

ANDREW VICTOR DINIZ SARDINHA

“Papel das Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs) na modulação funcional de macrófagos infectados por *Leishmania*”



**Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
Abril 2020

**Trabalho realizado no Departamento de Imunologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação dos Professores Elvira Saraiva e Anderson Guimarães.**

**FICHA CATALOGRAFICA****CIP - Catalogação na Publicação**

SS244p Sardinha, Andrew Victor Diniz  
Papel das NETs na modulação funcional de macrófagos infectados por Leishmania / Andrew Victor Diniz Sardinha. -- Rio de Janeiro, 2020.  
60 f.

Orientadora: Elvira Saraiva.

Coorientador: Anderson Guimarães.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2020.

1. Macrófagos. 2. Leishmania Amazonensis. 3. Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs). 4. Imunomodulação. I. Saraiva, Elvira, orient. II. Guimarães, Anderson, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ**  
**COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE  
 TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS  
 BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Andrew Victor Diniz Sardinha**

DRE: 116016921

BANCA EXAMINADORA: Prof<sup>ª</sup>. Juliana Echevarria Lima (Presidente)  
 MSc. Thaís da Silva Rígoni  
 Dr<sup>ª</sup>. Marina Valente Barroso  
 Prof<sup>ª</sup>. Alessandra D'Almeida Filardy (Suplente)


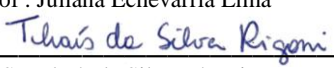
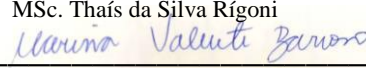
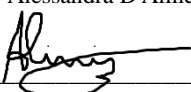

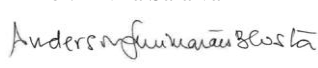
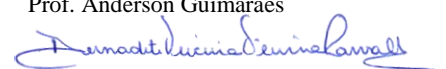
Título da Monografia: **“Papel das Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs) na modulação funcional de macrófagos infectados por Leishmania”**

Local: **Sala de ambiente virtual – Vídeo conferência/ IMPPG / CCS / UFRJ**

**Data e hora de início: 15 de abril de 2020 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,34 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 15 de abril de 2020.

NOTA	Banca Examinadora:
9,0	 <hr/> Prof.ª. Juliana Echevarria Lima
9,5	 <hr/> MSc. Thaís da Silva Rígoni
9,5	 <hr/> Dr.ª. Marina Valente Barroso
	<hr/> Prof.ª. Alessandra D'Almeida Filardy
Aluno:	 <hr/> Andrew Victor Diniz Sardinha
Orientador:	 <hr/> Prof. Elvira Saraiva
Coorientador:	 <hr/> Prof. Anderson Guimarães Costa
Coordenador de TCC	 <hr/> Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

## DEDICATÓRIA

Dedico esta monografia à minha querida avó Cleide Camolesi Diniz (*in memoriam*), cuja presença foi essencial em minha vida. Aqui estão os resultados dos seus esforços. Com muita gratidão.

## **AGRADECIMENTOS:**

Agradeço aos meus pais, Fernanda e José Carlos, que batalharam muito para me oferecer uma educação de qualidade, fazendo do meu sonho a melhor escolha a ser tomada. Aos meus avós, Cleide e José Roberto que se dedicaram a me criar como um filho. À minha tia Fabiana que sempre acreditou no meu potencial e nunca negou uma palavra de incentivo. À minha querida prima Alline, que me deu o mais tenro exemplo de que a vida é muito mais do que o molde do qual fomos colocados. À minha melhor amiga Ana Beatriz que foi compreensiva com os momentos em que permaneci distante e, mesmo assim, deu-me tanto carinho. Às minhas amigas Jarlene e Jullyanna por serem as pessoas mais alegres e gentis dos meus dias aqui. Ao corpo administrativo e técnico da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Aos membros do Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses, que me acolheram e me ajudaram tanto. A todos os professores que contribuíram com a minha trajetória acadêmica, especialmente a Prof<sup>a</sup> Elvira Saraiva e ao Prof<sup>o</sup> Anderson Guimarães, os quais foram responsáveis pela a minha orientação e por momentos felizes que vivi durante o projeto e, por isso, guardo um grande sentimento de amizade. Às agências de fomento CNPq e FAPERJ. Por fim, sou grato a todos aqueles que fizeram da minha breve história pela cidade maravilhosa inesquecível.

Eu cresci com vocês, obrigado!

## RESUMO

ANDREW VICTOR DINIZ SARDINHA

### “PAPEL DAS NETS NA MODULAÇÃO FUNCIONAL DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *LEISHMANIA AMAZONENSIS*”.

Orientador: Elvira Saraiva e Anderson Guimarães

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Neutrófilos são células da imunidade inata essenciais no desenvolvimento de uma resposta imunológica protetora contra *Leishmania*. Além do seu papel na fagocitose deste parasito, os neutrófilos são especializados na liberação de redes extracelulares de DNA, as NETs (do inglês “neutrophil extracellular traps”), que são constituídas por cromatina associada com proteínas de diferentes compartimentos dos neutrófilos, como citoplasma e grânulos. A netose, processo celular que culmina com a liberação das NETs, ocorre logo após a interação dos neutrófilos com o parasito. Estas redes funcionam na contenção e morte dos parasitos. Entretanto, além da sua função microbicida muito bem estabelecida na literatura, já é sabido que as NETs podem modular o tipo de resposta de outras células do sistema imune. Nosso grupo, por exemplo, observou que a interação de monócitos com NETs induzidas por *Leishmania amazonensis* impede a diferenciação destas células em dendríticas, uma célula essencial para a montagem de uma resposta protetora. Na presença das redes, os monócitos diferenciaram-se em macrófagos com um fenótipo anti-inflamatório, favorecendo a infecção. Sendo o macrófago uma célula amplamente distribuída nos tecidos, e tendo um papel fundamental na infecção por *Leishmania*, sustentando a replicação intracelular do parasito, decidimos então elucidar qual seria o papel das NETs na modulação funcional de macrófagos infectados por este parasito. Os neutrófilos humanos foram obtidos do sangue de doadores saudáveis por meio da separação por gradiente de densidade e os neutrófilos murinos foram obtidos através do recrutamento com caseína seguida da lavagem da cavidade peritoneal. O sobrenadante rico em NETs foi produzido através da incubação de neutrófilos e promastigotas de *Leishmania amazonensis*. As NETs foram quantificadas no sobrenadante através da dosagem de DNA. Os macrófagos foram obtidos através da diferenciação da linhagem monocítica humana THP-1 com PMA, da diferenciação de monócitos humanos do sangue periférico humano (MDMs), e através da cultura de células RAW. Estes macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 5:1. Em seguida, os macrófagos infectados foram tratados com diferentes concentrações de NETs e posteriormente lisados para a contagem de amastigotas viáveis na câmara de Neubauer. Em alguns experimentos, as NETs foram pré-tratadas com DNase ou foram aquecidas

para desnaturar suas proteínas. Nas concentrações utilizadas em nosso estudo, as NETs não apresentaram citotoxicidade para nenhum dos três tipos de macrófagos testados (RAW264,7, THP-1 e MDMs). As NETs foram capazes de ativar macrófagos murinos e humanos e de controlar a infecção intracelular por *Leishmania amazonensis*. Os macrófagos da linhagem THP-1 foram mais resistentes à ativação pelas NETs e, nestas células, apenas observamos menor sobrevivência dos parasitos com 500 ng/ml das redes. A ativação dos macrófagos infectados depende da integridade do arcabouço de DNA das NETs, ao menos nas células murinas. Não observamos diferenças na morte dos parasitos quando NETs que tiveram as proteínas desnaturadas foram utilizadas. Mais experimentos serão necessários para determinar os mecanismos pelos quais as NETs ativam os macrófagos infectados.

**Palavras-chave:** macrófagos, *Leishmania amazonensis*, Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs), imunomodulação.



## ABSTRACT

ANDREW VICTOR DINIZ SARDINHA

**“THE ROLE OF NETS IN THE FUNCTIONAL MODULATION OF INFECTED MACROPHAGE BY *LEISHMANIA AMAZONENSIS*”.**

**Orientador: Elvira Saraiva e Anderson Guimarães**

**Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Neutrophils are innate immune cells essential in the development of an immune response against *Leishmania*. In addition to their role in the phagocytosis of this parasite, neutrophils are specialized in the release of extracellular DNA traps, NETs (Neutrophil Extracellular Traps), which are composed of chromatin associated with proteins from different neutrophil compartments, such as cytoplasm and granules. Netosis, a cellular process that culminates in the release of NETs, occurs shortly after the interaction of neutrophils with the parasite. These traps work to contain and kill parasites. However, in addition to its microbicidal function, it is already known that NETs can modulate the type of response of other cells of the immune system. Our group, for example, observed that the interaction of monocytes with NETs induced by *Leishmania amazonensis* prevents the differentiation of these cells into dendritic cells, an essential cell for the assembly of a leishmanicidal response. In the presence of the NETs, monocytes differentiated into macrophages with an anti-inflammatory phenotype, favoring infection. Since macrophage is a cell widely distributed in tissues, and it has a fundamental role in *Leishmania* infection, supporting the intracellular replication of the parasite, we decided to elucidate the role of NETs in the functional modulation of macrophages infected by *Leishmania*. Human neutrophils were obtained from the blood of healthy donors through Ficoll-paque gradient separation and murine neutrophils were obtained from the peritoneal cavity after casein injection. NETs-rich supernatant was obtained by incubating neutrophils and promastigotes from *Leishmania amazonensis*. NETs were quantified in the supernatants by measuring extracellular DNA. Macrophages were obtained by differentiating human monocytic line THP-1 with PMA, by differentiating human monocytes from peripheral blood (MDMs), or by culturing RAW cells. These macrophages were infected with *L. amazonensis* promastigotes in a 5:1 ratio. Then, infected macrophages were treated with different concentrations of NETs and the number of live parasites was counted. In some experiments, NETs were pretreated with DNase or heated to denature NET-associated proteins. At the concentrations used in our study, NETs did not show cytotoxicity for any of the three types of macrophages tested. NETs were able to activate murine and human macrophages and to control intracellular infection by *Leishmania amazonensis*. THP-1 macrophages were more resistant to activation by NETs and, in these cells, we only

observed less survival of the parasites with 500 ng / ml of the NETs. Activation of infected macrophages depended on the integrity of the NETs' DNA scaffold. We did not observe any differences in parasites survive when macrophages were treated with denatured NETs. More experiments are required to determine the mechanisms by which NETs can activate infected macrophages.

**Keywords:** macrophages, *Leishmania amazonensis*, Neutrophil Extracellular Traps (NETs), immunomodulation.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Neutrófilos .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Biologia dos neutrófilos .....	1
1.1.2. Mecanismos efetores dos neutrófilos.....	3
1.1.2.1. Fagocitose .....	3
1.1.2.2. Explosão respiratória ou “burst” oxidativo.....	4
1.1.2.3. Degranulação.....	5
<b>1.2 Redes extracelulares de neutrófilos (NETs).....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Vias de sinalização envolvidas na formação de NETs .....</b>	<b>7</b>
1.3.2. Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....	7
1.3.3. Elastase, Mieloperoxidase (MPO) e Peptidil Arginina Deaminase (PAD4) .....	8
1.3.4. Papel das NETs em doenças infecciosas.....	10
<b>1.4. Leishmanioses.....</b>	<b>11</b>
1.4.1. Epidemiologia, espécies e manifestações clínicas.....	11
1.4.2. Ciclo de vida do parasito.....	12
1.4.3. Papel das NETs na infecção por <i>Leishmania</i> .....	15
<b>1.5. Papel das NETs na modulação da resposta imunológica.....</b>	<b>18</b>
<b>1.6. Macrófagos.....</b>	<b>20</b>
1.6.1 Biologia dos macrófagos.....	20
1.6.2 Macrófagos classicamente ativados.....	22

1.6.3 Macrófagos alternativamente ativados.....	22
1.6.4 Macrófagos e <i>Leishmania</i> .....	23
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>25</b>
3.1. Objetivos específicos.....	25
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
4.1 Comitê de ética.....	25
4.2 Cultivo THP-1.....	26
4.3 Cultivo RAW.....	26
4.4. Cultivo da <i>L.amazonensis</i> .....	26
4.5. Purificação de neutrófilos de sangue humano.....	26
4.6. Recrutamento e obtenção dos neutrófilos peritoneais.....	26
4.7. Diferenciação dos monócitos THP-1 em macrófagos.....	27
4.8. Obtenção de macrófagos humanos.....	27
4.9. Infecção de macrófagos por <i>Leishmania</i> .....	27
4.10. Indução de sobrenadante rico em NETs induzidas por <i>L. amazonensis</i> .....	28
4.11. Quantificação de NETs nos sobrenadantes.....	28
4.12. Ensaio de Citotoxicidade.....	28
4.13. Tratamento de macrófagos infectados com NETs.....	28
4.14. Pré-tratamento das NETs.....	29
4.15. Análise Estatística.....	29
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>38</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>39</b>

# **1. INTRODUÇÃO:**

## **1.1 Neutrófilos**

### **1.1.1 Biologia dos neutrófilos**

Paul Erlich (1854-1915), após observar leucócitos da circulação sanguínea, testando corantes de diferentes propriedades químicas, percebeu que uma determinada população havia afinidade em reter corante de pH neutro e, por isso, a chamou de neutrófilos. Os grânulos, componentes alvos da coloração, não se coram fortemente com corantes básicos e ácidos, como a hematoxilina e a eosina. Os neutrófilos são células fagocíticas com o citoplasma rico em grânulos e, por causa de seu núcleo multilobulado, são chamados também de leucócitos polimorfonucleares (PMNs), nome dado por Elie Metchnikoff (Amulic *et al.*, 2012). Nos humanos, o núcleo dos neutrófilos pode conter 2 a 5 lóbulos, cada um com 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Sabe-se que essa morfologia nuclear confere uma maior flexibilidade a diapedese, podendo então facilitar a migração dessa célula entre as junções endoteliais (Brinkmann e Zychlinsky, 2007)

Os neutrófilos são encontrados em grande abundância no sangue humano. A produção dessas células, em condições normais, chega a ser de 1 a 2 x 10<sup>11</sup> células por dia em um humano adulto, equivalendo a quase dois terços de toda produção de células do sangue pela medula óssea (Borregaard, 2010). Os neutrófilos são formados a partir de mieloblastos, progenitores mieloides comum aos leucócitos (com exceção de linfócitos e células NK), em um processo chamado de mielopoiese. Esse processo é composto por uma série de estágios de maturação que compõe a diferenciação desse tipo celular e culmina com a condensação do núcleo em lóbulos conjuntamente com a granulocitopoiese, processo que dá origem aos granulócitos (Bainton, 1999; Abbas e Lichtman, 2003). Quando maduros, os neutrófilos participam da primeira linha de defesa contra patógenos invasores (Kanthack e Hardy, 1895).

Os neutrófilos possuem em seus grânulos componentes antimicrobianos fundamentais para montar uma resposta imunológica eficaz. Os grânulos primários, também chamados de azurófilos, além de serem os maiores, são os primeiros a serem formados durante a maturação dos neutrófilos. Dentre a composição desses grânulos está a mieloperoxidase (MPO), elastase neutrofílica (NE), catepsina G (CG) e outras proteases, como a proteína de aumento da permeabilidade/bactericida (BPI). A segunda classe de grânulos é formada, posteriormente a classe dos azurófilos, e os grânulos dessa classe são chamados de específicos ou secundários e são os menores dentre os outros grânulos. São caracterizados pela ausência de MPO e pela presença de lactoferrina, mas também contêm vários outros compostos antimicrobianos, como a lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL) e lisozimas. A terceira classe, os terciários, são os últimos grânulos a serem formados pelo complexo de Golgi durante a maturação dos neutrófilos, neles contém metaloproteases, gelatinase e leucolisina (revisado por Amulic *et al.*, 2012).

A classe seguinte de grânulos, chamada de vesículas secretórias, se diferencia das outras classes por sua origem. Essas estruturas não são formadas pelo complexo de Golgi, e sim originadas a partir da endocitose, nos estágios finais da maturação do neutrófilo, e por isso, a sua composição é baseada nas proteínas do plasma (revisado por Amulic *et al.*, 2012). As proteínas presentes nos grânulos são apresentadas na tabela 1.

**Tabela 1. Composição dos grânulos neutrofílicos**

<b>Gene</b>	<b>Proteína</b>	<b>Funções</b>
<b>Grânulos azurófilos (primários)</b>		
AZU1	Azurocidina	Atividade antibacteriana (Gram-negativa); Quimiotaxia específica para monócitos e fibroblastos; liga-se à heparina
DEFA1-3	Defensina neutrofílica	Antibacteriana, fungicida e atividade antiviral
PRTN3 (MBN)	Mieloblastina	Serino protease; facilita a migração neutrofílica transendotelial
CD63 (MLA1)	Antígeno CD63	Receptor de superfície para TIMP1; papel na ativação da cascata celular

CTSG	Catepsina G	Serino protease com tripsina- e Especificidade para quimiotrpicina-like; cliva o complemento C3; tem atividade antibacteriana
ELA2 (ELANE)	Elastase Neutrofílica	Modifica as funções de <i>NK</i> , monócitos e granulócitos; inibe a liberação da enzima neutrofílica dependente de C5a e quimiotaxia
MPO	Mieloperoxidase	Atividade microbicida contra vários microrganismos
BPI	Cap57	Citotoxicidade para Gram-negativa e grande afinidade por LPS
<b>Grânulos específicos (secundário)</b>		
CHI3L1	Proteína 1 semelhante a quitinase 3	Lectina de ligação a carboidratos com preferência por quitina; desempenha papel na inflamação
NGAL (LCN2)	Lipocalina 2	Tráfego de ferro; envolvida em apoptose, imunidade inata e desenvolvimento renal; limita a proliferação bacteriana
LTF (GIG12)	Lactoferrina	Ligação e transporte de ferro; atividade antimicrobiana; estimula sinalização de TLR4, migração de células endoteliais e proliferação; liga heparina
<b>Grânulos gelatinase (terciário)</b>		
MMP9 (CLG4B)	Metaloproteinase de matriz-9	Clivagem de gelatina tipos I e V e colágeno tipos IV e V; desempenham papel na migração de leucócitos e na reabsorção osteoclástica óssea
FCN1 (FCNM)	Ficolina-1	Receptor de reconhecimento de padrões na imunidade inata
CAMP	Peptídeo antimicrobiano da catelicidina	Atividade antibacteriana através de LPS de ligação; clivada em 2 peptídeos antimicrobianos FALL-39 e LL-37
MMP8	Colagenase neutrofílica	Degrada fibras de colágeno do tipo I, II e III

(Adaptado de Cassatella *et al.*, 2019)

## 1.1.2. Mecanismos efetores dos neutrófilos

### 1.1.2.1. Fagocitose

Em condições normais de homeostase, neutrófilos e monócitos circulam livremente pela corrente sanguínea (Abbas e Lichtman, 2003). Entretanto, quando há uma perturbação desta homeostase, como, por exemplo, a presença de um patógeno invasor, os neutrófilos são atraídos através de quimiocinas e quimioatraentes (IL-8, CXCL7, CXCL1, leucotrieno

B4, fator C5a do complemento) para o sítio da infecção, onde desempenham mecanismos essenciais na defesa contra os mais diversos microrganismos, como bactérias, fungos e protozoários (Mócsai, 2013). Dentre eles, descrito por Elie Metchnikoff, está a fagocitose, um processo de ingestão e digestão de partículas, sejam inócuas ou nocivas, que é dependente de uma série de receptores de superfície celular capazes de reconhecer estas partículas, como os PRRs (Receptores de Reconhecimento de Padrões) que, quando reconhecem PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) promovem uma cascata de sinalização que culmina com projeções da membrana plasmática, promovendo assim o englobamento da partícula. Em neutrófilos, este processo é realizado de forma distinta da que é descrita em macrófagos. O fagossoma formado não sofre maturação e sim fusão com os grânulos citoplasmáticos com propriedades antimicrobianas, que acontece concomitante ao acoplamento da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase à membrana do patógeno, gerando uma grande produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), moléculas instáveis compostas pela forma reduzida do oxigênio a qual é muito reativa e efetiva contra microrganismos (revisado por Amulic *et al.*, 2012).

#### **1.1.2.2. Explosão respiratória ou “burst” oxidativo**

A NADPH oxidase gera ROS transferindo elétrons de moléculas redutoras e seus intermediários como  $\text{FADH}_2$ ,  $\text{NADH} + \text{H}^+$  e NADPH para  $\text{O}_2$ , resultando na formação do superóxido, que é convertido em peróxido de hidrogênio. Essa enzima realiza este processo quando estimulada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos, como também por citocinas pró-inflamatórias.

A mieloperoxidase (MPO) pode converter o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em hipoclorito ou em espécies nitrogenadas, como cloreto de nitrila ( $\text{NO}_2\text{Cl}$ ) e dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ). É importante salientar que essas espécies nitrogenadas são altamente tóxicas, pois promovem a oxidação de uma série de componentes celulares, tais como os lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos de microrganismos (Abbas e Lichtman, 2003). Há também a ação da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) que produz óxido nítrico, um gás



tóxico, a partir de arginina. Esse gás, uma vez associado ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dá origem aos radicais de peroxinitrito, que são moléculas altamente reativas e microbicidas (Abbas e Lichtman, 2003; Kleinert *et al.*, 2004).

### **1.1.2.3. Degranulação**

Os grânulos, já citados anteriormente, são indispensáveis na inflamação, e fazem parte de uma estratégia de defesa dos neutrófilos, também descrita por Elie Metchnikoff. Nela, há três classes de fatores antimicrobianos que são liberados no meio extracelular: (i) os peptídeos catiônicos que agem permeabilizando a membrana do microrganismo e inibindo a síntese de membrana, do RNA e DNA microbiano; (ii) as enzimas proteolíticas, que degradam a parede celular e a membrana microbiana, como também clivam fatores de virulência e (iii) proteínas quelantes de metais necessários para o crescimento de alguns microrganismos (revisado por Amulic *et al.*, 2012). Nessas três classes de grânulos há uma hierarquização na ordem para a exocitose. Assim, as vesículas secretórias, têm a maior propensão em serem liberadas para o meio extracelular, seguidas pelos grânulos contendo gelatinase, específicos e azurófilos (Sengelov *et al.*, 1993).

## **1.2. Redes extracelulares de neutrófilos (NETs)**

Em 2004, uma nova estratégia antimicrobiana foi descrita em neutrófilos, na qual após ativação por bactérias Gram-positivas ou negativas, interleucina(IL)-8 ou acetato de forbol de miristato (PMA), os neutrófilos liberaram para o meio extracelular uma estrutura em forma de rede composta por DNA, histonas e proteínas (Brinkmann *et al.*, 2004). Essas estruturas receberam o nome de redes extracelulares de neutrófilos (NETs e/ou do inglês *neutrophil extracellular traps*) e possuem a capacidade de conter e matar microrganismos. Urban e colaboradores (2009) identificaram que proteínas do núcleo, grânulos e, inclusive, algumas citoplasmáticas podem decorar as NETs (Tabela 2). Contudo, diversos estudos vêm relacionando a composição das NETs com o tipo de estímulo usado durante a indução, podendo variar nos teores relativos de histonas 3, lactoferrina, elastase e dsDNA (Braian, Hoge & Stendahl, 2013; Khandpur *et al.*, 2013). A importância do DNA para a

sustentação e integridade da estrutura pode ser comprovada com o uso de DNAses, que, em contato com as NETs, as clivam e desintegram. Entretanto, quando o tratamento é feito com proteases, a estrutura se mantém intacta (Brinkman-n *et al.*, 2004).

Inicialmente, o processo de formação das NETs foi definido como sendo um novo tipo de morte celular programada, chamada de netose. Nesta, não há participação das caspases e não ocorre fragmentação do DNA ou exposição de fosfatidilserina na camada externa da membrana celular, sendo, portanto, diferente de apoptose e da necrose (Fuchs *et al.*, 2007). A liberação das redes extracelulares se inicia com a perda da morfologia multilobulada do núcleo que acaba adquirindo uma forma arredondada. O processo segue com a descompactação do DNA, desorganização das membranas dos grânulos e do núcleo, culminando na liberação da cromatina no citoplasma, onde esta se associa com algumas proteínas citoplasmáticas, que posteriormente é liberada no espaço extracelular (Fuchs *et al.*, 2007). Entretanto, já foi descrito que os neutrófilos podem permanecer viáveis mesmo após a liberação de NETs. Pilszczek e colaboradores (2010) descreveram que neutrófilos sobreviviam por algum tempo entre 5-60 minutos, após a liberação das NETs e podiam continuar realizando funções como fagocitose e quimiotaxia. Esse processo foi chamado de netose vital ou rápida.

**Tabela 2. Proteínas identificadas nas NETs**

<b>Localização celular</b>	<b>Nome da proteína</b>
<b>Grânulos</b>	Elastase neutrofílica Lactotransferrina Azurocidina Catepsina G Mieloperoxidase Proteinase 3 Lisozima C Defensinas 1 e 3
<b>Núcleo</b>	Histonas H2A, H2B, H3, H4 Antígeno de diferenciação nuclear de célula mieloide (MND A)
<b>Citoplasma</b>	Proteínas S100 de união a cálcio A8, A9, A12

	Actina (beta e/ou gamma)
	Miosina-9
	Alfa actinina (1 e/ou 4)
	Plastina-2
	Citoqueratina-10
<b>Peroxisoma</b>	Catalase
<b>Enzimas glicolíticas</b>	Alfa enolase
	Transquetolase

(Adaptado de Urban *et al.*, 2009)

A liberação de redes extracelulares não é um mecanismo exclusivo de neutrófilos e já foi observada em outros tipos de leucócitos, como os macrófagos, mastócitos, eosinófilos, basófilos e mais recentemente linfócitos (Webster *et al.*, 2010; Von Kockritz-Blickwede *et al.*, 2008; Yousefi *et al.*, 2008, Scorn *et al.*, 2012; Rocha-Arrieta *et al.*, 2017). Em todas as células, estas estruturas são chamadas de redes extracelulares (ETs) e o processo que dá origem a elas de etose (Wartha e Henriques-Normark, 2008). Esse fenômeno é bem conservado e também foi descrito em amebas (Zhang *et al.*, 2016), insetos (Nascimento *et al.*, 2018), peixes (Palic *et al.*, 2007), aves (Chummitri *et al.*, 2009) e plantas (Wen *et al.*, 2009).

A indução das NETs pode ser feita por diversos estímulos, sejam eles provenientes do contexto de uma inflamação estéril ou de uma infecção. Desse modo, citocinas como IL-8 e compostos sintéticos como o PMA, diferentes microrganismos, bem como moléculas deles oriundas, como o lipopolissacarídeo (LPS), são capazes de induzir a netose (Wartha e Henriques-Normark, 2008; Papayannopulos e Zychlinsky, 2009; Remijnsen, 2011).

### **1.3. Vias de sinalização envolvidas na formação de NETs**

#### **1.3.1. Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)**

Diversos são os mecanismos moleculares envolvidos na formação de NETs, e alguns deles foram elucidados nos últimos 10 anos, dentre eles, a participação da enzima

NADPH oxidase tem sido evidenciada. Assim, a interação de neutrófilos com agentes que ativam a NADPH oxidase induz a liberação de NETs. Por outro lado, quando neutrófilos são previamente incubados, com inibidores da NADPH não há a liberação das redes. Neutrófilos de pacientes que possuem a doença granulomatosa crônica (CGD) não conseguem produzir NETs quando estimulados com PMA e outros estímulos. Pacientes com CGD possuem mutações em subunidades da NADPH oxidase e, assim, suas células não produzem ROS via esta enzima, comprovando que as espécies reativas de oxigênio são de fato essenciais para a produção das NETs para grande parte dos estímulos (Fuchs *et al.*, 2007; Remijnsen *et al.*, 2011).

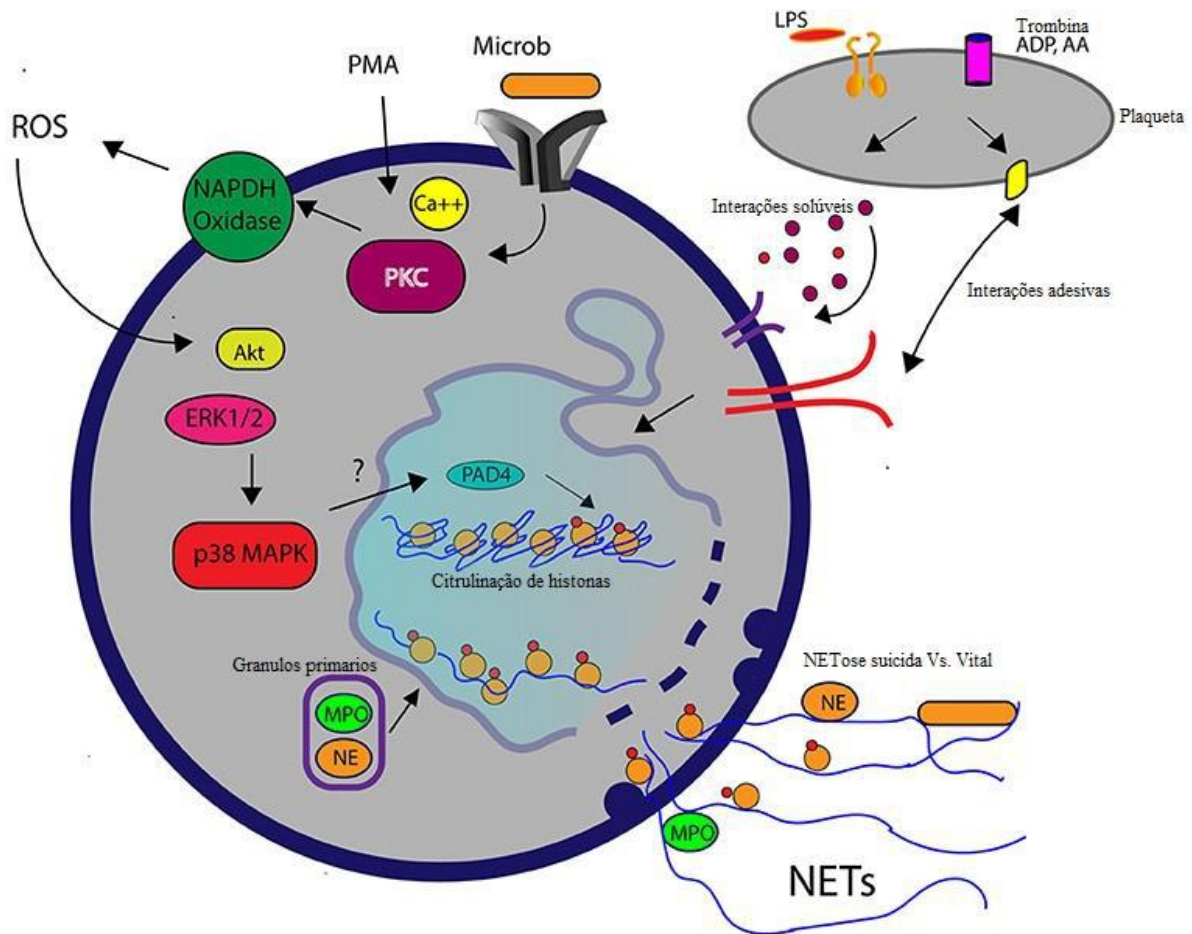
Contudo, alguns estímulos são capazes de induzir a liberação de NETs de forma independente da ativação da NADPH oxidase e, conseqüentemente, independente da produção de ROS. Pilszczek e colaboradores (2010) demonstraram que este novo mecanismo ocorre de forma rápida, em aproximadamente 10 minutos, em resposta a *Staphylococcus aureus* e os neutrófilos liberam vesículas provenientes do envoltório nuclear contendo DNA, que se fundem com a membrana plasmática, liberando as NETs no meio extracelular. Este tipo de netose é caracterizado pela viabilidade do neutrófilo ao final do processo, mas nem sempre isso acontece. Essas NETs também podem aprisionar e/ou matar as bactérias.

### **1.3.2. Elastase, Mieloperoxidase (MPO) e Peptidil Arginina Deaminase (PAD4)**

Durante o processo de indução da liberação de redes extracelulares, há a descompactação do DNA, levando a perda do núcleo multilobulado. Essa mudança na estrutura é resultado da ativação da enzima peptidil arginina deaminase (PAD4) que causa a citrulinização de resíduos de arginina de carga positiva em citrulina, um aminoácido polar de carga neutra (Figura 1). Quando se inibe especificamente a PAD4, os neutrófilos não produzem NETs e neutrófilos de animais nocautes para PAD4 não liberam NETs (Wang *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010). Entretanto, isso ainda é uma questão controversa, uma vez que a resposta de cada célula varia de acordo com o estímulo e as condições experimentais propostas. A arginina é um aminoácido que faz parte da cauda das histonas e a mudança de

carga deste aminoácido para uma carga neutra resulta em um afrouxamento da heterocromatina levando a uma descompactação e perda da morfologia do núcleo (Wang *et al.*, 2009).

Em 2010, Papayannopoulos e colaboradores descreveram que, durante os primeiros 30 minutos depois do estímulo que induz a liberação de NETs, a elastase presente nos grânulos primários migra para o núcleo, se associa à cromatina e degrada as histonas, principalmente a histona H4. Em ação conjunta, a mieloperoxidase migra para o núcleo e promove a descondensação do DNA, amplificando o efeito da elastase. Entretanto, essa ação da MPO independe da sua atividade enzimática (Papayannopoulos *et al.*, 2010). Estudos mostram que pacientes deficientes para MPO possuem neutrófilos incapazes de liberar NETs quando desafiados com indutores diversos, como *Candida albicans* e PMA (Metzler *et al.*, 2011). O uso de inibidores específicos para elastase em neutrófilos humanos também resultou na inibição da formação de NETs (Papayannopoulos *et al.*, 2010). Ainda, foi observado que neutrófilos de camundongos nocautes para NE não produzem NETs durante a infecção por *Klebsiella pneumoniae* (Papayannopoulos *et al.*, 2010)



**Figura 1. Vias moleculares envolvidas na formação de NETs:** A elevação do cálcio intracelular na presença de PMA ou interação microbiana com receptores de reconhecimento de patógenos em neutrófilos ativa a proteína cinase C (PKC) e a NADPH oxidase. Espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas pela NADPH oxidase levam à sinalização mediada por Akt, cinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2) e proteína cinase ativada por mitógeno p38 (MAPK). A descondensação da cromatina requer translocação de mieloperoxidase e elastase de neutrófilos para o núcleo e a citrulinação de histonas (citH3), orquestrada pela enzima peptidilarginina deiminase 4 (PAD4) (Adaptado de Li e Tablin, 2018).

### 1.3.3 Papel das NETs em doenças infecciosas

Diversos trabalhos relatam o papel das NETs em infecções e outras doenças. Em humanos, foi observado que as NETs estão presentes em grande abundância em pessoas que desenvolvem apendicite espontânea (Brinkmann *et al.*, 2004), como também podem estar presentes no sangue de crianças infectadas por *Plasmodium falciparum* (Baker *et al.*,

2008), assim como nas lesões de pacientes com leishmaniose cutânea (Guimarães-Costa *et al.*, 2009; Morgado *et al.*, 2015), entre outros. Estudos *in vitro* também descrevem um papel fundamental das NETs no aprisionamento e morte de patógenos. Abi Abdallah e colaboradores, em 2011, demonstraram a indução de NETs em neutrófilos humanos estimulados com *Toxoplasma gondii* e que este mecanismo foi essencial para o aprisionamento e morte do parasita. O HIV-1 (Vírus da imunodeficiência humana), também induz a formação de NETs, que aprisionam as partículas virais, via os receptores do tipo Toll 7 e Toll (TLR7 e TLR8), com produção de ROS (Saitoh *et al.*, 2012). Muitos estudos sugerem que a interação das NETs com esses microrganismos é por via de interações eletrostáticas entre componentes catiônicos da NET com a membrana negativamente carregada dos microrganismos, propondo que as NETs poderiam se associar a qualquer superfície eletronegativamente carregada. Entretanto, não é descartada a possibilidade de haver um reconhecimento específico, já que o perfil de moléculas de fungos, bactérias e parasitos são diferentes (Brinkmann *et al.*, 2004; Medina, 2009). Todavia, também se acredita que peptídeos antimicrobianos presentes nas NETs, como as defensinas, poderiam ser os responsáveis por parte dessas interações ao se ligar às porções glicosídicas da superfície de microrganismos (Zasloff, 2002; Campos *et al.*, 2004).

## **1.4. Leishmanioses**

### **1.4.1. Epidemiologia, espécies e manifestações clínicas.**

O gênero *Leishmania* abriga as espécies que são capazes de causar a leishmaniose, uma doença caracterizada por vários quadros clínicos, como lesões na pele, na mucosa ou nos órgãos internos (lesões viscerais). É estimado que esta doença cause cerca de 50 a 90 mil novos casos em todo mundo, gerando um índice considerável de morbidade e mortalidade (WHO, 2017).

A leishmaniose cutânea é caracterizada pelo aparecimento de lesões no local da picada do flebótomo fêmea, que podem ser únicas ou múltiplas, ulceradas ou não, e são causadas por *Leishmania major* e *Leishmania tropica* no Velho Mundo (Nozais, 2003) e

por espécies neotropicais como *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *L. venezuelensis*, *Leishmania viannia braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, entre outras no Novo Mundo (Bermann, 1997).

A leishmaniose visceral é responsável pela maioria dos óbitos relacionados a infecção por esse parasito. Ela é causada pela espécie *L. infatum* e *L. donovani*, esta última no Velho mundo. A *Leishmania infantum* tem uma maior prevalência no Sudão, Índia, Nepal, Brasil e países mediterrâneos (OMS, 2018), onde causa a leishmaniose visceral (Ozcel *et al.*, 1999; Tanir, Taylan e Dag, 2006). Normalmente, acomete o fígado, baço e linfonodos. A manifestação do quadro clínico é caracterizada pela disseminação pelo sistema vascular, linfático e retículoendotelial, resultando em uma infiltração na medula óssea, hepatoesplenomegalia e linfadenopatia. (Herwaldt, 1999; Chappuis *et al.*, 2007; Burza *et al.*, 2018).

A *Leishmania amazonensis* é uma das espécies causadoras da leishmaniose tegumentar nas Américas, com um índice significativo de casos que evoluem para o quadro de leishmaniose cutânea difusa anérgica grave (Lainson *et al.*, 1987).

A sobrevivência desses parasitos depende da transmissão de um inseto vetor para um mamífero (Pace, 2014). As espécies de *Leishmania* podem ser transmitidas por 2 gêneros do inseto vetor: o gênero *Phlebotomus sp.*, o qual predomina nas regiões da África, Ásia e Europa e o gênero *Lutzomyia sp.*, predominante nas Américas Central e do Sul (Bates, 2008). O ciclo biológico da *Leishmania* se estende a outros mamíferos silvestres, como pequenos roedores, marsupiais e primatas (Grimaldi *et al.*, 1991).

#### **1.4.2. Ciclo de vida do parasito**

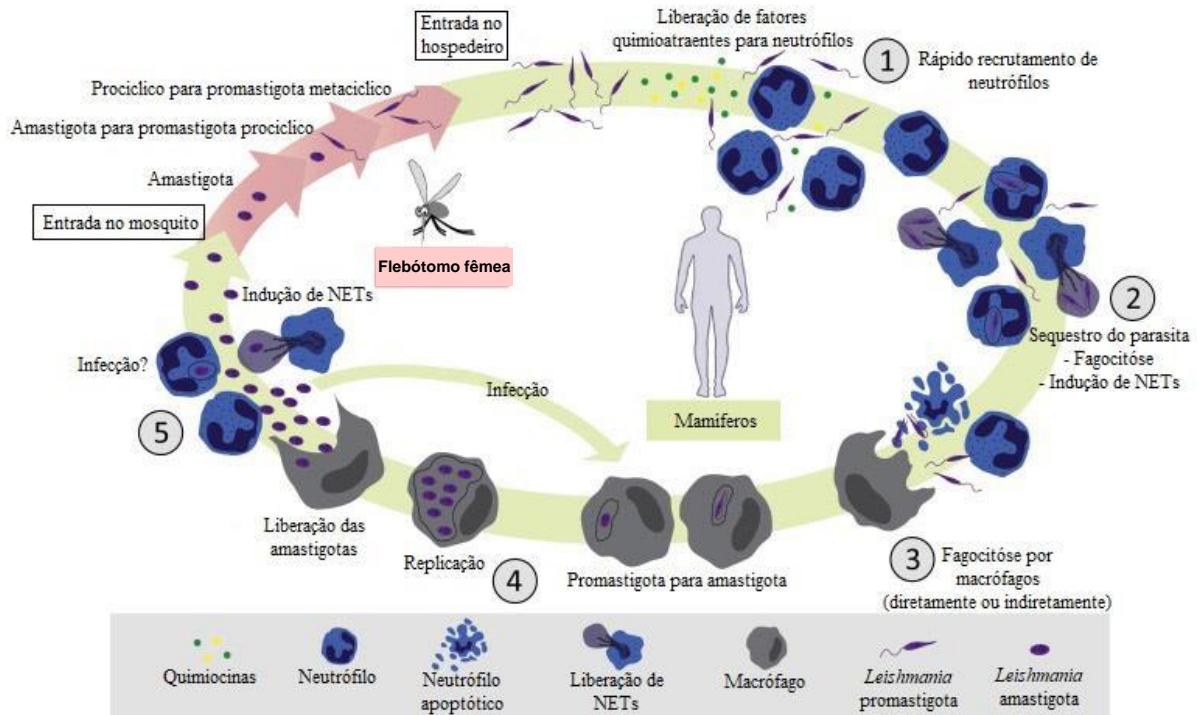
Durante o ciclo de vida, o parasito se apresenta sob duas formas: promastigota e amastigota. No flebótomo infectado, é encontrada a forma promastigota do parasito, caracterizada por sua forma flagelada e seu corpo celular alongado. O promastigota passa por diversos estágios durante o seu desenvolvimento, a metaciclogênese, dentro do



intestino do inseto, onde a forma promastigota procíclica, caracterizada por possuir alta capacidade replicativa se diferencia em promastigota metacíclica, migrando através do intestino em direção a probóscide deste inseto. Esse processo tem um papel fundamental na sobrevivência do parasito no organismo do hospedeiro vertebrado. Há uma alta expressão de moléculas de superfície e de síntese de organelas como os acidocalcisomos que conferem uma resistência a várias formas de estresse, como mudanças no pH e pressão osmótica, que os parasitas sofrem durante sua interação com a célula hospedeira (Rao & Kornberg, 1996; Kornberg *et al.*, 1999; Ruiz *et al.*, 2001; Besteiro *et al.*, 2007).

Dá-se início a infecção por *Leishmania* no hospedeiro vertebrado quando o inseto vetor, durante o repasto sanguíneo das fêmeas, inocula as formas promastigotas metacíclicas em uma poça de sangue formada pela laceração de vasos na derme do hospedeiro (Saraiva *et al.*, 1995). Sabe-se que o inseto inocula junto com o parasito, sua própria saliva, microbiota do intestino, um gel secretório rico em glicoproteínas e exossomas liberados pelo parasito ainda durante seu desenvolvimento dentro do intestino de inseto (Titus e Ribeiro, 1988, Atayde *et al.*, 2015, Dey *et al.*, 2018). Assim, o inoculo é bem complexo, e todos esses componentes já foram demonstrados como sendo fundamentais para o estabelecimento da infecção. A saliva, por exemplo, contém moléculas com atividades anti-hemostáticas e vasodilatadoras, que também modulam o sistema imunológico (Valenzuela *et al.*, 2004), como também aumentam a infectividade do parasito (Titus e Ribeiro, 1988). Nesse evento, os parasitos resistem à ação das proteínas do sistema complemento e, rapidamente, causam uma reação inflamatória com o recrutamento de neutrófilos. Essas células quando entram em contato com a *Leishmania* são efetivamente ativadas, fagocitam o parasito, podendo matá-los (Laskay, vanZandbergen e Solbach, 2003; Reithinger *et al.*, 2007). Alguns grupos relatam eventos divergentes. Por exemplo, Hurrell e colaboradores (2017), com o uso *Leishmania mexicana* demonstraram, por microscopia intravital, que promastigotas inoculados em camundongos são eficientemente internalizados por neutrófilos, sendo reportados até 6 parasitos por vacúolo. Curiosamente, nos ensaios *in vitro*, o grupo relatou que esse processo é silencioso e com níveis não detectáveis de ROS, levando a um baixo impacto na ativação e apoptose destes neutrófilos infectados, suportando a replicação do parasito. Tanto macrófagos quanto neutrófilos

possuem os mesmos receptores para diferentes quimiocinas, dentre eles o CXCR1, CXCR2, CCR2 etc. Consequentemente, esses dois tipos celulares são recrutados de forma sinérgica para o local da infecção (Silva, 2010). Entretanto, quando os mecanismos microbicidas falham, os parasitos resistem dentro de fagolisossomos, retardando a apoptose dos neutrófilos até que macrófagos, células hospedeiras da *Leishmania*, cheguem ao local da inflamação e fagocitem estes neutrófilos apoptóticos ou também podem fagocitar o parasito diretamente, terminando por fim infectados (Laskay, vanZandbergen e Solbach, 2003; Aga *et al.*, 2002). No interior dos macrófagos, os promastigotas se diferenciam em amastigotas que são resistentes às enzimas e ao pH ácido dos vacúolos dos macrófagos, onde sobrevivem e se multiplicam, podendo romper a membrana desta célula e infectar outros macrófagos, mantendo a infecção. O ciclo fecha quando um flebotomíneo ao se alimentar em uma pessoa infectada com *Leishmania* ingere macrófagos infectados com amastigotas, que no intestino do vetor se transformarão em promastigotas (Bates, 2007) (Figura 2).



Trends in Parasitology

**Figura 2.** Ciclo de vida da *Leishmania*: (1) As fêmeas de flebotomíneos transmitem promastigotas metacíclicas para hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo. A presença do parasita e o dano vascular leva à liberação de fatores quimiotáticos derivados do hospedeiro, do próprio parasita e/ou do inseto. Os neutrófilos são recrutados rapidamente e transitoriamente para o local da infecção. (2) Os parasitas são fagocitados pelos neutrófilos e/ou induzem a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Promastigotas de *Leishmania* entram diretamente ou indiretamente nos macrófagos (3), suas células hospedeiras finais. Dentro dos macrófagos, promastigotas se transformam em amastigotas e se replicam por divisão simples (4). Dias ou semanas após a infecção inicial, uma segunda onda de neutrófilos é recrutada para o local da infecção, onde sua presença pode ser observada em lesões inflamatórias crônicas. Amastigotas são liberadas de macrófagos rompidos. Elas serão recapturadas por macrófagos e/ou possivelmente por neutrófilos (5). Esse último ponto precisa ser mais investigado. Além disso, os amastigotas da lesão podem induzir a formação de NET. Em um repasto sanguíneo, fêmeas não infectadas sugam amastigota, que se transformam em promastigotas em seu intestino médio e, através da metaciclologênese, o parasito se diferencia em promastigota metacíclica. Os metacíclicos serão então transmitidos para outros hospedeiros. (Adaptado de Hurrel, Regli e Tacchini-Cottier, 2016).

### 1.4.3 Papel das NETs na infecção por *Leishmania*

Em 2009, Guimarães-Costa e colaboradores demonstraram que parasitos de diferentes espécies de *Leishmania* induzem a produção das NETs e interagem com estas estruturas. Demonstraram ainda que parasitos associados às NETs apresentavam uma morfologia fina, achatada e com protuberâncias, indicando alto dano celular, que foi

confirmado com corantes específicos que evidenciaram a morte dos parasitos. Adicionalmente, descreveram que a morte dos promastigotas mediada pelas NETs se dava, principalmente, pela toxicidade das histonas. Em 2011, Wang e colaboradores confirmaram esses dados e demonstraram que as histonas H2A e H2B contidas nas NETs teriam um papel microbicida para fungos, bactéria extracelulares e promastigotas de outras espécies de *Leishmania*. O grupo utilizou para os seus ensaios várias espécies de *Leishmania* na forma promastigota, como a *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. major* e *L. mexicana*. As histonas humanas mataram diretamente essas espécies de maneira eficaz por rompimento da membrana do parasito (Wang *et al.*, 2011).

Rochael e colaboradores (2015) demonstraram que promastigotas de *Leishmania amazonensis* induzem netose clássica, dependente da geração de ROS, e com a participação de elastase e PAD4. Entretanto, o grupo relatou que a *Leishmania* também induz a liberação precoce e rápida das NETs, ocorrendo em apenas 10 minutos após a interação do neutrófilo com o parasito. Chamada de netose vital, este processo foi dependente da atividade da elastase, mas independente da geração de ROS e de PAD4. Complementarmente, a sinalização que leva à netose induzida por *Leishmania amazonensis* foi descrita por DeSouza-Vieira e colaboradores (2016). Usando promastigotas, o grupo relatou que a ativação de ERK a jusante de PI3K $\gamma$  é importante para desencadear a netose dependente de ROS, e que, quando se inibia a proteína cinase C, a produção de NETs era reduzida, mostrando a importância desta proteína na sinalização. Adicionalmente, o grupo observou que a mobilização do cálcio intracelular dos neutrófilos, um componente regulado pela PI3K $\delta$ , representa uma via de netose alternativa independente de ROS quando estimulada por *L. amazonensis*.

Gabriel e colaboradores (2010) demonstraram que promastigotas de *L. donovani* induzem a produção de NETs independente de ROS em neutrófilos humanos. Adicionalmente, usando promastigotas de *L. donovani* nocautes para lipofosfoglicano (LPG) e GP63 (uma metaloprotease de superfície do promastigota), ambas implicadas no estabelecimento da infecção em hospedeiros mamíferos, viram que a ausência destas moléculas não impediu a indução de NETs. As formas promastigotas sintetizam

glicoconjugados como o lipofosfoglicano (LPG) e o externalizam em toda superfície de sua membrana, sendo assim a primeira molécula a entrar em contato com a célula hospedeira (Turco e Descoteaux, 1992). Esse LPG de *L. donovani* parece conferir resistência à morte pelas NETs. Isso ocorre porque, enquanto os parasitos do tipo selvagem mantêm a viabilidade na presença de NETs, os parasitos nocautes para LPG têm sua viabilidade diminuída sob as mesmas condições. Embora esses resultados sugiram que as NETs têm efeito leishmanicida limitado contra promastigotas selvagens de *L. donovani*, estas estruturas podem, no caso dessa espécie do parasito interferir na sua capacidade de penetrar nas células hospedeiras (Gabriel *et al.*, 2010). Assim, enquanto esses dois estudos descrevem claramente a formação de NET em resposta a infecção por *Leishmania*, eles diferem em alguns pontos. Na espécie *L. amazonensis* (Guimarães-Costa *et al.*, 2009) o LPG induz a liberação de NETs e os promastigotas que expressam LPG são mortos pelas NETs. Entretanto, em *L. donovani* as NETs são induzidas independentemente do LPG e, de fato, sua expressão torna os parasitos resistentes à morte mediada pelas NETs. Essas diferenças podem ser devidas a grande diversidade na composição de LPG entre as diferentes espécies do parasito (Gabriel *et al.*, 2010). Adicionalmente, nosso grupo demonstrou que a expressão da enzima 3'-nucleotidase/nuclease por promastigotas de *Leishmania infantum*, digere as NETs participando assim do mecanismo de evasão da morte mediada pelas NETs, (Guimarães-Costa *et al.*, 2014).

Interessante notar que a saliva do inseto vetor pode conferir um mecanismo de evasão à morte de *Leishmania* pelas NETs. A descrição da endonuclease Lundep, presente na saliva do flebotomíneo, aumenta a sobrevivência do parasito destruindo o arcabouço de DNA das NETs (Chagas *et al.*, 2014). Também foi demonstrado que a co-injeção de Lundep recombinante com promastigotas metacíclicos exacerba significativamente a infecção em camundongos quando comparados com os tratados apenas com PBS. Adicionalmente, o grupo observou que a hidrólise da estrutura de DNA das NETs no local da picada também pode reduzir a inflamação local e impedir a coagulação do sangue, facilitando o repasto sanguíneo do inseto vetor (Chagas *et al.*, 2014).

## 1.5. Papel das NETs na modulação da resposta imunológica

Embora capturar e matar patógenos seja uma das características principais das NETs (Brinkmann *et al.*, 2004), estudos descrevem que elas também podem induzir e/ou exacerbar uma resposta autoimune como, por exemplo, em lúpus eritematoso sistêmico (Hakkim *et al.*, 2010; Leffler *et al.*, 2012), como também pode intensificar a inflamação e dano tecidual. Estudos mostram que as NETs estão presentes nas vias aéreas de indivíduos com asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e o seu acúmulo foi associado à ativação de respostas imunes inatas, contribuindo para a cronificação da doença (Wright *et al.*, 2016).

A produção das NETs é um processo ativo e precisa ser regulado para evitar danos ao organismo. Foi demonstrado que a remoção das NETs por macrófagos é um processo silencioso (Farrera e Fadeel, 2013). A DNase I, presente no soro de pessoas saudáveis, não é suficiente para remover as NETs *in vitro*, gerando a hipótese de que algum outro mecanismo deveria existir para ajudar no processo de remoção das redes, assim, o grupo demonstrou que macrófagos derivados de monócitos endocitam as NETs de maneira dependente de actina. O tratamento dos macrófagos com citocalasina D (inibidor da polimerização de actina) impede a endocitose das redes. Embora a DNase I não seja um mecanismo suficiente, o tratamento das NETs com esta enzima facilitou a endocitose pelos macrófagos das estruturas geradas pela ação da DNase. Outro processo que ajuda na endocitose das NETs é o sistema complemento. Assim, a proteína C1q, produzida tanto por recombinação quanto isolada de soro humano, opsoniza as NETs, facilitando sua remoção pelos macrófagos. Após a internalização, as redes parecem ser degradadas nos lisossomas. Curiosamente, o tratamento dos macrófagos com as NETs não resultou na produção de citocinas pró-inflamatórias (Farrera e Fadeel, 2013).

Contrastando com os dados apresentados anteriormente, diversos estudos vêm demonstrando o papel das NETs em modular respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em outras células do sistema imunológico. NETs induzidas por *Mycobacterium tuberculosis* interagem e ativam macrófagos, induzindo uma série de

citocinas pró-inflamatórias. Macrófagos tratados com NETs produziram maiores quantidades de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10. Esse fenômeno é único para NETs produzidas a partir da ativação por *Mycobacterium tuberculosis*, já que NETs de neutrófilos ativadas por PMA não ativam a mesma resposta em macrófagos. A proteína chaperona Hsp72, foi evidenciada como responsável por tal ativação. A diferença entre os dois tipos de NETs é que a Hsp72 não está presente nas NETs induzidas por PMA, ao passo que está presente nas redes induzidas por *Mycobacterium tuberculosis*. A adição externa de Hsp72 às NETs induzidas por PMA acarreta no mesmo perfil de resposta nos macrófagos (Braian, Hoge & Stendahl, 2013). Também já foi demonstrado que NETs induzidas por cristais de colesterol podem primar monócitos para a produção de IL-6 e IL-1 $\beta$  (Warnatsch *et al.*, 2015). Entretanto, as NETs induzidas por LPS podem inibir a ativação de células dendríticas, polarizando a resposta imunológica para um perfil mais Th2 (Barrientos *et al.*, 2014).

A diferenciação de monócitos está diretamente ligada ao contexto do seu microambiente, podendo se diferenciar em células dendríticas ou macrófagos. Na infecção por *L. major*, os monócitos se diferenciam em células dendríticas no microambiente do sítio inflamatório, onde houve a inoculação do parasito (Leon, Lopes-bravo e Ardavin, 2007). Células dendríticas diferenciadas na derme produzem grandes quantidades de IL-12, uma citocina responsável por estimular uma resposta específica de linfócitos T. Em conjunto, as células dendríticas diferenciadas na infecção por *Leishmania*, produzem grandes quantidades de óxido nítrico, um fator oxidante muito eficiente na indução de morte do parasito (De Trez, 2009). Entretanto, já foi visto que a infecção por *Leishmania amazonensis* prejudica a diferenciação de monócitos humanos em células dendríticas, atrapalhando a indução de uma resposta TH1 adequada (Favali, 2007).

Macrófagos são amplamente distribuídos nos tecidos e fundamentais na imunovigilância. Essas células desempenham um papel essencial na imunidade protetora contra patógenos, assim como atuam no desenvolvimento de tecidos, na homeostase e, também, nas funções de reparo e dano tecidual graças a sua ativação que, dependendo do estímulo e contexto, pode resultar em fenótipos e funções dicotômicas, M1 e M2 (Song *et al.*, 2019), podendo modular a resolução de uma infecção ou inflamação. Guimarães-Costa

e colaboradores (2017) demonstraram que NETs prejudicam a diferenciação de monócitos em células dendríticas, diminuindo a expressão do receptor de IL-4 em monócitos devido a atividade da elastase. Além disso, pela alta expressão de citocinas anti-inflamatórias e marcadores de superfície, o grupo concluiu que as NETs induzem a diferenciação de monócitos para perfil macrófagos M2, um fenótipo menos eficiente na resolução de uma infecção por *Leishmania*.

## **1.6. Macrófagos**

### **1.6.1 Biologia dos macrófagos**

Macrófagos são células fagocíticas mononucleares, geradas a partir de células tronco hematopoiéticas da medula óssea, que se diferenciam em unidades formadoras de colônia (CFU). Dependendo do estímulo, as CFU se diferenciam em quatro tipos de linhagem de células sanguíneas: mielóide, linfóide, megacariocítica e eritróide. Células maduras da medula óssea produzem citocinas que estimulam a diferenciação das CFU, como por exemplo, CSF (fator estimulante de colônia), GM-CSF (Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos) e as interleucinas IL1, IL3, IL4, IL5 e IL6 que originam as células precursoras mielóides, CFU-GM (Unidades formadoras de colônia de granulócitos e macrófagos) e posteriormente a CFU-M (Unidade formadora de colônia de macrófagos), que originam os monócitos que são precursores dos macrófagos (Kleinerman, et al., 1988; Schonlau et al, 2003).

Cerca de 10% das células brancas do sangue de um indivíduo adulto são compostos por monócitos, sendo a maior entre elas, com um diâmetro de 12-15  $\mu\text{m}$ , tendo um núcleo grande e central. Historicamente, monócitos eram considerados apenas como os precursores circulantes dos macrófagos terminalmente diferenciados nos tecidos. Atualmente, embora os monócitos se diferenciem em macrófagos, é reconhecido que a maioria dos macrófagos residentes, mas não todos, têm origem embrionária (Guilliams et al., 2018). Monócitos migram dos vasos sanguíneos para os tecidos, e essa migração resulta em sua diferenciação em macrófagos ou em células dendríticas (Kelley et al., 1988; Lewis et al, 1999). Em sua



estrutura, os macrófagos possuem uma cromatina frouxa, possuindo um grande citoplasma em comparação aos monócitos. Dentre as organelas citoplasmáticas, o complexo de Golgi toma um grande espaço devido a intensa produção de enzimas lisossomas e glicoproteínas, conseqüentemente o retículo endoplasmático é aumentado também na síntese de lipídeos. O macrófago é uma célula de membrana ondulada pela presença de fibras do citoesqueleto, que comandam as estruturas dos pseudópodes em funções de locomoção e fagocitose (Lewis et al, 1999; Cox et al., 1999). Os tecidos de mamíferos possuem características diferentes em seu microambiente. Por exemplo, o peritônio tem um alto grau anaeróbico, já os alvéolos pulmonares são altamente oxigenados e, por isso, aeróbicos. Como consequência, há uma adaptação dos macrófagos em relação ao microambiente do tecido habitado, causando mudanças fenotípicas, mas conservando a sua função fagocítica (Leeper-Woodford et al., 1999).

Macrófagos produzem variados tipos de metabólitos secundários quando ativados por ligantes de receptor de padrões de patógenos como, por exemplo, por lipopolissacarídeos (LPS) ou citocinas como TNF- $\alpha$ . Esses metabólitos como o óxido nítrico (NO), radical hidroxila (OH $\cdot$ ), peróxido de hidrogênio (H $_2$ O $_2$ ), ânion superóxido (O $_2$  $^-$ ) entre outros, são localizados em fagolisossomos secundários junto com enzimas hidrolíticas (Ho et al., 1992; Weinberg et al., 1995; Giorgio et al., 1996; Gantt et al., 2001). Esses metabólitos são altamente tóxicos, e a sua produção se dá durante a fagocitose, onde durante este processo, há um grande aumento no consumo de oxigênio pelos macrófagos, em um momento de “burst” respiratório. Entretanto, os macrófagos também podem sintetizar NO a partir da L-arginina usando a enzima NO-sintetase induzida (iNOS), um radical livre com funções microbicidas que reage com o superóxido formando peroxinitrito, que também é microbicida (Weinberg et al., 1995). Existem microrganismos como a *Leishmania* que conseguem evadir destes metabólitos, como por exemplo, a inibição da expressão da enzima iNOS (Linares, et al., 2000; Sacks, 2002 e Mateo et al., 2003).

### **1.6.2 Macrófagos classicamente ativados**

Macrófagos classicamente ativados, também chamados de M1, exibem um fenótipo tipicamente inflamado, com uma alta produção de citocinas inflamatórias como IL-12, e uma baixa produção de IL-10 (Mantovani et al., 2002). O fenótipo M1 também é conhecido por sua alta capacidade em apresentar antígenos e pela alta produção de IL-23 (Skeen et al., 1996; Verreck et al., 2004).

Quando estimulados com IFN- $\gamma$  e LPS ou TNF- $\alpha$ , moléculas da ativação clássica, macrófagos tendem a expressar mais receptores de opsoninas, como Fc $\gamma$ RIIIa (CD16) (Mantovani et al., 2002). Essas células são altamente eficientes em matar patógenos intracelulares, pois possuem mecanismos como a produção de radicais de nitrogênio e oxigênio. Essas células secretam citocinas inflamatórias e quimiocinas que configuram o padrão de resposta Th1. A exposição de macrófagos a LPS e IFN- $\gamma$  induz a expressão de CCL5, CXCL9, CXCL10 e CXCL11, que possuem receptores em células com o padrão de resposta Th1 (Mantovani et al., 1999).

### **1.6.3 Macrófagos alternativamente ativados**

Stein e colaboradores (1992) identificaram pela primeira vez uma forma alternativa da ativação de macrófagos, propondo que essa população de células seria ativada pelo estímulo da IL-4. Em estudos posteriores, descobriram que essa nova população poderia apresentar antígenos para linfócitos T naive, como também poderia polarizar o padrão de resposta para um perfil Th2 produtora de altos níveis de IL-4 e, por isso, foram chamados de macrófagos M2 (Andreson et al., 2002). Esse fenótipo é caracterizado pela alta produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (Mantovani et al., 2002).

Dependendo do estímulo alternativo, esse fenótipo de macrófagos pode ser dividido em três subpopulações: M2a que pode ser induzido por IL-4 ou IL-13, M2b que é induzido por imunocomplexos e agonistas de receptores do tipo Toll (TLRs) ou receptor IL-1R, e

finalmente o M2c que pode ser induzido tanto por IL-10 quanto por hormônios esteroidais (Mantovani, Sica e Locati, 2005).

Estudos demonstram que camundongos BALB/c deficientes para o receptor de IL-4 em macrófagos e neutrófilos, tinham um aumento de sua resposta protetora Th1 quando infectados por *L. major*. Entretanto, foi observado um efeito contrário quando se estimulava os receptores de IL-4 e IL-13 de macrófagos e neutrófilos, aumentando a susceptibilidade à infecção pela diminuição da ativação clássica e pela supressão de uma resposta Th1 (Brombacher e et al., 2009).

#### **1.6.4 Macrófagos e *Leishmania***

Macrófagos são células essenciais na infecção por *Leishmania*, sendo as principais células infectadas no hospedeiro vertebrado. A interação do parasito com os macrófagos é mediada através de receptores e ligantes da membrana celular. No caso de promastigotas de *Leishmania major*, as moléculas de superfície como o lipofosfoglicano (LPG), protofosfoglicano (PPG) e GP63 são necessários para estabelecer a ligação com o receptor de fibronectina, de manose e os receptores do complemento CR1 e CR3 dos macrófagos. No caso das amastigotas, a interação é mediada por opsoninas de IgG que cobrem o parasito e se ligam em receptores Fc (FcγR) de macrófagos (Liu & Uzonna, 2012).

A ativação clássica do macrófago é fundamental para o controle da infecção, assim, o desenvolvimento de uma resposta Th1 é marcado pelo aumento das funções microbicidas do macrófago (Wanasen et al., 2008; Muraille et al., 2014). Estudos demonstram tanto no modelo *in vitro* quando *in vivo* que, macrófagos estimulados com LPS e com IFN-γ matam amastigotas intracelulares de *L. major*, e que quando a enzima iNOS é inibida com N-imioetil-L-ornitina, a eliminação do parasito é interrompida (Green et al., 1990; Assreuy et al., 1994). Adicionalmente, quando macrófagos infectados por *L. major* são tratados com um intermediário da formação de óxido nítrico, a N-hidroxil-L-arginina, que por inibir a enzima arginase, há um maior controle na proliferação do parasito intracelular (Iniesta et al.,

2001). A N-hidroxi-L-arginina quando testada em lisados de promastigotas de *L. major*, demonstrou uma inibição completa das arginases do parasito.

Entretanto, existe uma ativação alternativa do macrófago para o aporte nutricional de poliaminas, e essa ativação culmina em uma maior sobrevivência do parasito. (Wanasen; Soong, 2008; Muraille et al, 2014). Wanasen e colaboradores (2008) demonstraram que um transportador de natureza proteica da *L. donovani*, o LdAAP3, teria função de transportar L-arginina do fagolisossomo para a arginase armazenada no glicosomo das formas amastigota e promastigota, e que é importante para o crescimento do parasito.

Como estratégia de evasão da morte por macrófagos via ativação clássica, a *Leishmania* é capaz de modular a resposta imunológica, inibindo a produção de IL-12 a qual é essencial para uma resposta Th1, conhecida por suas funções leishmanicidas (Liu e Uzonna, 2012; Alexander; Bryson, 2005).

Locksley e colaboradores (1987) demonstraram a relevância da resposta Th1 e Th2 através do modelo de infecção por *L. major*. Na maior parte dos casos de uma infecção por *L. major*, a resposta celular Th1 e a produção de IFN- $\gamma$  são associadas a uma resposta com funções protetoras contra o parasito, enquanto que a resposta Th2 e a produção de IL-4 são associadas a uma resposta não protetora (Kedzierski; Evans, 2014). Sabe-se que muitas das linhagens murinas como C3H, CBA e C57BL/6 podem desenvolver a infecção por *L. major*, com posterior cura da lesão, por terem uma propensão em desenvolver uma resposta Th1 com produção de IFN- $\gamma$  e IL-12, levando a ativação clássica do macrófago, e que camundongos da linhagem BALB/c desenvolvem a infecção por causa do seu padrão de resposta Th2 com citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, as quais são ineficientes para a ativação clássica (Sharma et al., 2009; Kropf et al., 2004).

## **2. JUSTIFICATIVA**

A presença de NETs em lesões de pacientes infectados por *Leishmania* em íntimo contato com células da derme como também o fato das NETs modularem a resposta de monócitos induzindo sua diferenciação para macrófagos M2 que são mais permissivos aos parasitos, justificam o estudo de caracterização das alterações fenotípicas e funcionais induzidas por NETs em macrófagos infectados ou não por *Leishmania*. Este estudo irá contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos que regulam a ativação dessas células e poderá identificar novos alvos terapêuticos.

## **3. OBJETIVO**

O presente trabalho visa avaliar o efeito das NETs sobre a modulação da resposta imunológica na infecção por *Leishmania* em macrófagos infectados *in vitro*.

### **3.1. Objetivos específicos**

Averiguar a toxicidade das NETs em macrófagos pelo ensaio de dosagem da atividade da Lactato Desidrogenase (LDH).

Avaliar o potencial leishmanicida de três diferentes tipos de macrófagos (THP-1, linhagem RAW murina e macrófagos derivados de monócitos de sangue periférico humano) tratados com NETs, através do ensaio de viabilidade do parasito com o reagente Alamar blue e através da contagem em câmara de Neubauer.

Analisar quais componentes das NETs apresentam efeito imunomodulatório.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

**4.1. Comitê de ética:** Todos os procedimentos experimentais envolvendo células humanas de indivíduos saudáveis foram aprovados pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário

Clementino Fraga Filho/UFRJ (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Nº de Registro: CAAE 42615015.4.0000.5257. Os protocolos envolvendo animais possuem licença da comissão de ética no uso de animais do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ (CEUA: 2018, Protocolo: 128-15; CONCEA: 01200.001568 / 2013-87).

**4.2. Cultivo THP-1:** A linhagem monocítica humana THP-1, cultivada em meio RPMI 1640 (LGC®) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (LGC®), 0,5% de penicilina e estreptomicina (Estoque 100x, Sigma) foi mantida até 15ª passagem, à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

**4.3. Cultivo RAW:** A linhagem de macrófagos murinos, cultivada em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino (SFB) (LGC®), 0,5% de penicilina e estreptomicina (Estoque 100x, Sigma), foi mantida até 15ª passagem, à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

**4.4. Cultivo de *L. amazonensis*:** promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa) foram cultivados a 26°C em meio completo Schneider (Invitrogen) com 10% de SFB, inativado pelo calor, 0,5% de penicilina e estreptomicina (Estoque 100x) Os parasitos serão utilizados na fase estacionária, a partir do quinto dia em cultura.

**4.5. Purificação de neutrófilos de sangue humano:** Os neutrófilos foram obtidos de doadores humanos e purificados através de centrifugação por gradiente de densidade Ficoll Histopaque (Sigma-Aldrich) na proporção 2:1 respectivamente e centrifugado a 400xg em temperatura ambiente por 30 minutos. A camada correspondente aos neutrófilos foi coletada e submetida a lise hipotônica (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub> 0,1 mM EDTA, pH 7,4) (Sigma) para remoção das hemácias. Após o processamento, os neutrófilos foram lavados em PBS (LGC®) e armazenados em meio RPMI 1640 (LGC®) até o momento de uso.

**4.6. Recrutamento e obtenção de neutrófilos peritoneais:** Para a obtenção dos neutrófilos peritoneais, uma solução de caseína (Sigma) a 9% em PBS foi preparada e autoclavada. Foi injetado 1mL dessa solução no peritônio de camundongos saudáveis

BALB/c, com 4-8 semanas de vida. Quatro horas após a injeção, os camundongos foram eutanasiados, tiveram o peritônio lavado com 5ml de RPMI 1640 (LGC®) em temperatura ambiente. Os neutrófilos foram centrifugados por 10 minutos em 400g à 4°C, e ressuspendidos em RPMI. Após esse processo, foi feita uma lâmina em citospin a 300g por 5min, para determinar o grau de pureza do lavado.

**4.7. Diferenciação dos monócitos THP-1 em macrófagos:** Os monócitos THP-1 foram removidos da garrafa de cultura, centrifugados a 400xg por 5 min à 21°C, e ressuspendidos em 1 mL de RPMI. O número de células foi determinado após coloração com Azul de Trypan e contagem de células viáveis em câmara de Neubauer. A diferenciação foi feita em placa de 24 poços e cada poço com  $3,5 \times 10^5$  monócitos recebeu 100 nM de PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) (Sigma) em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino com 0,5% de penicilina e estreptomicina em volume final de 500 µL. Após 48 horas à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> o meio foi retirado e as culturas incubadas em RPMI com 10% de SFB com 0,5% de penicilina e estreptomicina (Estoque 100x) como acima por 48 horas para descanso.

**4.8. Obtenção de macrófagos humanos:** Células mononucleares periféricas (PBMCs) foram separadas em gradiente de densidade como descrito acima, ressuspendidas em meio Eagle modificado por Dulbecco (Gibco) contendo 10% de soro humano normal (Sigma) e penicilina-estreptomicina e colocados para aderir em placas de 24 poço a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após 7-10 dias para diferenciação de monócitos em macrófagos, as células não aderentes foram removidas e os macrófagos mantidos em condições padrão em DMEM suplementado com soro humano a 5%. A pureza dos macrófagos foi > 90%, por marcação com anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD68 (BD Bioscience), e análise por citometria de fluxo. Essas células foram cedidas pelo Dr. Dumith Chequer Bou-Habib (Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, Instituto Oswaldo Cruz, RJ).

**4.9. Infecção de macrófagos por *Leishmania*:** Promastigotas de *Leishmania* foram adicionados às culturas de macrófagos THP-1 diferenciados, células RAW 264.7 ou macrófagos derivados de monócitos humanos na proporção de 5 parasitos para cada

macrófago, em volume final de 500  $\mu$ L de RPMI com 10% de SFB e 0,5% de penicilina e estreptomicina (Estoque 100x), e as culturas incubadas à 35°C, com 5% de CO<sub>2</sub> por 24h.

**4.10. Obtenção de sobrenadante rico em NETs induzidas por *L. amazonensis*:** Os neutrófilos humanos e murinos foram incubados com promastigotas de *L. amazonensis* proporção de 10:1 (neutrófilo:parasito) a 35°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 4 horas de incubação, o sobrenadante foi coletado e centrifugado em 400xg por 10 minutos à 21°C. O pellet formado foi descartado e o sobrenadante foi novamente centrifugado em 2800xg por 10 minutos à 21°C. O sobrenadante da segunda centrifugação foi recolhido e distribuído em pequenas alíquotas que foram armazenadas à -70°C até o seu uso.

**4.11. Quantificação de NETs nos sobrenadantes:** As NETs liberadas por neutrófilos após a interação com *L. amazonensis*, foram quantificadas nos sobrenadantes das culturas através do kit Picogreen (Invitrogen) para detecção de dsDNA conforme as instruções do fabricante. A leitura da fluorescência foi feita em fluorímetro *SpectraMax* (Molecular Devices), com excitação de 485 nm e emissão de 535 nm. O cálculo da quantificação foi feito com base em curva padrão de DNA.

**4.12. Ensaios de Citotoxicidade:** Macrófagos THP-1 diferenciados, células RAW 264.7 e macrófagos derivados de monócitos e mantidos em meio RPMI e 0,5% de penicilina e estreptomicina (Estoque 100x) foram incubados com diferentes concentrações de NET (50; 100; 200 e 500 ng/ml) por 4h à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Para o controle positivo, os macrófagos foram incubados com água destilada. A citotoxicidade das NETs foi medida nos sobrenadantes das culturas pelo ensaio colorimétrico de atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) utilizando o kit da CytoTox® (Promega) de acordo com as especificações do fabricante. A leitura foi feita no espectrofotômetro a 490 nm.

**4.13. Tratamento de macrófagos infectados com NETs:** Após realizar a infecção por 24h, os macrófagos infectados foram lavados com PBS para retirada de parasitos livres e do SFB. Em seguida, foram adicionadas várias concentrações de NETs em volume final de 300  $\mu$ l e as culturas foram incubadas por 4h a 35°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após isso, foram adicionados



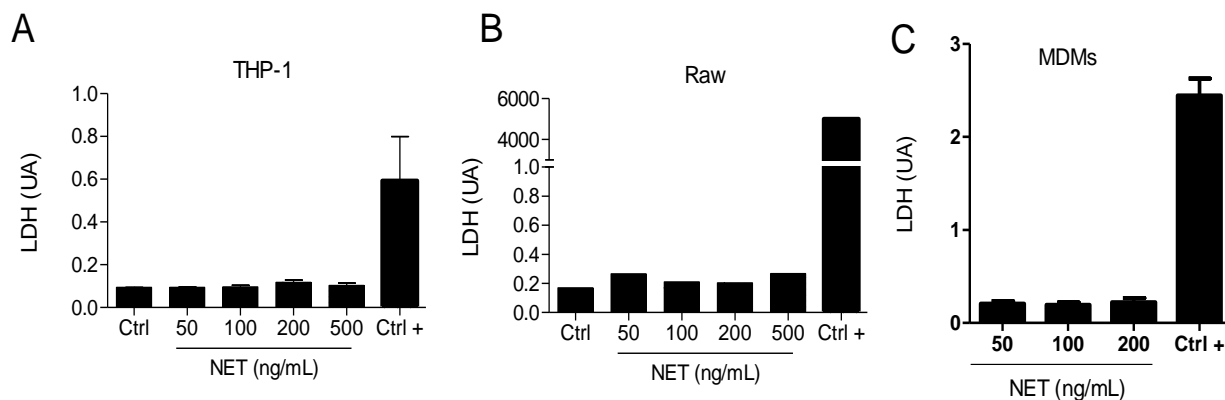
mais 300 µl de RPMI com 20% de SFB, totalizando o volume final de 600 µl. Após 24h de incubação, os macrófagos foram lisados com 200 µl SDS 0,01% por 5 min, seguido pela adição de 800 µl de meio Schneider com 10% SFB e 0,5% de gentamicina (Estoque 100x), e a placa foi incubada por mais 48h à 26°C para crescimento dos parasitos. A viabilidade e proliferação celular foi analisada por contagem de parasitos vivos na câmara de Neubauer e pelo ensaio colorimétrico de AlamarBlue (Invitrogen) de acordo com as especificações do fabricante nos sobrenadantes das culturas nas mesmas condições citadas anteriormente. A leitura foi feita no espectrofotômetro a 530 nm.

**4.14. Pré-Tratamento das NETs:** Para a desnaturação das proteínas presentes na NET, o sobrenadante foi fervido à 100°C por 10 minutos e denominado fNET nos gráficos. No caso das NETs digeridas (dNET), foi adicionado uma unidade de DNase (Promega) em 500ul do SBN e posteriormente incubado por 10 minutos na estufa de 35°C.

**4.15. Análise Estatística:** Os dados foram analisados pelo teste Anova, com Fishers LSD, como pós-teste. Nos gráficos com apenas 2 grupos, o teste T foi usado para análise. As análises foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 5. O valor de p foi considerado significativo quando  $\leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

Em nossos estudos, primeiro avaliamos se as NETs possuiriam algum efeito tóxico sobre os macrófagos. Para tal, incubamos macrófagos THP-1, RAW e macrófagos derivados de monócitos humanos (MDMs) com diferentes concentrações das NETs e dosamos a atividade da enzima citoplasmática lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante das culturas. Nossos resultados mostram que nenhuma das concentrações (50 a 500 ng/ml, e no caso das MDMs de 50 a 200 ng/ml) de NET, induzida por *Leishmania amazonensis*, foi tóxica para os macrófagos THP-1, RAW e MDMs (Figura 3).

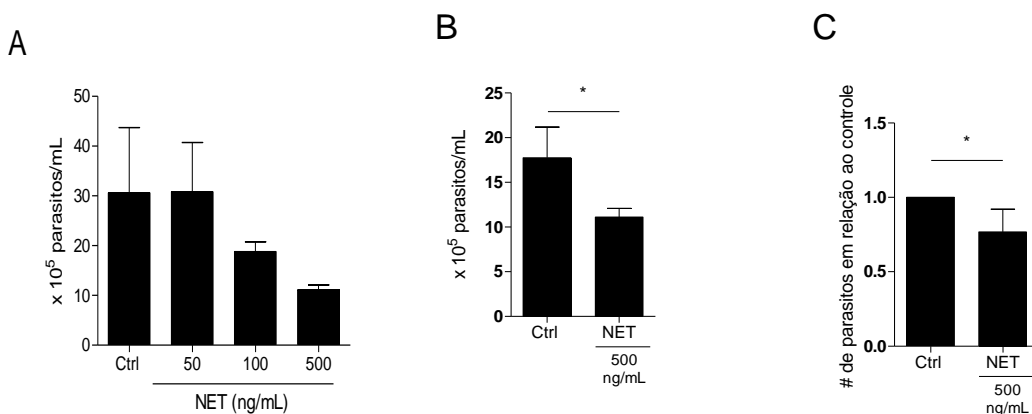


**Figura 3. Toxicidade das NETs para macrófagos.** NETs obtidas por estimulação de neutrófilos com promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas com macrófagos THP-1, RAW e MDMs nas concentrações indicadas nos gráficos, por 4h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. A toxicidade foi avaliada no sobrenadante das culturas pela dosagem da atividade da enzima lactato desidrogenase. Macrófagos lisados com H<sub>2</sub>O (Ctrl+) foram usados como controle positivo. Macrófagos incubados somente com meio de cultura RPMI (Ctrl-) foram usados como controle negativo. Os dados estão apresentados como unidades arbitrárias (UA) obtidas por leitura a 490 nm. Os gráficos mostram a média +/- erro padrão da média de (A) 2 experimentos em duplicata, (B) 1 experimento e (C) 2 doadores em duplicata.

Tendo em vista que as NETs não foram tóxicas para os macrófagos nas concentrações testadas, investigamos se elas conseguiriam modular a carga parasitária de macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis*. Para tal, infectamos os macrófagos na proporção de 1:5 (macrófago:parasito) por 24 horas. Após isso, lavamos os poços para retirar os parasitos que não foram fagocitados, e tratamos os macrófagos infectados com diferentes concentrações de NETs e incubamos durante 4 horas. Em seguida, adicionamos 10% de soro fetal bovino para inativar as NETs e incubamos por 24 horas na estufa de 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após isso, lisamos os macrófagos e analisamos a sobrevivência do parasito através da câmara de Neubauer e também pelo ensaio de viabilidade Alamarblue.

Nossos resultados demonstraram que em macrófagos THP-1 as NETs diminuíram a sobrevivência do parasito apenas quando 500 ng/ml das redes foram adicionadas à cultura

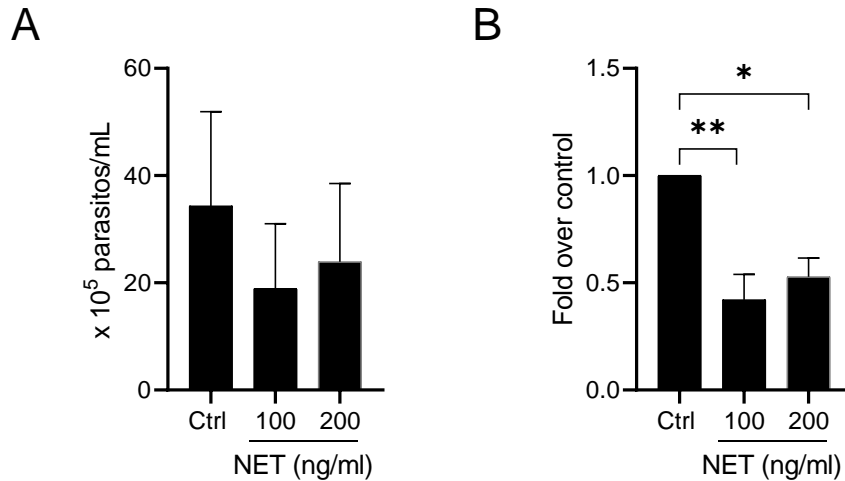
(Figura 4). Observamos que a THP-1 não respondeu a concentração de 50 ng/ml de NET, e que há um padrão dose-resposta acentuado a partir da concentração de 100 ng/ml, mostrando que a sobrevivência do parasito diminui conforme a concentração de NET aumenta, como por exemplo, na letra B onde a diminuição do parasito foi de 1,6 vezes (Figura 4).



**Figura 4. Efeito das NETs na infecção de macrófagos THP-1 por Leishmania.** Macrófagos THP-1 foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* por 24 h a 35°C, 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, os parasitos não internalizados foram retirados da cultura por lavagem em PBS. As NETs, nas concentrações indicadas no gráfico, foram adicionadas e a cultura foi mantida por 4 h. Após o tratamento, foi adicionado 10% de soro fetal bovino e as culturas incubadas a 35°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após 48 h de infecção, os macrófagos foram lisados e meio Schneider completo foi adicionado e as culturas incubadas a 26 °C. Após 48 h, o número de promastigotas vivos foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. Resultados mostrados como número de parasitas/ml (A, B=C) e número de parasitas em relação ao controle (C). Dados representam (A) 5 e (B) 4 experimentos independentes, (C) normalizados em relação ao controle não tratado (Fold over control) mostrados como média +/- erro padrão da média.

Para avaliar o efeito das NETs no modelo murino, infectamos macrófagos RAW e tratamos estas células com NETs produzidas a partir da estimulação de neutrófilos peritoneais com promastigotas de *L. amazonensis*. Nossos dados mostram que as NETs murinas também foram eficientes na eliminação dos parasitos, uma vez que observamos

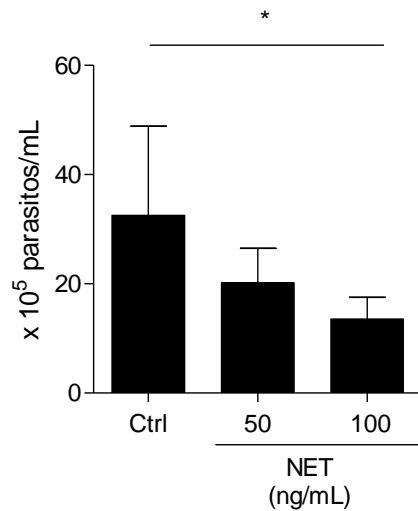
diminuição 1,8 vezes na sua sobrevivência quando 100 ng/ml de NET foram adicionadas à cultura de macrófagos infectados (Figura 5A). Entretanto, não observamos diferenças entre as concentrações utilizadas (100 e 200 ng/ml). As diferenças na sobrevivência do parasito ficam mais evidentes quando normalizamos o controle não tratado com NET (Figura 5B).



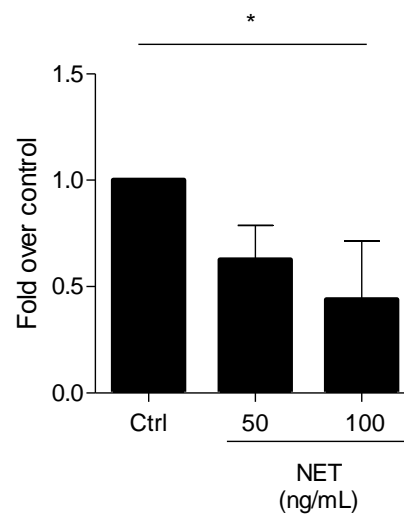
**Figura 5. Efeito das NETs na infecção de macrófagos murinos por Leishmania.** Macrófagos da linhagem murina RAW foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* por 24h a 35°C, 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, os parasitos não internalizados foram removidos por lavagem em PBS, e as NETs, nas concentrações indicadas no gráfico, foram adicionadas e a cultura foi mantida por 4h. Após o tratamento, foram adicionados 10% de soro fetal bovino e os macrófagos infectados foram incubados por mais 48 h a 35°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após, os macrófagos foram lisados e meio Schneider completo foi adicionado e a cultura foi incubada a 26°C. Após 48 h, o número de promastigotas vivos foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. Resultados mostrados como (A) número de parasitos/ml e (B) normalizados em relação ao controle não tratado (Fold over control) de 3 experimentos independentes estão mostrados como média +/- erro padrão da média.

Observamos um perfil semelhante quando estudamos o efeito das NETs humanas em macrófagos derivados a partir de monócitos de sangue periférico humano. As NETs, na concentração de 100 ng/ml, aumentaram a capacidade leishmanicida dos macrófagos infectados em 2,4 vezes (Figura 6).

A



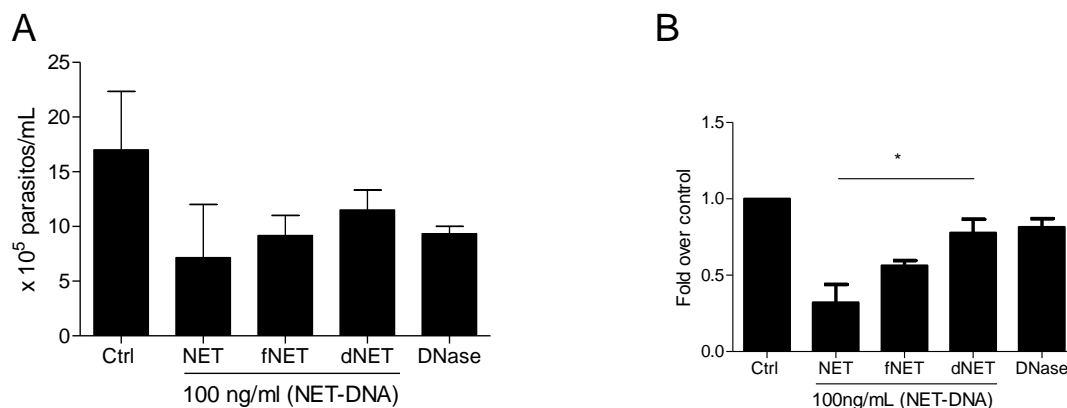
B



**Figura 6. Efeito das NETs na infecção de macrófagos derivados de monócitos humanos por *Leishmania*.** Macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* por 24 h a 35°C, 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, os parasitos não internalizados foram removidos por lavagem em PBS. As NETs, nas concentrações indicadas no gráfico, foram adicionadas e a cultura foi mantida por 4 h. Após o tratamento, foi adicionado 10% de soro fetal bovino e os macrófagos infectados foram incubados por mais 24h a 35°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após 48h de infecção, os macrófagos foram lisados e meio Schneider completo foi adicionado e a cultura foi incubada a 26°C. Após 48 h, o número de promastigotas vivos foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. Resultados mostrados como (A) número de parasitos/ml e (B) normalizados em relação ao controle não tratado (Fold over control) de 3 doadores estão mostrados como média +/- erro padrão da média.

Uma vez identificado esse papel das NETs sobre os macrófagos infectados com os parasitos, decidimos avaliar quais componentes das NETs participariam desse efeito. Inicialmente testamos o papel das proteínas associadas às NETs através de sua desnaturação por calor. Em nossos resultados, observamos que NETs cujas proteínas foram desnaturadas (fNET), embora sem significância estatística, apresentaram ter uma tendência à redução da morte do parasito pelo tratamento com as NETs (Figura 7).

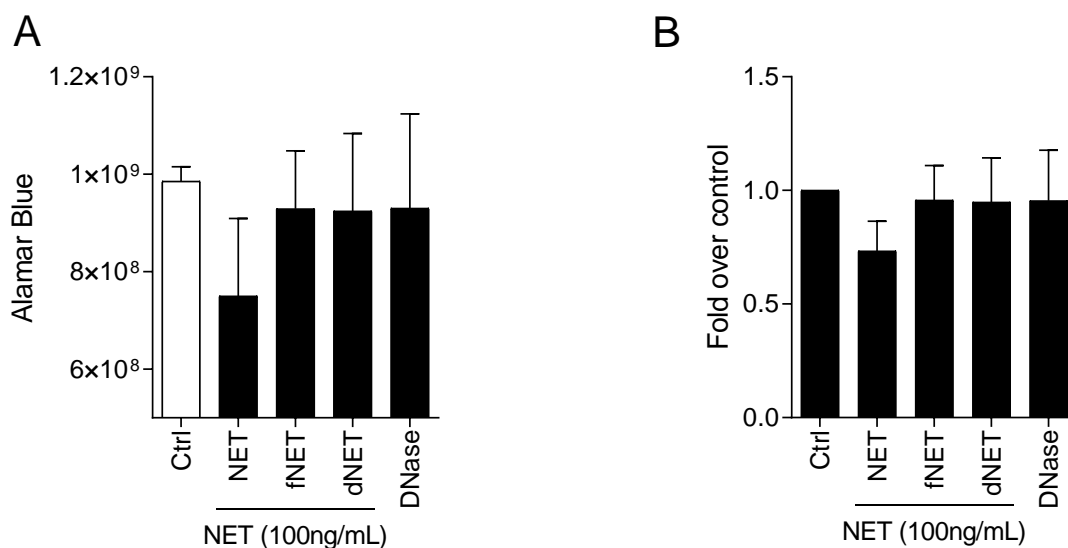
O próximo passo foi testar se a integridade do arcabouço de DNA desempenhava algum papel no efeito anti-parasito das NETs. Para isso, as NETs foram pre-digeridas com DNase (dNET). Nossos resultados demonstraram que este tratamento também inibiu o efeito anti-parasitário das NETs, evidenciando o papel da estrutura dessas redes no efeito anti-parasitário (Figura 7).



**Figura 7. Participação de componentes das NETs no efeito leishmanicida.** *Macrófagos RAW foram infectados com promastigotas de L. amazonensis por 24 h a 35°C, 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, os parasitos não internalizados foram removidos da cultura por lavagem em PBS. NETs, fNETs (fervidas) dNETs (clivadas com DNase) (100 µg/ml), foram adicionadas e a cultura foi mantida por 4 h. Após o tratamento, foi adicionado 10% de soro fetal bovino e os macrófagos infectados foram incubados por mais 24h a 35°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após 48h de infecção, os macrófagos foram lisados e meio Schneider completo foi adicionado e a cultura foi incubada a 26°C. Após 48 h, o número de promastigotas vivos foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. DNase (1 U/poço) foi usada como controle do tratamento das NETs. Resultados de 2 experimentos independentes feitos em triplicata estão mostrados como (A) número de parasitos/ml. (B) “Fold over control”, média +/- erro padrão da média.*

A mesma estratégia utilizada nos macrófagos murinos foi empregada nos macrófagos humanos. Neste caso, as NETs que tiveram as proteínas desnaturadas por calor

e as NETs clivadas por DNase não resultaram em um aumento da sobrevivência do parasito estatisticamente significativa (Figura 8).



**Figura 8. Macrófagos derivados de monócitos humanos e tratamento com DNase.** Macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* por 24h a 35°C, 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, os parasitos não internalizados foram retirados da cultura por lavagem em PBS. Os tipos de NETs indicados no gráfico, foram adicionados e a cultura foi mantida por 4h. Após o tratamento, foi adicionado 10% de soro fetal bovino e os macrófagos infectados foram incubados por mais 24h a 35°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após 48h de infecção, os macrófagos foram lisados e meio Schneider completo foi adicionado e a cultura foi incubada a 26°C. Após 48h, o número de promastigotas vivos foi determinado pelo ensaio de viabilidade Alamarblue. Resultados de 3 experimentos independentes estão mostrados como média +/- erro padrão da média. (A) número de parasitos vivos e (B) quantidade de parasitos em relação ao controle infectado e não tratado com NETs.

## 5. DISCUSSÃO

As NETs podem expandir em até 15 vezes o seu tamanho se comparado com a célula que a originou (Brinkmann & Zykhlin, 2012), o que aumenta significativamente a sua área de atuação/contato, tanto sobre as células do hospedeiro, quanto as do microrganismo que a induziu. As NETs, por sua natureza tóxica, podem provocar lesões no epitélio pulmonar de pacientes após uma transfusão de sangue, caracterizando uma complicação chamada no inglês de TRALI (lesão pulmonar aguda relacionada à transfusão) (Thomas et al., 2012), e também já foi evidenciada a citotoxicidade das NETs na patogênese do Lúpus, causando danos no tecido da pele e dos rins, também aumentando a inflamação de células dendríticas (Villanueva et al., 2011). Estudos demonstram que histonas das NETs poderiam estar causando dano no epitélio pulmonar, como também no endotélio (Saffarzadeh et al., 2012). A interação dos neutrófilos com o tecido endotelial é fundamental para a transmigração na diapedese. Gupta e colaboradores (2010) demonstraram que a interação entre neutrófilos e células endoteliais induziu a formação de NETs, e que essas redes provocam a morte celular do endotélio. Esse efeito se deve parcialmente pela produção de IL-8 pelas células endoteliais que foram ativadas por neutrófilos. Por isso, em nossos estudos, decidimos investigar se as NETs poderiam ser tóxicas para os macrófagos. Entretanto, observamos que, dentro das 4 horas de incubação que utilizamos em nossos estudos, nenhuma concentração de NETs induzidas por *Leishmania amazonensis*, tanto em neutrófilos murinos quanto em neutrófilos humanos foi tóxica para nenhum dos tipos de macrófagos testados. Embora já tenha sido demonstrado que a composição das NETs pode variar de acordo com o estímulo (Braian, Hoge & Stendahl, 2013; Khandpur et al., 2013), corroborando com nossos dados, foi mostrado que NETs induzidas por IL-8 também não foram tóxicas para macrófagos humanos, além de inibir a replicação dessas células do HIV-1 (Mojoli et al., submetido).

O envolvimento de NETs em diferentes processos inflamatórios ou infecciosos tem sido bem documentado, cujos efeitos podem ser prejudiciais ou benéficos ao hospedeiro. Assim, vem sendo sugerido que a produção abundante de NETs pode estar implicada no desenvolvimento de doenças autoimunes, câncer, trombose e dano tecidual



(Papayannopoulos, 2017). Por outro lado, as NETs são capazes de controlar o crescimento e a propagação de diversos patógenos, como bactérias (Brinkmann et al., 2004, Braian et al., 2013, Halverson et al., 2015), fungos (Urban et al., 2006 e 2009; Silva et al., 2020), vírus (Saitoh et al., 2012, Schönrich & Raftery, 2016) e parasitos (Sousa-Rocha et al., 2015, Gabriel et al., 2010; Wardini et al., 2019, Sercundes et al., 2016).

Nosso grupo demonstrou previamente que promastigotas de *Leishmania* e seu lipofosfoglicano são potentes indutores de NETs, e que isso resulta na contenção e morte do parasito (Guimaraes-Costa et al., 2009). Também demonstramos que essas redes estão presentes e, em interação com células dos tecidos infectados como foi evidenciado em biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea (Morgado et al., 2015). Entretanto, pouco se sabe sobre quais seriam os efeitos dessas redes sobre os macrófagos infectados por *Leishmania* que estão presentes na lesão, evidenciando uma lacuna nos conhecimentos sobre o seu potencial imunomodulatório nessa infecção.

No presente estudo, testamos o papel das NETs em macrófagos murinos (RAW264,7), na linhagem de macrófagos humanos (THP-1) e em macrófagos derivados de monócitos humanos infectados com a espécie *Leishmania amazonensis*. As NETs foram induzidas pela forma promastigota do parasito, tanto em neutrófilos humanos para teste nos macrófagos humanos, quanto em murinos para os testes em células RAW264.7. Observamos que nos três tipos diferentes de macrófagos, as NETs diminuíram a carga parasitaria intracelular de forma dose-dependente, tendo uma diminuição na sobrevivência do parasito a partir de 100 ng/ml de NET-DNA. Este efeito poderia ser explicado pela ativação das funções leishmanicidas dos macrófagos por um ou vários componentes das NETs. Visando elucidar este mecanismo, testamos inicialmente se as proteínas associadas às NETs desempenhariam algum papel nesse fenômeno. Nossos resultados evidenciaram que aparentemente houve uma tendência na restauração da sobrevivência dos parasitos quando tratamos os macrófagos infectados com NETs previamente fervidas para a desnaturação de suas proteínas, evidenciando o seu papel na morte dos parasitos. Entretanto, não observamos relevância estatística nesse resultado. As histonas, por exemplo, compõem cerca de 70% das proteínas associadas às NETs, e em um estudo recente, os autores

identificam que o Receptor de Lectina-2d do tipo-c (Clec2d), presentes na membrana de endossomas de macrófagos, estaria se ligando aos resíduos de histonas complexadas com DNA, e iniciando uma resposta inflamatória via TLR9 (Lai et al., 2019). Assim como a chaperona Hsp72, uma proteína presente em NETs induzidas por *Mycobacterium tuberculosis*, foi apontada como responsável pela ativação do perfil inflamatório de macrófagos, acarretando no aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 (Braian, Hogeia & Stendahl, 2013).

Também a elastase, outra proteína que esta associada às NETs, foi descrita a sua função de ativar macrófagos através do TLR4, onde a adição desta enzima diminuiu a carga parasitaria em macrófagos infectados por *Leishmania major* (Ribeiro-Gomes et al., 2007). Entretanto, em outro projeto do nosso grupo, identificamos que a interação *in vitro* das NETs diminui a expressão dos receptores para IL-4, citocina necessária para a diferenciação em células dendríticas, as quais são fundamentais para uma resposta Th1, resposta que é conhecida por suas funções leishmanicidas. No mesmo estudo, nosso grupo identificou que a interação das NETs com o monócito promovia a diferenciação para um macrófago com perfil M2, aumentando assim a sobrevivência do parasito de *Leishmania* (Guimarães-Costa et al., 2017).

A seguir verificamos se a integridade do arcabouço de DNA das NETs participaria da atividade leishmanicida, pré-tratando as NETs com DNase. Surpreendentemente, embora esse tratamento tenha abolido o efeito leishmanicida, a adição de DNase aos macrófagos (controle do tratamento) também reverteu a morte dos parasitos ao nível dos controles, tanto nos macrófagos murinos quanto nos derivados de monócitos humanos. Estes resultados precisam ser mais bem estudados no futuro, com outras fontes de DNase.

## **5. CONCLUSÕES**

Nas concentrações utilizadas em nosso estudo, as NETs não apresentaram citotoxicidade para nenhum dos três tipos de macrófagos testados (RAW264,7, THP-1 e MDMs) nas concentrações utilizadas.

As NETs são capazes de ativar macrófagos murinos e humanos e de controlar a infecção intracelular *por Leishmania amazonensis*. Os macrófagos da linhagem THP-1 foram mais resistentes à ativação pelas NETs e, nestas células, apenas observamos menor sobrevivência dos parasitos com 500 ng/ml das redes.

A ativação dos macrófagos infectados depende da integridade do arcabouço de DNA das NETs (ao menos nas células murinas). Mais experimentos serão necessários para saber se o mesmo ocorre na ativação de macrófagos humanos. Não observamos diferença estatística sobre o papel dos componentes proteicos associados às redes. Contudo, precisamos de mais experimentos para confirmar este achado. Não sabemos, por exemplo, se o aquecimento por 10 minutos foi suficiente para desnaturar todas as proteínas presentes nas NETs. Podemos também, em paralelo, tratar as NETs com proteases para degradar as proteínas e, assim, confirmar ou não se as proteínas associadas às redes possuem algum papel na ativação dos macrófagos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. & LICHTMAN, A. H. (2003). Innate Immunity In: Cellular and Molecular Immunology, 275-297. Filadélfia, Saunders, USA. 5ed.

ABI ABDALLAH D. S., LIN C., BALL C. J., KING M. R., DUHAMEL G. E., DENKERS E. Y. (2011). *Toxoplasma gondii* triggers Release of Human and Mouse Neutrophil Extracellular Traps. Infect Immun. 80:768-77.

AGA, E., KATSCHINSKI, D. M., VAN ZANDBERGEN, G., LAUFS, H., HANSEN, B., MULLER, K., LASKAY, T. (2002). Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by the Intracellular Parasite *Leishmania major*. J Immunol. 169, 898-905.

ALEXANDER J., BRYSON K. (2005). T helper 1/ T helper 2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. Immunol Let; 99:17-23.

AMULIC B., CAZALET C., HAYES G. L., METZLER KD, ZYCHLINSKY A. (2012). Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. Annu Rev Immunol. 30: 459-89.

ASSREUY J., CUNHA F. Q., EPPERLEIN M., NORONHA-DUTRA A., O'DONNELL C. A., MONCADA S. (1994). Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. Eur J immunol; 24: 672-6.

- ATAYDE, V. D., ASLAN, H., TOWNSEND, S., HASSANI, K., KAMHAWI, S., & OLIVIER, M. (2015). Exosome Secretion by the Parasitic Protozoan *Leishmania* within the Sand Fly Midgut. *Cell Rep*, 13: 957–967.
- BAINTON D. F., ULLYOT J. L., FARQUHAR M. G. (1971). The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow, *J Exp Med*.134:907-34.
- BAKER V. S., IMADE G. E., MOLTA N. B., TAWDE P., PAM S. D., OBADOFIN M. O., SAGAY S. A., EGAH D. Z., IYA D., AFOLABI B. B., BAKER M., FORD K., FORD R., ROUX K. H., KELLER T. C. (2008). Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age. *Malaria J*. 7: 41.
- BARRIENTOS L., BIGNON A., GUEGUEN C., D. E. CHAISEMARTIN L, GORGES R., SANDRÉ C., et al. (2014). Neutrophil extracellular traps downregulate lipopolysaccharide-induced activation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 193:5689–98.
- BARRIENTOS L., MARIN-ESTEBAN V., D. E. CHAISEMARTIN L., LE-MOAL V. L., SANDRÉ C., BIACHINI E., et al. (2013). An Improved Strategy to Recover Large Fragments of Functional Human Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol*. 4:166.
- BATES, P. A. (2008). *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Curr Opin Microbiol*, 11: 340–344.
- BATES P. A. (2007) Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.*, 37:1097-106.
- BERMANN, J. D. (1997). Human Leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis*. 24: 684-703.
- BESTEIRO, S., WILLIAMS, R. A. M., COOMBS, G. H., MOTTRAMA, J. C. (2007). Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol.*, 37: 1063-1075.
- BORREGAARD N., COWLAND J. B.. (1997). Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 89:3503-21.
- BRAIAN C, HOGEA V & STENDAHL O. (2013). Mycobacterium tuberculosis- induced neutrophil extracellular traps activate human macrophages. *J Innate Immun*, 5:591-602.
- BRINKMANN, V., & ZYCHLINSKY, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*, 198: 773–78.
- BRINKMANN V., REICHARD U., GOOSMANN C., FAULER B., UHLEMANN Y., WEISS D. S., et al. (2014). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*.303:1532-5.
- BRINKMANN V., ZYCHLINSKY A. (2007). Beneficial suicide: why neutrophils die to make a NETs. *Nat Rev Microbiol*. 5:577-82.
- BROMBACHER, F., ARENDSE, B., PETERSON, R., HOLSCHER, A., HOLSCHER, C. (2009). Analyzing classical and alternative macrophage activation in macrophage/neutrophil-specific IL-4 receptor-alpha-deficient mice. *Methods Mol*.531, 225-252.
- BURZA, S., CROFT, S. L., & BOELAERT, M. (2018). Leishmaniasis. *Lancet*. 392, 951-970

- CASSATELLA, M. A., ÖSTBERG, N. K., TAMASSIA, N., & SOEHNLEIN, O. (2019). Biological Roles of Neutrophil-Derived Granule Proteins and Cytokines. *Trends Immunol.* 2019 ;40:648-664.
- CHAGAS, A. C., OLIVEIRA, F., DEBRABANT, A., VALENZUELA, J. G., RIBEIRO, J. M. C., & CALVO, E. (2014). Lundep, a Sand Fly Salivary Endonuclease Increases *Leishmania* Parasite Survival in Neutrophils and Inhibits XIIa Contact Activation in Human Plasma. *PLoS Pathog*, 10: e1003923.
- CHAPPUIS F., SUNDAR, S., HAILU, A., GHALIB, H., RIJAL, S., PEELING, R. W., BOELAERT, M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature*, 5, 873–882.
- CHUMMITRI P., OSTOJIC, ANDREASEN C. B., REDMOND S. B., LAMONT S. J., PALIC D. (2009). Chicken heterophil extracellular traps (HETs): Novel defense mechanism of chicken heterophils. *Vet Immunol Immunopathol.* 129:126-31.
- COX, D., TSENG, C., BJEKIC, G., GREENBERG, S. A (1999). Requirement of Phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J Biol Chem* 274: 1240-1247.
- DESOUZA-VIEIRA, T., GUIMARÃES-COSTA, A., ROCHAEL, N. C., LIRA, M. N., NASCIMENTO, M. T., LIMA-GOMEZ, P. S., SARAIVA, E. M. (2016). Neutrophil extracellular traps release induced by *Leishmania*: role of PI3K $\gamma$ , ERK, PI3K $\sigma$ , PKC, and [Ca<sup>2+</sup> ]. *J Leukoc Biol*, 100: 801–810.
- DE TREZ C., MAGEZ S., AKIRA S., RYFFEL B., CARLIER Y., MURAILLE E. (2009). iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania major* infection phase of C57BL/6 resistant mice. *PLoS Pathog* 5(6):e1000494.
- DEY, R., JOSHI, A. B., OLIVEIRA, F., PEREIRA, L., GUIMARÃES-COSTA, A. B., SERAFIM, T. D., KAMHAWI, S. (2018). Gut Microbes Egested during Bites of Infected Sand Flies Augment Severity of Leishmaniasis via Inflammasome-Derived IL-1 $\beta$ . *Cell Host Micr*, 23: 134–143.e6.
- DWYER M., SHAN Q., D'ORTONA S., MAURER R., MITCHELL R., OLESEN H., et al. (2014) Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor. *J. Innate Immun*;6:765-79.
- FARRERA C. & FADEEL B. (2013). Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J Immunol.*, 191:2647-56.
- FAVALI C., TAVARES N., CLARÊNCIO J., BARRAL A., BARRAL-NETTO M., BRODSKYN C. (2007). *Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. *J Leukoc Biol*82:1401–6.
- FUCHS T A., ABED U., GOOSMANN C., HURWITZ R., SCHULZE I., WAHN V., et all. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 176:231-41.
- GABRIEL, C., MCMASTER, W. R., GIRARD, D., AND DESCOTEAUX, A. (2010). *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *J. Immunol.* 185: 4319–4327.
- GANTT, K. R., GOLDMAN, T. L., MACCORMICK, M. L., MILLER, M. A., JERONIMO, S. M. B, NASCIMENTO, E. T., BRITIGAN, B. E., WILSON, M. E. (2001). Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J Immunol* 167: 893-901.

- GIORGIO, S., LINARES, E., CAPURRO, L., BIANCHI, A.G., AUGUSTO, O. (1996). Formation nitrosyl hemoglobin and nitrotyrosine during leishmaniasis. *Photochem Photobiol* 63: 750-754.
- GREEN S. J., CRAWFORD R. M., HOCKMEYER J. T., MELTZER M. S., NACY C. A. (1990). *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent mechanism in IFN- $\gamma$ -stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor  $\alpha$ . *J Immunol* 145: 4290-7.
- GRIMALDI G. J. R., HOOMAN MOMEN, ROBERTO D. NAIFF, DIANE MCMAHON-PRATT, TOBY V. BARRETT. (1991). Characterization and Classification of Leishmanial Parasites from Humans, Wild Mammals, and Sand Flies in the Amazon Region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 44, 645 – 661.
- GUILLIAMS M., MILDNER A., YONA S. (2018). Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*. 49:595–613.
- GUIMARÃES-COSTA, A. B., DESOUZA-VIEIRA, T. S., PALETTA-SILVA, R., FREITAS-MESQUITA, A. L., MEYER-FERNANDES, J. R., & SARAIVA, E. M. (2014). 3'-Nucleotidase/Nuclease Activity Allows *Leishmania* Parasites To Escape Killing by Neutrophil Extracellular Traps. *Infect Immunity*, 82, 1732–1740.
- GUIMARÃES-COSTA, A. B., NASCIMENTO, M. T. C., FROMENT, G. S., SOARES, R. P. P., MORGADO, F. N., CONCEICAO-SILVA, F., & SARAIVA, E. M. (2009). *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad. Sci*, 106: 6748–6753.
- GUIMARÃES-COSTA, A. B., ROCHAEL, N. C., OLIVEIRA, F., ECHEVARRIA-LIMA, J., & SARAIVA, E. M. (2017). Neutrophil Extracellular Traps Reprogram IL-4/GM-CSF-Induced Monocyte Differentiation to Anti-inflammatory Macrophages. *Front Immun* 17;8:523.
- GUPTA, A. K., JOSHI, M. B., PHILIPPOVA, M., ERNE, P., HASLER, P., HAHN, S., & RESINK, T. J. (2010). Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett*, 584: 3193–3197.
- HAKKIM A., FÜRNRÖHR B. G., AMANN K., LAUBE B., ABED U. A., BRINKMANN V., et al. (2010). Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci* 107:9813–8.
- HALVERSON T. W., WILTON M., POON K. K., PETRI B., LEWENZA S. (2015). DNA is an antimicrobial component of neutrophil extracellular traps. *PLoS Pathog*. 11:e1004593.
- HERWALDT, B. L. (1999). Leishmaniasis. *Lancet*., 354: 1191-1199.
- HO, J. L., HE, S. H., RIOS, M. J. C., WICK, E. A. (1992). Interleukin-4 inhibits human macrophage activation by tumor necrosis factor, granulocyte-monocyte colony-stimulating factor, and interleukin-3 for antileishmanial activity and oxidative burst capacity. *J Infect Dis*. 165: 344-351.
- HURRELL, B. P., BEAUMANN, M., HEYDE, S., REGLI, I. B., MÜLLER, A. J., & TACCHINI-COTTIER, F. (2017). *Leishmania mexicana* amastigotes can replicate within neutrophils. *J Leukoc Biol*, 102: 1187–1198.
- HURRELL, B. P., REGLI, I. B., & TACCHINI-COTTIER, F. (2016). Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions. *Trends Parasitol*, 32, 392–401.
- INIESTA V., GOMEZ-NIETO L. C., CORRALIZA I. (2001). The inhibition of arginase by N $\omega$ -hydroxy-L-Arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J Exp Med* 193:777-783.

- KANTHACK A, W. B. HARDY (1895). The morphology and distribution of the wandering cells of mammalia. *J Physiol.* 17:80.1–119.
- KELLEY, J.L., ROZEK, M. M., SUERAM, C.A., SCHARTZ, C.J. (1988). Activation of human peripheral blood monocytes by lipoproteins. *Am J Clin Pathol.* 130 : 233 –231.
- KHANDPUR, R., CARMONA-RIVERA, C., VIVEKANANDAN-GIRI, A., GIZINSKI, A., YALAVARTHI, S., KNIGHT, J. S., ... KAPLAN, M. J. (2013). NETs Are a Source of Citrullinated Autoantigens and Stimulate Inflammatory Responses in Rheumatoid Arthritis. *Science Translational Medicine*, 5(178), 178ra40–178ra40.
- KLEINERMAN, E. S., KNOWLES, R. D., LACHMAN, L. B., GUTTERMAN, J. U. (1988). Effect of recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on human monocyte activity in vitro and following intravenous administration. *Cancer Res* 48: 2604- 2609.
- KLEINERT, H., PAUTZ, A., LINKER, K., & SCHWARZ, P. M. (2004). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol*, 500: 255–266.
- KORNBERG A, RAO NN & AULT-RICHÉ D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu Rev Biochem*; 68:89-125.
- LAI J. J., FREIDRICH M. CRUZ, KENNETH L. ROCK, (2019). Immune Sensing of Cell Death through Recognition of Histone Sequences by C-Type Lectin-Receptor-2d Causes Inflammation and Tissue Injury *Immunity*, 52:123-135.
- LAINSON R, SHAW JJ. (1987). Evolution, classification, and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Vol 2. London: Academic. pp. 1–120.
- LAPPANN M, DANHOF S, GUENTHER F, OLIVARES-FLOREZ S, MORDHORST IL, VOGEL U. (2013). In vitro resistance mechanisms of *Neisseria meningitidis* against neutrophil extracellular traps. *Mol Microbiol.* 89:433-49.
- LASKAY T., VANZANDBERGEN G., SOLBACH W. (2003). Neutrophil granulocytes Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol*;11:210–214.
- LEEPER-WOODFORD S. K. & DETMER, K. (1999). Acute hypoxia increases alveolar macrophage tumor necrosis factor activity and alters NF-kB expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 276: 909-916.
- LEFFLER J., MARTIN M., GULLSTRAND B., TYDÉN H., LOOD C., TRUEDSSON L., et al. (2012). Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol* 188:3522–31.
- LEON B., LOPES-BRAVO M., ARDAVIN C. (2007). Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 26:519–31.
- LEWIS, J. S.; LEE J. A.; UNDERWOOD J. C. E.; HARRIS A. L.; LEWIS C.E. (1999). Macrophages responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *J Leukoc Biol* 66: 889- 900.
- LI, R. H. L., & TABLIN, F. (2018). A Comparative Review of Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis. *Front Vet Sci*, 2018. 28;5:291

- LI P., LI M., LINDBERG M. R., KENNETT M. J., XIONG N., WANG Y. (2010). PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J ExpMed.* 207:1853-62.
- LINARES, E., AUGUSTO, O., BARÃO, S. C., GIORGIO S. (2000). *Leishmania amazonensis* infection does not inhibit systemic nitric oxide levels elicited lipopolysaccharide in vivo. *J Parasitol.* 86:78-82.
- LIU D., UZONNA J. E. (2012). The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cel Infect Microbiol*; 2:83.
- M. A. CAMPOS, M. A. VARGAS, V. REGUEIRO, C. M. LLOMPART, S. ALBERTI, J. A. BENGOCHEA, (2004). Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* 72, 7107–7114.
- M. ZASLOFF, (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395.
- MANTOVANI, A., SICA, A., & LOCATI, M. (2005). Macrophage Polarization Comes of Age. *Immunity*, 23: 344–346.
- MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23:549-555.
- MATEO, J., GARCIA-LECEA, M., CADENAS, S., HERNANDEZ, C., MONCADA, S (2003). Regulation of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  by nitric oxide through mitochondriadependent and independent pathways. *Biochem J* 376: 537-544.
- MEDINA, E. (2009). Neutrophil Extracellular Traps: A Strategic Tactic to Defeat Pathogens with Potential Consequences for the Host. *Innate Immunity*, 1: 176–180.
- METZLER K. D., FUCHS T. A., NAUSEE W. M., REUMAUX D., ROSIER J., SCHULZE I, et al. (2011). Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood.* 20;117:953-9.
- MOJOLI, A. GONÇALVES, BS, TEMEROZO, J. R., CISTER-ALVES, B., GEDDES, V., SANTANA, R., PILOTTO, J. H., SARAIVA, E. M., BOU-HABIB, D. C. Neutrophil extracellular traps restrict HIV-1 infection in macrophages. *Submetido.*
- MORGADO, F. N., NASCIMENTO, M. T. C., SARAIVA, E. M., OLIVEIRA-RIBEIRO, C. D., MADEIRA, M. F., COSTA-SANTOS, M., VASCONCELLOS, E. C. F, F. PIMENTEL, M. I., ROSADISCK LYRA, M., SCHUBACH, A. O., CONCEIÇÃO-SILVA, F. (2015). Are Neutrophil Extracellular Traps Playing a Role in the Parasite Control in Active American Tegumentary Leishmaniasis Lesions? *Plos One*, 10, e0133063.
- MURAILLE E., LEO O., MOSER M. (2014). Th1/Th2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism. *Front Immunol*; 5:603.
- MÓCSAI A. (2013). Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med.* 210:1283-99.
- NASCIMENTO M. T. C., SILVA K. P., GARCIA M. C. F., MEDEIROS M. N., MACHADO E. A., NASCIMENTO S. B., et al. (2018). DNA extracellular traps are part of the immune repertoire of *Periplaneta americana*. *Dev Comp Immunol.* 84:62-70.



NOZAI S. J. P. (2003). The origin and dispersion of human parasitic diseases in the old world. Mem Inst Oswaldo Cruz. 98 Suppl 1: 13-9.

OZCEL, M. A., OZBEL, Y., OZENSOY, S., TURGAY, N., DALDAL, N., ALKAN, M. Z., (1999). The current status of leishmaniasis in Turkey. In: Matsumoto, Y. (Ed.), Epidemiology and Control of Leishmaniasis in Central Eurasia. Research Report Series No. 1. International Press Editing Centre Incorporation, Tokyo, pp. 27–30.

PACE, D. (2014). Leishmaniasis. J Infec, 69:S10–S18.

PALIC D., OSTOJIC J., ANDREASEN C. B., ROTH J. A. (2007). Fish cast NETs: Neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophil. Dev Comp Immunol. 31:805-16.

PAPAYANNOPOULOS V., METZLER K. D., HAKKIM A., ZYCHLINSKY A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. J Cell Biol. 191:677-91.

PAPAYANNOPULOS V., ZYCHLINSKY A. (2009). NETs: a new strategy for using old weapons. Trends Immunol. 30:513-21.

PAPAYANNOPOULOS, V. (2017). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. Nature Reviews Immunology, 18(2), 134–147.

PILSCZEK, F. H., SALINA, D., POON, K. K. H., FAHEY, C., YIPP, B. G., SIBLEY, C. D. KUBES, P. (2010). A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. J Immunol, 185: 7413–7425.

RAO N. N. & KORNBERG A. (1999). Inorganic polyphosphate regulates responses of *Escherichia coli* to nutritional stringencies, environmental stresses and survival in the stationary phase. Prog Mol Subcell Biol. 23:183-95.

REITHINGER R., et al. (2007). Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect Dis. 7:581–596.

REMIJSEN, Q., BERGHE, T., WIRAWAN, E. ET AL. (2011). Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. Cell Res 21, 290–304.

REMIJSEN Q., KUIJPERS T. W., WIRAWAN E., LIPPINS S., VANDENABEELE P., VANDEN BERGHE T. (2011) Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. Cell Death Differ. 18:581-8.

RIBEIRO-GOMES, F. L., MONIZ-DE-SOUZA, M. C. A., ALEXANDRE-MOREIRA, M. S., DIAS, W. B., LOPES, M. F., NUNES, M. P. DOSREIS, G. A. (2007). Neutrophils Activate Macrophages for Intracellular Killing of *Leishmania major* through Recruitment of TLR4 by Neutrophil Elastase. J Immunol, 179: 3988–3994.

ROCHA ARRIETA Y. C., ROJAS M., VASQUEZ G., LOPEZ J. (2017). The Lymphocytes Stimulation Induced DNA Release, a Phenomenon Similar to NETosis. Scand J Immunol. 86:229-238.

ROCHAEL, N. C., GUIMARÃES-COSTA, A. B., NASCIMENTO, M. T. C., DESOUZA-VIEIRA, T. S., OLIVEIRA, M. P., GARCIA E SOUZA, L. F., SARAIVA, E. M. (2015). Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by *Leishmania* parasites. Sci Rep., 5:18302

- RUIZ F. A., RODRIGUES C. O., DOCAMPO R. (2001). Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcisomes in response to cell growth, differentiation, and environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* 276:26114- 21.
- SACKS, D., SHER, A. (2002). Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature* 3: 1041-1047.
- SAFFARZADEH, M., JUENEMANN, C., QUEISSER, M. A., LOCHNIT, G., BARRETO, G., GALUSKA, S. P., PREISSNER, K. T. (2012). Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones. *PLoS ONE*, 7: e32366.
- SAITOH T., KOMANO J., SAITOH Y., MISAWA T., TAKAHAMA M., KOZAKI T., UEHATA T., IWASAKI H., OMORI H., YAMAOKA S., YAMAMOTO N., AKIRA S. (2012). Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Micr.* 12:109-16.
- SARAIVA E. M., PIMENTA P. F. P., BRODIN T. N., ROWTON E., MODI G. B. & SACKS D. L. (1995). Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Parasitol.*, 111: 275.
- SCHÖNLAU, F., SCHLESIGER, C., EHERHEN, J., GRABBE, S., SORG, C., SUNDERKÖTTER, C. (2003). Monocyte and microphage function in M-CSF-deficient op/op mice during experimental leishmaniasis. *J Leukoc Biol* 73: 564-573.
- SCHÖNRICH G., RAFTERY M. J. (2016). Neutrophil Extracellular Traps Go Viral. *Front Immunol.* 7:366.
- SCHORN C., JANKO C., LATZKO M., CHAURIO R., SCHEFF G., HERRMANN M. (2012). Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Front Immunol.* 3:277.
- SERCUNDES M. K., ORTOLAN L. S., DEBONE D., et al. (2016). Targeting Neutrophils to Prevent Malaria-Associated Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome in Mice [published correction appears in *PLoS Pathog.* 13:e1006730].
- SILVA J. C., RODRIGUES N. C., THOMPSON-SOUZA G. A., MUNIZ V. S., NEVES J. S., FIGUEIREDO R. T. (2020). Mac-1 triggers neutrophil DNA extracellular trap formation to *Aspergillus fumigatus* independently of PAD4 histone citrullination. *J Leukoc Biol.* 107:69–83.
- SKEEN, M. J., MILLER, M. A., SHINNICK, T. M., ZIEGLER, H. K. (1996). Regulation of murine macrophage IL-12 production. Activation of macrophages in vitro.; restimulation in vitro.; and modulation by other cytokines. *J Immunol*, 156 : 1196-1206.
- SONG, C., LI, H., LI, Y., DAI, M., ZHANG, L., LIU, S. PAN, P. (2019). NETs promote ALI/ARDS inflammation by regulating alveolar macrophage polarization. *Exp Cell Res.* 382:111486.
- SOUSA-ROCHA D., THOMAZ-TOBIAS M., DINIZ L. F., SOUZA P. S., PINGE-FILHO P., TOLEDO K. A. (2015). *Trypanosoma cruzi* and Its Soluble Antigens Induce NET Release by Stimulating Toll-Like Receptors. *PLoS One.* 10:e0139569.
- STEIN, M, KESHV, S., HARRIS, N., GORDON, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage manose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*, v.176:287-292.

- TANIR, G., TAYLAN OZKAN, A., DAGLAR, E., (2006). Pediatric visceral leishmaniasis in Turkey. *Pediatr. Int.* 48: 66–69.
- THOMAS, G. M., CARBO, C., CURTIS, B. R., MARTINOD, K., MAZO, I. B., SCHATZBERG, D., WAGNER, D. D. (2012). Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. *Blood*, 119: 6335–6343.
- TITUS R. G. & RIBEIRO J. M. C. (1992). Salivary gland lysates from the sand fly *L. longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science*, 239: 1306.
- TURCO S. J., DESCOTEAUX A. (1992). Lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol.*;46:65–94.
- URBAN C. F., ERMERT D., SCHMID M., ABU-ABED U., GOOSMANN C., NACKEN W., et al. (2009). Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 5e1000639.
- URBAN C. F., REICHARD U., BRINKMANN V., ZYCHLINSKY A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.* 8:668-76.
- VALENZUELA J. G., GARFIELD M., ROWTON E. D. & PHAM V. M. (2004). Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. *J Exp Biol.*, 207:3717.
- VERRECK, F. A., DE BOER, T., LANGENBERG, D. M., HOEVE, M. A; KRAMER, M., VAISBERG, E., KASTELEIN, R., KOLK, A.; DE WAAL-MALEFYT, R.; OTTENHOFF, T. H. (2004). Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to mycobacteria. *Proc Natl Acad. Sci* 101, 4560-4565.
- VILLANUEVA, E., YALAVARTHI, S., BERTHIER, C. C., HODGIN, J. B., KHANDPUR, R., LIN, A. M., KAPLAN, M. J. (2011). Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol*, 187: 538–552.
- WANASEN N., SOONG L. (2008). L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunol Res.* 41: 15-25.
- WANG, H., LI, T., CHEN, S., GU, Y., & YE, S. (2015). Neutrophil Extracellular Trap Mitochondrial DNA and Its Autoantibody in Systemic Lupus Erythematosus and a Proof-of-Concept Trial of Metformin. *ACR*, 67: 3190–3200.
- WANG Y., CHEN Y., XIN L., BEVERLEY S. M., CARLSEN E. D., POPOV V., CHANG K. P., WANG M., SOONG L. (2011). Differential microbicidal effects of human histone proteins H2A and H2B on *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Infect Immun* 79:1124-33.
- WANG Y., LI M., STADLER S., CORRELL S., LI P., WANG D., et al. (2009). Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol.* 184:205-13.
- WARDINI A. B., PINTO-DA-SILVA L. H., NADAES N. R., et al. (2019). Neutrophil properties in healthy and *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. *Sci Rep*; 9:6247.
- WARNATSCH A., IOANNOU M., WANG Q., PAPAYANNOPOULOS V. (2015). Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* 349:316–20.

WARTHA F., HENRIQUES-NORMARK B. (2008). ETosis: a novel cell death pathway. *Sci Signal.* 27;1:pe25.

WEINBERG, J. B., MISUKONIS, M.A., SHAMI, P. J., MASON, S. N., SAULS, D. L., DITTMAN, W. A., WOOD, E. R. L, SMITH, G. K., MACDONALD, B., BACHUS, K. E., HANEY, A. F., GRANGER, D. L. (1995). Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): Analysis of iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood* 86: 1185-1195.

WEN F., WHITE G. J., VANETTEN H. D., XIONG Z., HAWES M. C. (2009). Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection. *Plant Physiol*; 151:820-9.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2018). Epidemiological situation. Disponível em: [www.who.int/leishmaniasis/burden/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/). Acesso em: 2020.

WRIGHT, T. K., GIBSON, P. G., SIMPSON, J. L., MCDONALD, V. M., WOOD, L. G., & BAINES, K. J. (2016). Neutrophil extracellular traps are associated with inflammation in chronic airway disease. *Respirol*, 21: 467–475.

YIPP B. G., PETRI B., SALINA D., JENNE C. N., SCOTT B. N. V., ZBYTNUIK L. D., et al. (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med.*18:1386-93.

ZHANG X., ZHUCHENKO O., KUSPA A., SOLDATI T. (2016). Social amoeba trap and kill bacteria by casting DNA nets. *Nat. Commun.* 7:1-9.