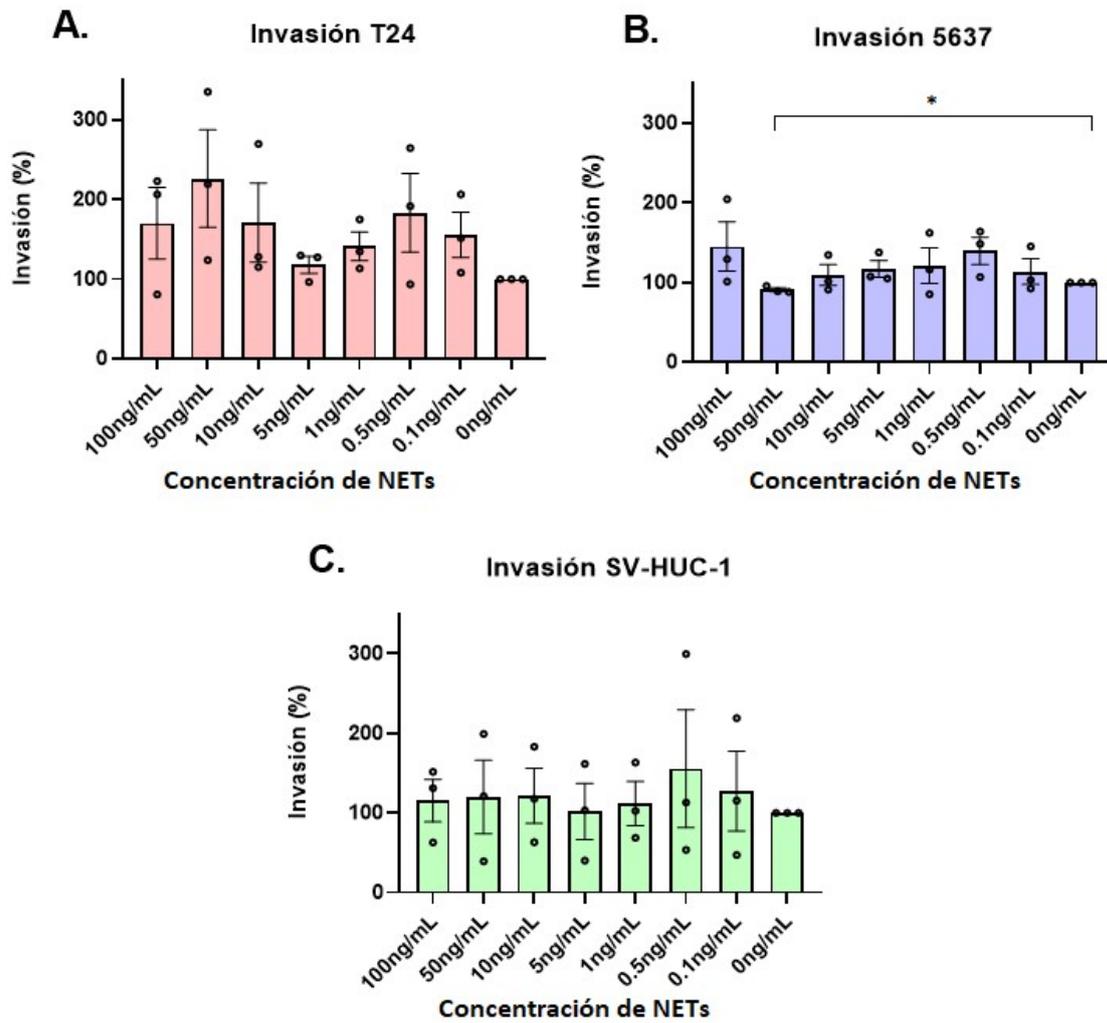


Figura 13: A.B.C Resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* de invasión con las líneas T24, 5637 y SV-HUC-1, tratadas con las diferentes concentraciones de NETs indicadas. D. Imagen obtenida del ensayo de invasión en la que se pueden observar las células a que han pasado a través del inserto, teñidas de morado debido al cristal violeta. \* $P < 0,05$ .

Tabla 4: Resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* de invasión con las líneas celulares T24, 5637 y SV-HUC-1.

[NETs]	T24	5637	SV-HUC-1
<b>100ng/ml</b>	179,00 (44,98)	145,10 (30,77)	115,20 (26,80)
<b>50ng/ml</b>	226,00 (61,11)	91,00 (2,41) *	119,70 (46,14)
<b>10ng/ml</b>	170,80 (49,51)	109,20 (13,12)	121,30 (34,63)
<b>5ng/ml</b>	117,70 (10,68)	116,80 (10,49)	101,60 (35,10)
<b>1ng/ml</b>	140,90 (18,10)	121,20 (22,39)	111,50 (27,70)
<b>0,5ng/ml</b>	183,10 (49,48)	139,80 (17,11)	155,40 (74,03)
<b>0,1 ng/ml</b>	155,30 (28,41)	113,70 (16,17)	127,10 (49,98)
<b>0 ng/ml</b>	100,00 (4,84x10 <sup>-8</sup> )	100,00 (1,00x10 <sup>-7</sup> )	100,00 (5,87x10 <sup>-8</sup> )

Los resultados se muestran como medias y error estándar medio. \* $P < 0,05$ .

### 3. Evaluación del estado procoagulante en el entorno tumoral e inducido por los NETs

En primer lugar, se realizó el test de generación de trombina para estudiar el efecto procoagulante de las líneas celulares, el medio condicionado y los NETs sobre un pool de plasma de voluntarios sanos.

Como puede verse en la Figura 14, todas las líneas celulares y sus medios condicionados estudiados indujeron una mayor generación de trombina y de forma más rápida en comparación con el control. Este efecto se observa cuando analiza ambas vías de la coagulación, teniendo un efecto mayor en la vía extrínseca. Por la vía extrínseca (Figura 14A) y comparado con el pool de plasmas, la línea celular 5637 indujo la mayor generación de trombina y de aparición más rápida que el resto de las condiciones de estudio, seguida de la línea T24, y sus medios condicionados respectivamente. Por último, la línea SV-HUC-1 y su medio condicionado aumentaron la generación de trombina de forma significativa, aunque en menor medida que las anteriores. Todas las líneas celulares y sus correspondientes medios condicionados presentaron una modificación significativa de todos los parámetros estudiados con respecto al pool de plasmas. Así mismo, cada línea celular tuvo un efecto mayor en comparación con sus medios condicionados.

Por la vía intrínseca, observamos el mismo efecto, aunque de manera más discreta (Anexo 1).

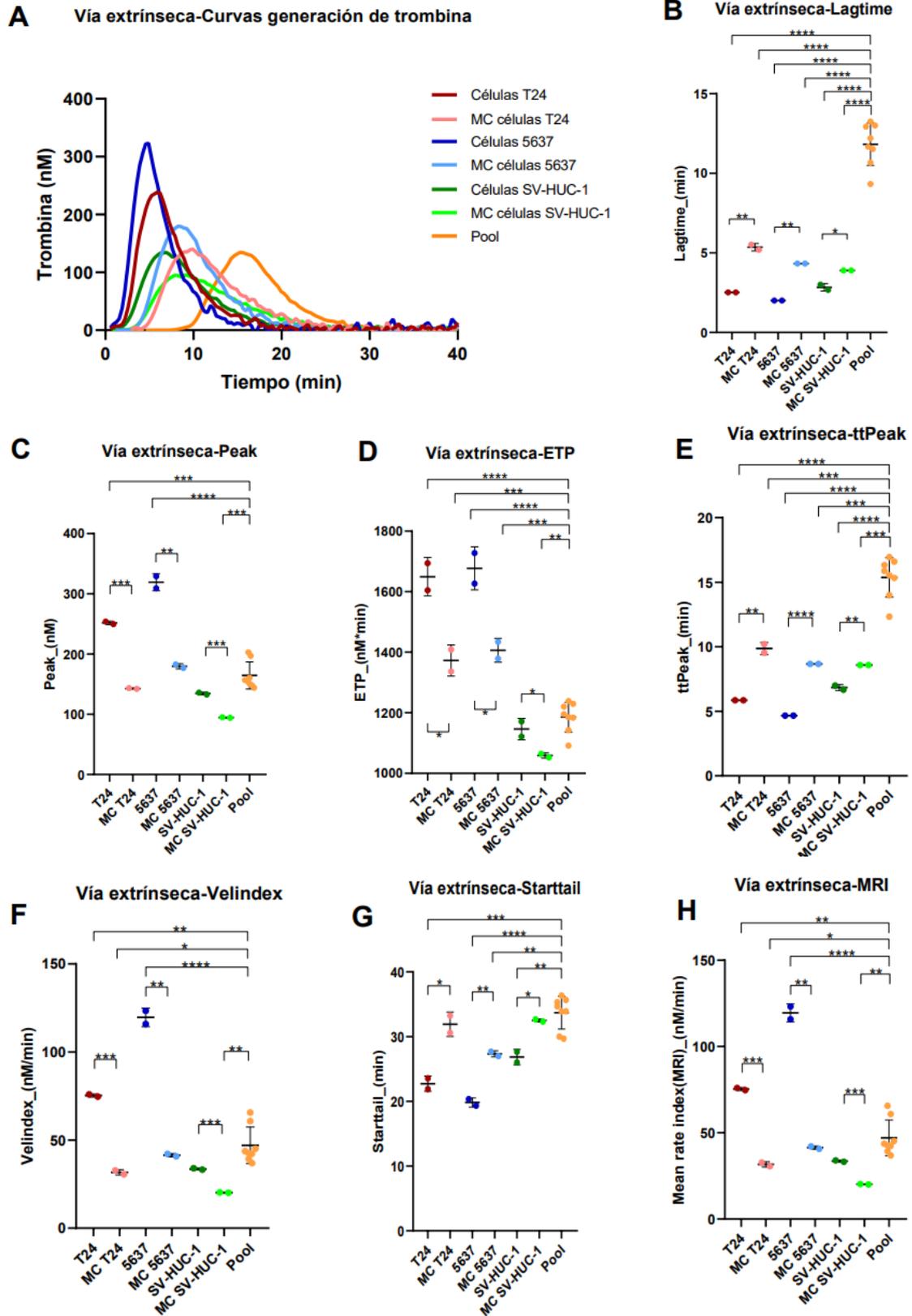


Figura 14: Resultados obtenidos en el TGT por la vía extrínseca realizado con las líneas T24, 5637, SV-HUC-1, y sus medios condicionados correspondientes (MC). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Además, se analizó el potencial efecto protrombótico de los NETs, obteniendo un efecto más marcado por la vía intrínseca. Como puede verse en la Figura 15A, los NETs redujeron el tiempo de inicio de generación de trombina, es decir se produjo antes y se obtuvo una concentración máxima de trombina mayor como se puede ver en los parámetros de Lagtime (Figura 15B) y Peak (Figura 15C).

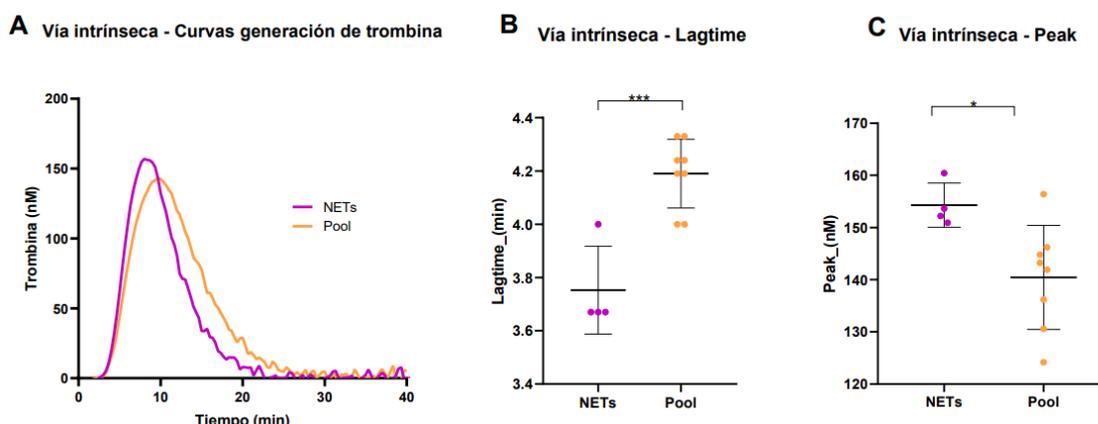


Figura 15: Resultados obtenidos en el TGT por la vía intrínseca realizado con NETs. \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Finalmente, analizamos si los NETs alteraban el estado procoagulante en el entorno tumoral mediante el ensayo de los medios condicionados de las células tratadas con NETs a diferentes concentraciones (200 ng/ml, 1ng/ml, 0,1 ng/ml y 0,01 ng/ml).

Como puede verse en la Figura 16A y 16D, los medios condicionados de las líneas T24 y SV-HUC-1 tratadas con NETs aumentaron la generación de trombina por la vía extrínseca y de forma más rápida que la del pool de plasmas. No observamos el mismo efecto con la línea 5637 (datos no mostrados).

Sin embargo, al analizar el efecto del tratamiento de las células con NETs, observamos que redujo significativamente la capacidad de generar trombina en la línea T24, comparado con el medio condicionado de las células sin tratar (Figuras 16B y 16C). Por contra, el tratamiento de las células SV-HUC-1 con 200 ng/ml de NETs incrementó la generación de trombina del medio condicionado (Figuras 16E y 16F).

Los resultados obtenidos por la vía intrínseca se pueden encontrar en el Anexo 2.

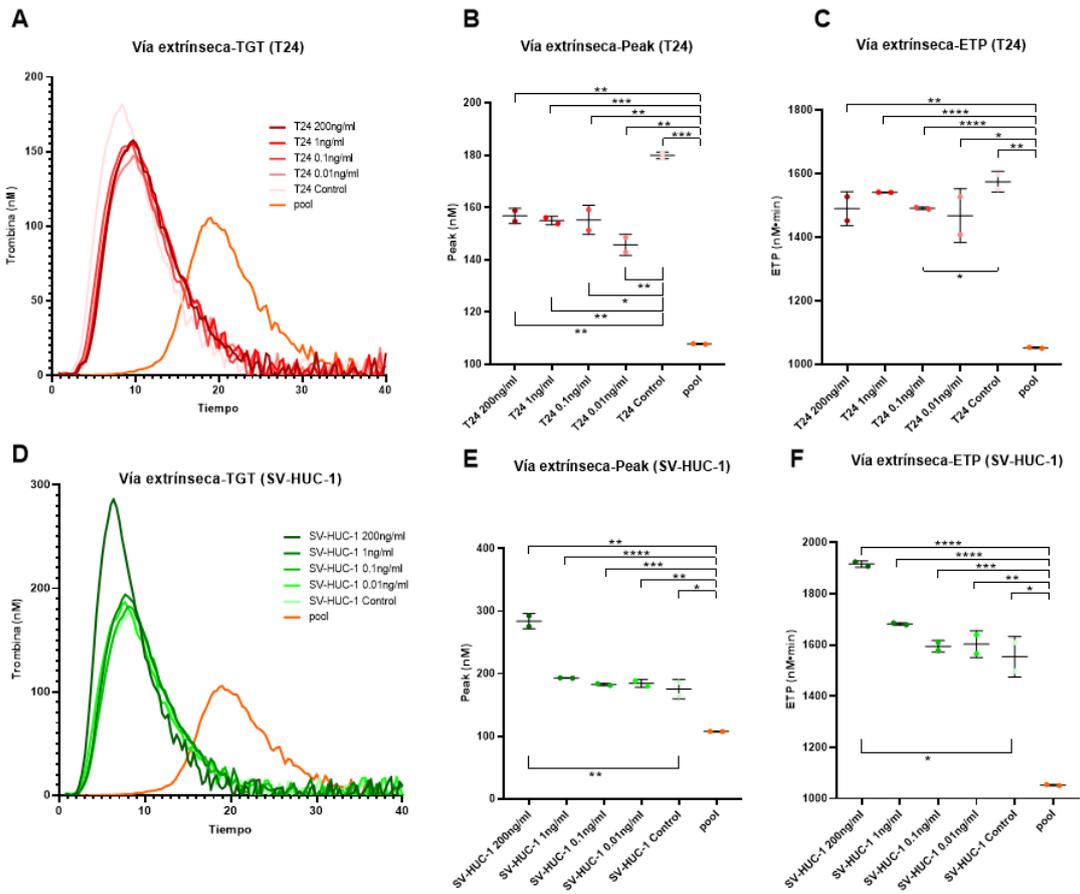


Figura 16: Resultados obtenidos en el TGT por la vía extrínseca realizado con los medios condicionados (MC) de las líneas celulares T24 (A-C) y SV-HUC-1 (D-F) tratadas con las concentraciones de NETs indicadas. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

## DISCUSIÓN

Aunque los NETs juegan un papel crucial en la defensa del organismo ante patógenos, estos también se han visto relacionados en diferentes patologías como el cáncer. Las células tumorales son capaces de reclutar a los neutrófilos y estimularlos para que liberen NETs al microambiente tumoral. Con lo estudiado hasta el momento en el campo de los NETs, se ha podido evidenciar su relación e influencia en la capacidad de invasión, migración y proliferación del cáncer, tal y como se discutirá a continuación. Por otro lado, en la referente a la inmunotrombosis, la hipercoagulabilidad sanguínea es una afección muy común en pacientes con cáncer, siendo el TEV el tipo de evento más común, que representa la segunda causa de muerte en los pacientes oncológicos. Las células tumorales se encuentran directamente implicadas al inducir y amplificar la generación de trombina (34). Así mismo, los NETs también desempeñan un papel en la aparición de trombosis ya que proporcionan un andamio y estímulo para la unión y agregación plaquetaria, son capaces de activar al FXII y de inhibir a los anticoagulantes naturales como la proteína C activada y el inhibidor de la vía del factor tisular (35).

El papel de los NETs en el cáncer es un tema estudiado en distintos tipos de neoplasias, por ejemplo, se ha podido confirmar *in vitro* la asociación de una mayor presencia de NETs obtenidos de neutrófilos de pacientes con cáncer colorrectal, así como un peor pronóstico de los pacientes que presentan niveles más elevados de los mismos (36). Por otro lado, con células de carcinoma pulmonar murinas (H59) y humanas (A549), se ha demostrado el papel de los NETs como responsables de la migración e invasión de las células tumorales *in vitro*, demostrando así que los NETs son capaces de atrapar a las células tumorales e inducir la invasión y migración del cáncer (37). Así mismo, se ha demostrado el papel de los NETs en el crecimiento tumoral y metástasis en ensayos realizados con línea celulares de cáncer pancreático (AsPC-1) (38) y cáncer gástrico (39, 40, 41).

En lo referente al cáncer vesical, se ha descrito la existencia de un aumento significativo de neutrófilos en pacientes en comparación con controles sanos, presentando un pronóstico desfavorable aquellos con un recuento mayor de los mismos (42). En un estudio reciente de nuestro grupo (29), observamos que los pacientes con cáncer vesical tenían una mayor NETosis a nivel sistémico que los controles sanos, y aquellos pacientes con un subtipo tumoral más agresivo presentaban una mayor NETosis en el microambiente tumoral que los tejidos de los tumores de subtipos más leves. Este aumento de NETosis en los pacientes es en parte debido a una reducción de la actividad DNaseI plasmática que produce una menor capacidad de degradar los NETs que se generan. Cabe destacar que demostramos que este déficit puede ser corregido *in*

*in vitro* con la administración de Pulmozyme® hasta el nivel de los controles sanos. En los ensayos *in vitro* realizados en este TFM, se ha buscado confirmar la relación existente entre los NETs y la progresión del cáncer vesical, aunque no se han obtenido resultados significativos que respalden la hipótesis sugerida. Esto plantea la posibilidad de reconsiderar el modelo de los protocolos realizados y buscar nuevas vías de realización.

En lo referente a los resultados obtenidos en el ensayo de migración, se obtuvo una disminución significativa en la capacidad de migración de la línea celular T24. Liu *et al.*, 2019, realizaron ensayos similares de migración con “herida” e invasión con insertos y líneas celulares de cáncer vesical. En ambos casos obtuvieron que los NETs disminuían significativamente la migración, así como una leve disminución de la invasión de estas células. La diferencia con respecto a nuestro estudio radica en que, en su caso, los neutrófilos fueron estimulados para formar NETs con BCG (Bacillus Calmette-Guerin), que se usa como tratamiento para el cáncer vesical, lo que puede explicar sus resultados. Esto puede sugerir que los NETs inducen un ambiente citotóxico que aumenta la muerte celular y por lo tanto disminuye la migración e invasión de las células tumorales (31). En este TFM la NETosis se estimuló con PMA, buscando el efecto que los NETs tendrían en el ambiente tumoral previo sin ningún tratamiento, esperando ver un fenotipo protumoral por su parte, aunque no ha sido evidenciado.

Por otro lado, también se ha querido estudiar el efecto procoagulante de los NETs, de las células tumorales y sus medios condicionados y del entorno tumoral tras ser tratadas con NETs. Como se ha comentado en apartados anteriores, la coagulación puede iniciarse de dos maneras diferentes la vía extrínseca y la intrínseca. La vía extrínseca se activa por la exposición al torrente sanguíneo del FT, mientras que la vía intrínseca activa la coagulación por exposición de cargas negativas. En un primer lugar evaluamos la capacidad procoagulante de las células y sus medios condicionados en el ensayo de TGT. Observamos que las células y sus medios condicionados aumentaron la generación de trombina por ambas vías de la coagulación, aunque el efecto fue más por la vía extrínseca. Estos resultados ponen de manifiesto que estas células expresan en su superficie moléculas capaces de activar la vía extrínseca de la coagulación como, por ejemplo, FT (34), entre otras moléculas procoagulantes. Parte de estas moléculas serán liberadas al medio condicionado, lo que explicaría que éste también aumente la generación de trombina, pero en menor medida que las células. Por otro lado, aunque en menor medida, también se dio un aumento en la generación de trombina por la vía intrínseca. Se ha descrito que células tumorales son capaces de presentar polímeros de cadena larga, la carga negativa de los cuales puede activar a FXII y por tanto iniciar la vía intrínseca (43).

Seguidamente, evaluamos la capacidad procoagulante de los NETs, y observamos un aumento muy significativo en la generación de trombina por la vía intrínseca. esto se debe a que su

superficie se encuentra recubierta de cargas negativas, lo cual produce la activación del FXII y el inicio de la coagulación por esta vía.

Finalmente analizamos si los NETs son capaces de inducir un estado procoagulante en el microambiente tumoral analizando en el TGT los medios condicionados de las líneas celulares tratadas previamente con diferentes concentraciones de NETs. Paradójicamente, observamos una disminución en la capacidad procoagulante de los medios condicionados de las células T24 tratadas con NETs, en comparación con el medio condicionado de las células sin tratar. Este efecto podría ser debido a que los NETs promuevan la supervivencia de las células de cáncer vesical del subtipo más grave, lo cual reduciría la liberación al medio condicionado de las moléculas procoagulantes que estas células presentan en superficie y, con ello, la generación de trombina por la vía extrínseca. Por el contrario, en las células de urotelio sano SV-HUC-1, observamos que las concentraciones más bajas de NETs no modifican el estado procoagulante de su entorno, mientras que la concentración más alta evaluada lo incrementa significativamente. Esto podría ser debido a que los NETs a concentraciones bajas resultan inocuos para estas células o incluso promover la proliferación celular, pero a concentraciones altas los NETs resultan citotóxicos promoviendo la muerte celular y, con ello, la liberación al medio de moléculas procoagulantes de superficie que aumentan la generación de trombina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los ensayos de proliferación *in vitro*. El tratamiento de las células 5637 de fenotipo intermedio con NETs no modificó el estado procoagulante de su entorno.

A pesar de haber probado diferentes métodos para disgregar los NETs y que la sonicación de los NETs permitía su disgregación casi completa, éstos tendían a reagruparse con el tiempo, lo que fomenta la variabilidad de los resultados obtenidos en las réplicas de cada uno de los experimentos realizados, puesto que no pudimos garantizar que todas las alícuotas de NETs empleadas tenían la misma concentración. Esto podría, en parte, explicar la discordancia entre nuestra hipótesis y los resultados obtenidos en los experimentos de regulación del comportamiento de las células tumorales por parte los NETs (ensayos de proliferación, migración e invasión). Por ello, en futuros estudios debemos explorar nuevas formas de disgregar los agregados de NETs una vez aislados, como el uso de la enzima de restricción AluI, que parece generar fragmentos grandes y heterogéneos de doble cadenas de ADN de los NETs (44). Probar de nuevo con diferentes concentraciones o tipos de DNAsas no sería de utilidad, ya que se ha descrito que generan fragmentos de ADN de simple cadena que pueden ser citotóxicos para las células y, además, con este tipo de disgregación los NETs pueden perder sus capacidades microbicidas (44). Otra limitación que hemos evidenciado en este estudio y que otros investigadores han manifestado recientemente en el congreso de la International Society on Thrombosis and Haemostasis (Montreal, Julio 2023), es que los NETs obtenidos de diferentes individuos son muy variables en concentración y contenido proteico. Esto podría ser debido a que cada uno de los donantes podría

tener un diferente estado inflamatorio o infeccioso subyacente que modificaría la composición de sus neutrófilos y, por ende, de los NETs. Es por ello que, para realizar experimentos futuros, prepararemos un pool con los NETs que hemos obtenido de diferentes individuos para reducir esta variabilidad e incrementar la reproducibilidad de los resultados. En última instancia, cabe destacar que no se puede descartar la posibilidad de que los NETs en sí no promuevan la progresión tumoral en el cáncer vesical.

Por último, las células SV-HUC-1 de urotelio sano no son el control más adecuado para los experimentos de generación de trombina, puesto que fisiológicamente no está en contacto permanente con la sangre y debe expresar moléculas procoagulantes en su superficie, tal y como hemos evidenciado que aumenta la generación de trombina. Aunque en ningún caso hemos comparado el estado procoagulante entre tipos celulares, en caso de querer usar un control, deberían haber sido células endoteliales de cultivo primario. Su idoneidad como control para los experimentos de proliferación, migración e invasión también podría ser cuestionable puesto que se trata de una línea celular inmortalizada cuyo comportamiento puede estar alterado. Sin embargo, es el tipo celular que otros autores utilizan como control y que recomienda ATCC.

## CONCLUSIONES

1. El tratamiento con NETs de las células de cáncer vesical T24 de subtipo más grave disminuye su capacidad de migración, a cualquier concentración. Los NETs no modifican su capacidad de proliferación o invasión a ninguna de las concentraciones estudiadas.
2. El tratamiento con concentraciones altas de NETs de las células de cáncer vesical 5637 de subtipo más leve disminuye su capacidad de invasión. Los NETs no modifican su capacidad de proliferación o migración a ninguna de las concentraciones estudiadas.
3. El tratamiento con concentraciones bajas de NETs de las células SV-HUC-1 de urotelio sano aumenta su capacidad de proliferación, mientras que las concentraciones altas de NETs parecen ser citotóxicas, disminuyendo su capacidad de proliferación. Los NETs no modifican su capacidad de invasión a ninguna de las concentraciones estudiadas.
4. Todos los tipos de células de cáncer vesical estudiados promueven un estado procoagulante, posiblemente mediado por moléculas expresadas en su superficie. Esto podría explicar el incremento del riesgo de trombosis asociada a cáncer en estos pacientes.
5. Los NETs promueven un estado procoagulante a través de las cargas negativas presentes en su estructura de malla.
6. El tratamiento con NETs de las células de cáncer vesical T24 de subtipo más grave disminuye el estado procoagulante del entorno tumoral, a cualquier concentración. Esto podría ser debido a que los NETs promuevan la supervivencia celular y, con ello, se disminuya la liberación al entorno tumoral de las moléculas procoagulantes expresadas en su superficie.
7. El tratamiento con NETs de las células de cáncer vesical 5637 de subtipo más leve no modifica el estado procoagulante del entorno tumoral, a cualquier concentración.
8. El tratamiento con concentraciones bajas de NETs de las células SV-HUC-1 de urotelio sano no modifica el estado procoagulante de su entorno. Sin embargo, las concentraciones altas de NETs parecen resultar citotóxicas promoviendo la muerte celular y, con ello, la liberación al entorno celular de las moléculas procoagulantes expresadas en su superficie. Estos resultados concuerdan los obtenidos en los ensayos de proliferación.
9. Con la finalidad de reducir la variabilidad de los resultados obtenidos, es necesario refinar el proceso de disgregación de los NETs para que la suspensión sea homogénea y preparar un pool con los NETs obtenidos de todos los voluntarios.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71(3):209-49.
2. Lobo N, Afferi L, Moschini M, Mostafid H, Porten S, Psutka SP, et al. Epidemiology, Screening, and Prevention of Bladder Cancer. *Eur Urol Oncol.* 2022; 5(6):628-39.
3. American cancer society. Estadísticas importantes sobre el cáncer de vejiga. (consultado 19 de junio de 2023). Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-vejiga/acerca/estadisticas-clave.html>.
4. .Macmillan Cancer Support . Staging and grading of bladder cancer. (consultado 27 de julio de 2023). Disponible en: <https://www.macmillan.org.uk/cancer-information-and-support/bladder-cancer/staging-and-grading-of-bladder-cancer>.
5. Herranz R, Oto J, Plana E, Fernández-Pardo Á, Cana F, Martínez-Sarmiento M, et al. Circulating Cell-Free DNA in Liquid Biopsies as Potential Biomarker for Bladder Cancer: A Systematic Review. *Cancers.* 2021; 13(6):1448.
6. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13(1):34-45.
7. Thâlin C, Hisada Y, Lundström S, Mackman N, Wallén H. Neutrophil Extracellular Traps: Villains and Targets in Arterial, Venous, and Cancer-Associated Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019; 39(9):1724-38.
8. Ronchetti L, Boubaker NS, Barba M, Vici P, Gurtner A, Piaggio G. Neutrophil extracellular traps in cancer: not only catching microbes. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021; 40(1):231.
9. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science.* 2004; 303(5663):1532-5.

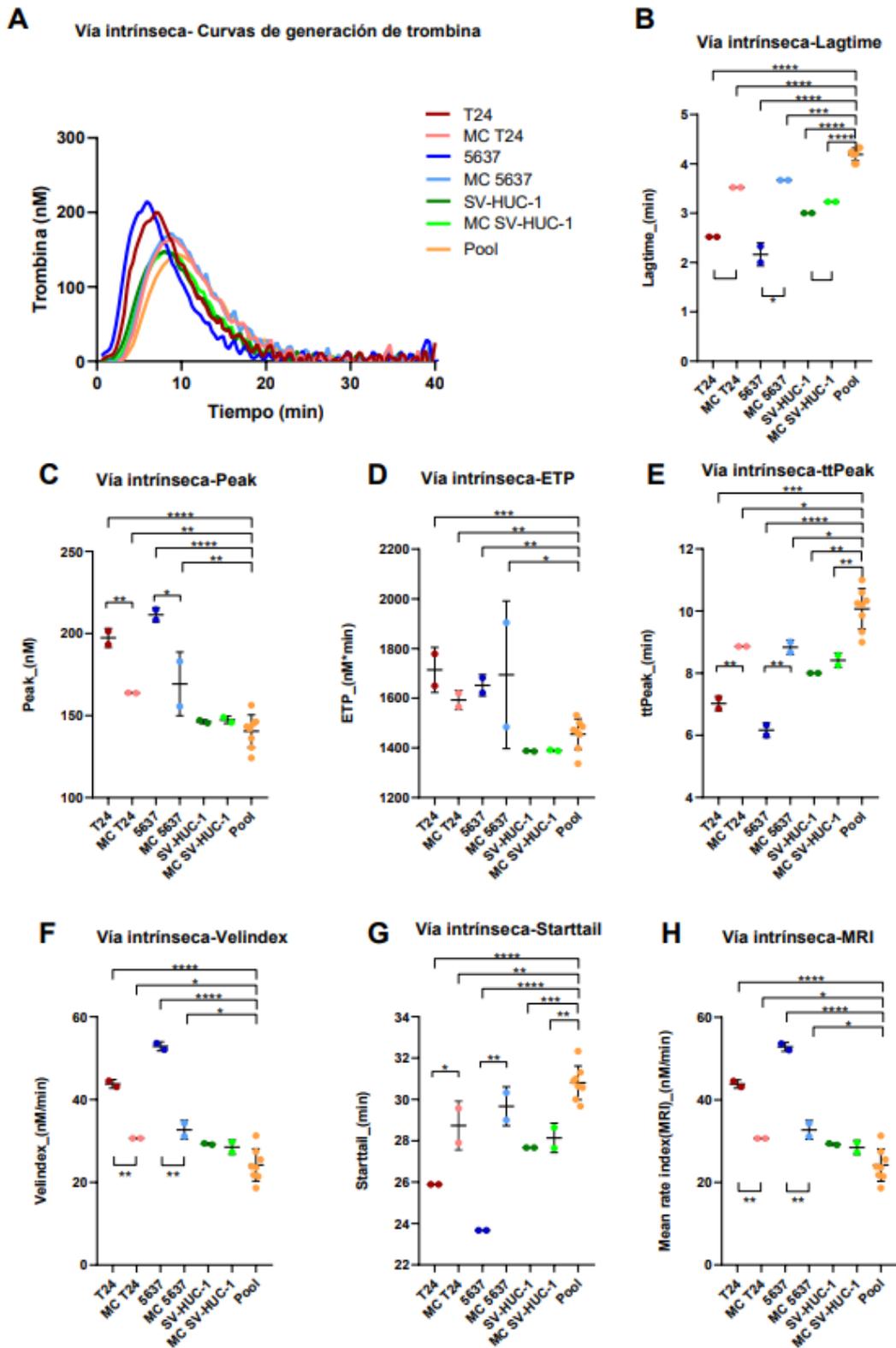
10. Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32(8):1777-83.
11. Bonaventura A, Liberale L, Carbone F, Vecchié A, Diaz-Cañestro C, Camici GG, et al. The Pathophysiological Role of Neutrophil Extracellular Traps in Inflammatory Diseases. *Thromb Haemost.* 2018; 118(01):006-27.
12. Kapoor S, Opneja A, Nayak L. The role of neutrophils in thrombosis. *Thrombosis Research.* 2018; 170:87-96
13. Thiam HR, Wong SL, Wagner DD, Waterman CM. Cellular Mechanisms of NETosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2020; 36:191-218
14. Martos L, Oto J, Fernández-Pardo Á, Plana E, Solmoirago MJ, Cana F, et al. Increase of Neutrophil Activation Markers in Venous Thrombosis-Contribution of Circulating Activated Protein C. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(16):5651.
15. Medina P, Navarro S, Orbe J. Principios básicos de la hemostasia. En: Paramo J, Gonzalez-Porras. J, Mateo J. Hemostasia y trombosis manual práctica. Castellón: ARAN ediciones SL; 2018. 21-27.
16. De Meo ML, Spicer JD. The role of neutrophil extracellular traps in cancer progression and metastasis. *Semin Immunol.* 2021; 57:101595.
17. Demers M, Krause DS, Schatzberg D, Martinod K, Voorhees JR, Fuchs TA, et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109(32):13076-81.
18. Hueso M, Gil A, Medina P. La importancia de los neutrófilos en la inmunotrombosis. *Inmunología* 2021; 40(1): 13-17.
19. Castaño M, Tomás-Pérez S, González-Cantó E, Aghababyan C, Mascarós-Martínez A, Santonja N, et al. Neutrophil Extracellular Traps and Cancer: Trapping Our Attention with Their Involvement in Ovarian Cancer. *IJMS.* 2023; 24(6):5995
20. Wang H, Zhang Y, Wang Q, Wei X, Wang H, Gu K. The regulatory mechanism of neutrophil extracellular traps in cancer biological behavior. *Cell Biosci.* 2021; 11(1):193.

21. Yang L, Liu Q, Zhang X, Liu X, Zhou B, Chen J, et al. DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25. *Nature*. 2020; 583(7814):133-8.
22. Demers M, Wong SL, Martinod K, Gallant M, Cabral JE, Wang Y, et al. Priming of neutrophils toward NETosis promotes tumor growth. *Oncoimmunology*. 2016; 5(5):e1134073.
23. Fang Q, Stehr AM, Naschberger E, Knopf J, Herrmann M, Stürzl M. No NETs no TIME: Crosstalk between neutrophil extracellular traps and the tumor immune microenvironment. *Front Immunol*. 2022; 13:1075260.
24. Hu W, Lee SML, Bazhin AV, Guba M, Werner J, Nieß H. Neutrophil extracellular traps facilitate cancer metastasis: cellular mechanisms and therapeutic strategies. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2023; 149(5):2191-210.
25. Khan U, Chowdhury S, Billah MM, Islam KMD, Thorlacius H, Rahman M. Neutrophil Extracellular Traps in Colorectal Cancer Progression and Metastasis. *IJMS*. 2021; 22(14):7260.
26. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 1989; 8(2):98-101.
27. Lee W, Ko SY, Mohamed MS, Kenny HA, Lengyel E, Naora H. Neutrophils facilitate ovarian cancer premetastatic niche formation in the omentum. *Journal of Experimental Medicine*. 2018; 216(1):176-94.
28. Rayes RF, Mouhanna JG, Nicolau I, Bourdeau F, Giannias B, Rousseau S, et al. Primary tumors induce neutrophil extracellular traps with targetable metastasis promoting effects. *JCI Insight*. 2019; 5(16):e128008, 128008.
29. Herranz R, Oto J, Hueso M, Plana E, Cana F, Castaño M, et al. Bladder cancer patients have increased NETosis and impaired DNaseI-mediated NET degradation that can be therapeutically restored in vitro. *Front Immunol*. 2023; 14:1171065.
30. Liu K, Zhao K, Wang L, Sun E. The prognostic values of tumor-infiltrating neutrophils, lymphocytes and neutrophil/lymphocyte rates in bladder urothelial cancer. *Pathol Res Pract*. 2018;214(8):1074-80.

31. Liu K, Sun E, Lei M, Li L, Gao J, Nian X, et al. BCG-induced formation of neutrophil extracellular traps play an important role in bladder cancer treatment. *Clinical Immunology*. 2019; 201:4-14
32. McNamee N, O'Driscoll L. Miniaturized In Vitro Assays to Study Cellular Phenotypic Characteristics: Proliferation, Migration, Invasion, and Anoikis-Resistance. *Methods Mol Biol*. 2021; 2283:225-32.
33. Tonello S, Rizzi M, Migliario M, Rocchetti V, Renò F. Low concentrations of neutrophil extracellular traps induce proliferation in human keratinocytes via NF-kB activation. *Journal of Dermatological Science*. 2017; 88(1):110-6.
34. Rousseau A, Larsen AK, Van Dreden P, Sabbah M, Elalamy I, Gerotziafas GT. Differential contribution of tissue factor and Factor XII to thrombin generation triggered by breast and pancreatic cancer cells. *International Journal of Oncology*. 2017; 51(6):1747-56.
35. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(36):15880-5.
36. Richardson JJR, Hendrickse C, Gao-Smith F, Thickett DR. Neutrophil Extracellular Trap Production in Patients with Colorectal Cancer In Vitro. *Int J Inflam*. 2017; 2017:4915062.
37. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest*. 2013; 123(8):3446-58.
38. Jung HS, Gu J, Kim JE, Nam Y, Song JW, Kim HK. Cancer cell-induced neutrophil extracellular traps promote both hypercoagulability and cancer progression. *PLoS One*. 2019; 14(4):e0216055.
39. Xia X, Zhang Z, Zhu C, Ni B, Wang S, Yang S, et al. Neutrophil extracellular traps promote metastasis in gastric cancer patients with postoperative abdominal infectious complications. *Nat Commun*. 2022; 13:1017.

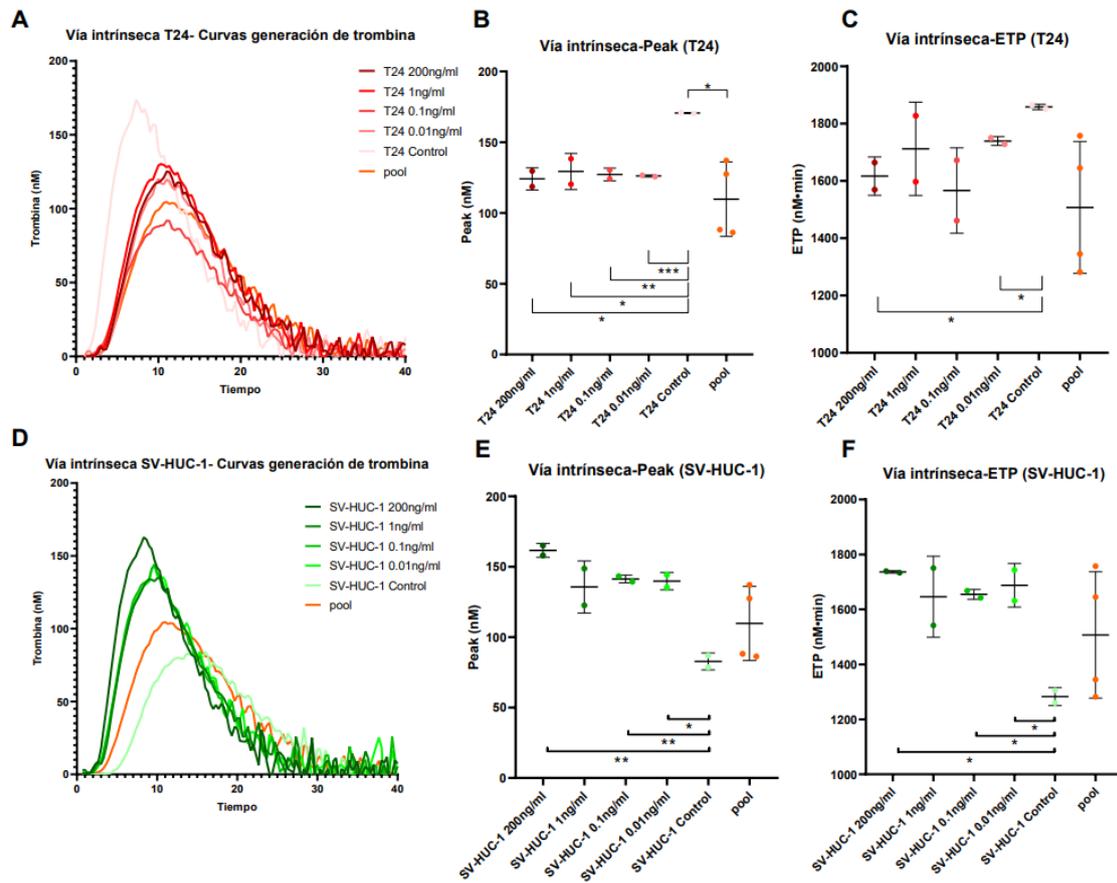
40. Li S, Cong X, Gao H, Lan X, Li Z, Wang W, et al. Tumor-associated neutrophils induce EMT by IL-17a to promote migration and invasion in gastric cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019; 38:6.
41. Demkow U. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Cancer Invasion, Evasion and Metastasis. *Cancers (Basel).* 2021;13(17):4495.
42. Shen M, Hu P, Donskov F, Wang G, Liu Q, Du J. Tumor-Associated Neutrophils as a New Prognostic Factor in Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2014; 9(6):e98259.
43. Marchetti M, Diani E, ten Cate H, Falanga A. Characterization of the thrombin generation potential of leukemic and solid tumor cells by calibrated automated thrombography. *Haematologica.* 2012; 97(8):1173-80.
44. Barrientos L, Marin-Esteban V, de Chaisemartin L, Le-Moal VL, Sandré C, Bianchini E, et al. An improved strategy to recover large fragments of functional human neutrophil extracellular traps. *Front Immunol.* 2013;4:166.

# ANEXO 1



Resultados obtenidos en el TGT por la vía intrínseca realizado con las líneas T24, 5637, SV-HUC-1, y sus medios condicionados correspondientes (MC). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

## ANEXO 2



Resultados obtenidos en el TGT por la vía intrínseca realizado con los medios condicionados (MC) de las líneas celulares T24 (A-C) y SV-HUC-1 (D-F) tratadas con las concentraciones de NETs indicadas. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .