

MARCELLE DA SILVA GONÇALVES

**CARACTERIZAÇÃO DAS REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS
INDUZIDAS PELO *Chikungunya***



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para 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
JULHO / 2023**

Trabalho realizado no Departamento de Imunologia do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob orientação do Professor Anderson Guimarães Baptista Costa e coorientação de Thayana Roberta F. de Mattos

FICHA CATALOGRAFICA**CIP - Catalogação na Publicação**

d635c da Silva Gonçalves, Marcelle
Caracterização das redes extracelulares de
neutrófilos induzidas pelo Chikungunya / Marcelle
da Silva Gonçalves. -- Rio de Janeiro, 2023.
81 f.

Orientador: Anderson Guimarães Baptista Costa.
Coorientadora: Thayana Roberta Ferreira de
Mattos.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. Chikungunya. 2. redes extracelulares. 3.
neutrófilos. I. Guimarães Baptista Costa, Anderson ,
orient. II. Ferreira de Mattos, Thayana Roberta,
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-7/6283.

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: Marcelle da Silva Gonçalves
DRE: 119115847

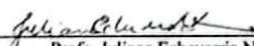
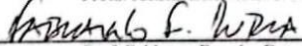
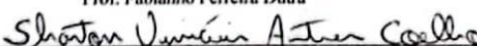
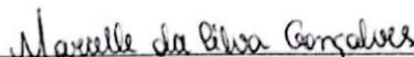
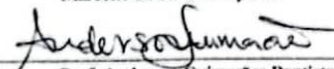
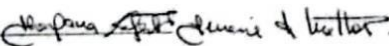
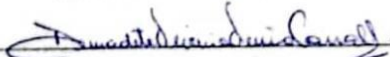
BANCA EXAMINADORA: Profa. Juliana Echevarria Neves de Lima (Presidente)
Prof. Fabianno Ferreira Dutra
Dr. Sharton Vinicius Antunes Coelho
Profa. Alessandra D Almeida Filardy (Suplente)

Título da Monografia: “Caracterização das redes extracelulares de neutrófilos induzidas por *Chikungunya*”

Local: Sala de aula da pós graduação E1-044 / IMPG / CCS / UFRJ
Data e hora de início: 13 de julho de 2023 às 14:00h

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 10 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, 13 de julho de 2023.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>10</u>	 _____ Profa. Juliana Echevarria Neves de Lima
<u>10,0</u>	 _____ Prof. Fabianno Ferreira Dutra
<u>10</u>	 _____ Dr. Sharton Vinicius Antunes Coelho
	_____ Profa. Alessandra D Almeida Filardy
Aluno:	 _____ Marcelle da Silva Gonçalves
Orientador:	 _____ Prof. Anderson Guimarães Baptista Costa Coorientador:  Dra. Thayana Roberta Ferreira de Mattos
Coordenador de TCC	 _____ Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Dedico este trabalho aos meus pais, meus irmãos e a minha tia de coração que sempre foram uma base de suporte e fé durante este percurso.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha família por todo o apoio durante todo o processo, e compreensão dos momentos que precisei estar ausente, em especial aos meus pais que sempre disseram que enquanto pudessem me ajudar eu sempre iria continuar estudando. Eu não estaria na UFRJ se não fosse por eles. A minha tia Isa, por sempre ter feito parte de todas as etapas da minha vida e incentivado as minhas mais loucas aspirações e projetos. Aos meus avós, que não estão mais aqui, mas continuam me apoiando de alguma forma. Ao meu avô José, antes de ser um sonho meu, era um sonho nosso.

Ao meu orientador Anderson Guimarães, por toda ajuda e apoio, principalmente nestes últimos meses e por toda paciência que teve comigo durante estes anos, sei que não foi uma tarefa fácil. Tenho certeza de que se não fosse por todo o ensinamento, discussões e correções, meu desenvolvimento não teria sido o mesmo.

A minha coorientadora Thayana Roberta, por todas as incontáveis horas que passamos juntas, por todo o auxílio durante os experimentos e as longas conversas aleatórias que tivemos durante os intervalos. Sei que falar sobre teorias loucas do universo não teria a mesma energia com outra pessoa. Mais que isso, agradeço por ter acreditado tanto em mim e ter sido uma grande amiga e fortaleza. À minha orientadora não oficial Janice, pelo tanto que me ensinou e esteve do meu lado durante toda a correria do dia a dia, nossos papos com certeza deixavam o dia mais leve e animado. À Alice, por todas as risadas, conversas sérias e ajuda que me deu.

Aos amigos que a UFRJ me proporcionou, Ana Clarisse, Taianne Poeta, Laenne Medeiros, Camilla Luiza e Marcos, nossos dias juntos de risadas, reclamações, discussões, a forma que sempre nos apoiamos e estivemos uns pelos outros para que ninguém desistisse são coisas que certamente sempre irei lembrar, sei que ter enfrentado uma pandemia e o ensino EAD não seria possível se meus amigos fossem outros. À todo pessoal do laboratório e aqueles que contribuíram direta ou indiretamente durante o processo

À UFRJ, professores do Instituto de Microbiologia, as agências de fomento CNPq e FAPERJ pelo suporte financeiro.

Muito Obrigada!

“Sometimes when you are in a dark place you think you've been buried, but you've actually been planted.”

Christine Caine

RESUMO**MARCELLE DA SILVA GONÇALVES****CARACTERIZAÇÃO DAS REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS
INDUZIDAS PELO *Chikungunya*****Orientador:** Anderson Guimarães Baptista Costa**Coorientadora:** Thayana Roberta F. de Mattos

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.

O vírus *Chikungunya* (CHIKV) é um arbovírus pertencente ao gênero Alphavirus e sua transmissão aos humanos ocorre principalmente pela picada do mosquito vetor *Aedes aegypti*. A infecção leva a manifestações clínicas como febre aguda, eritema, mialgia e poliartralgia potencialmente debilitante. No sítio de inoculação do CHIKV, as principais populações celulares infectadas são as células endoteliais, fibroblastos e os macrófagos. A resposta imunitária inata, após infecção por CHIKV, envolve a liberação de distintos mediadores inflamatórios e massivo infiltrado de células, como os neutrófilos. Diferentes estímulos podem provocar alterações morfológicas nos neutrófilos e tem como resultado a liberação da cromatina em associação às proteínas dos grânulos citoplasmáticos, em forma de redes extracelulares de neutrófilos (NETs). O papel destas estruturas é ambíguo, uma vez liberadas podem conter a infecção, eliminando diretamente o microrganismo ou limitando sua disseminação, ou gerar dano celular e agravar a infecção. A sinalização para liberação de NETs é complexa e varia de acordo com o estímulo. As implicações das NETs na infecção por CHIKV e as vias de sinalização envolvidas na liberação não estão completamente estabelecidas. Sendo assim, nos propomos a avaliar a liberação de redes extracelulares de neutrófilos humanos induzidas por CHIKV, bem como as vias de sinalização envolvidas no processo. Em nossos experimentos de indução de NETs, demonstramos que CHIKV foi eficiente na ativação de redes em neutrófilos humanos. A avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio apontou aumento induzido a partir de 3 horas de estímulo, o que poderia indicar um mecanismo dependente de ROS. As investigações sobre os intermediários de sinalização demonstraram que a inibição de PAD e elastase não resultaram na diminuição da liberação das NETs, contrastando com a inibição de PI3K e cálcio, que, preliminarmente, indicaram diminuições consideráveis. Nos ensaios de modulação de infecção, as NETs produzidas com PMA não apresentaram efeitos sobre a infecção em modelo de célula endotelial permissiva (HBMEC). Como conclusões, as vias que levam à liberação de NETs por CHIKV são independentes de PAD e elastase, mas podem indicar envolvimento de ROS, ativação de PI3K, gasdermina D e cálcio. Além disso, as NETs de neutrófilos humanos não limitam a infecção por CHIKV em células permissivas.

Palavras-chave: *Chikungunya*; redes extracelulares; neutrófilos

ABSTRACT**MARCELLE DA SILVA GONÇALVES****CARACTERIZAÇÃO DAS REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS
INDUZIDAS PELO *Chikungunya*****Orientador:** Anderson Guimaraes Baptista Costa**Coorientadora:** Thayana Roberta F. de Mattos

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.

Chikungunya virus (CHIKV) is an arbovirus belonging to the Alphavirus genus, primarily transmitted to humans through the bite of the *Aedes aegypti* mosquito vector. The infection leads to clinical manifestations such as acute fever, erythema, myalgia, and potentially debilitating polyarthralgia. At the site of CHIKV inoculation, the main infected cell populations are endothelial cells, fibroblasts, and macrophages. The innate immune response following CHIKV infection involves the release of distinct inflammatory mediators and a massive cellular infiltrate, including neutrophils. Various stimuli can induce morphological changes in neutrophils, resulting in the release of chromatin associated with proteins from cytoplasmic granules in the form of neutrophil extracellular traps (NETs). The role of these structures is ambiguous, as their release can either contain the infection by directly eliminating the microorganism or limit its dissemination, or it can generate cellular damage and worsen the infection. The signaling for NET release is complex and varies depending on the stimulus. The implications of NETs in CHIKV infection and the signaling pathways involved in their release are not fully established. Therefore, we aim to evaluate the release of CHIKV-induced neutrophil extracellular traps in human neutrophils, as well as the signaling pathways involved in this process. In our NET induction experiments, we demonstrated that CHIKV efficiently activated NETs in human neutrophils. Evaluation of reactive oxygen species production showed an increase after 3 hours of stimulation, suggesting a ROS-dependent mechanism. Investigations into signaling intermediates revealed that inhibition of PAD and elastase did not result in a decrease in NET release, in contrast to the inhibition of PI3K and calcium, which preliminarily indicated considerable decreases. In infection modulation assays, NETs produced with PMA did not have any effects on infection in a permissive endothelial cell model (HBMEC). In conclusion, the pathways leading to CHIKV-induced NET release are independent of PAD and elastase but may involve ROS, PI3K activation, gasdermin D and calcium. Furthermore, human neutrophil NETs do not limit CHIKV infection in permissive cells.

Keywords: *Chikungunya*; extracellular traps; neutrophils.

RESUMO PARA LEIGOS

MARCELLE DA SILVA GONÇALVES

CARACTERIZAÇÃO DAS REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS

INDUZIDAS PELO *Chikungunya*

Orientador: Anderson Guimaraes Baptista Costa

Coorientadora: Thayana Roberta F. de Mattos

Resumo para leigos 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.

O vírus *Chikungunya* é transmitido após a picada do mosquito *Aedes aegypti*. Nosso corpo é protegido diariamente por centenas de células chamadas de neutrófilos. Assim que um agente estranho, como os vírus, que podem causar uma doença, entram no nosso corpo, milhares de neutrófilos são chamados para combatê-los. Como forma de defesa, os neutrófilos podem liberar armadilhas em forma de redes (como uma rede de pesca) que impedem que o vírus se espalhe. Estas armadilhas são montadas no interior da célula por diversos pequenos sinais que vão aos poucos alterando a forma do neutrófilo; essa alteração chega a tal ponto que o neutrófilo morre e libera as redes em resposta ao vírus. A boa notícia é que tudo isso pode eliminar o vírus, a má é que se não for controlada nosso organismo pode ser afetado. Estas redes não são as mesmas sempre, isso significa que, se outro vírus invadir nosso corpo, outras armadilhas serão montadas para impedi-lo, por exemplo, as redes que prendem o vírus da *Dengue*, podem não prender o vírus *Chikungunya*. Por conta desta diferença, este trabalho teve por objetivo investigar se o vírus *Chikungunya* pode induzir a formação destas redes em neutrófilos purificados de sangue humano de pessoas saudáveis, e avaliar quais eram estes sinais no interior do neutrófilo que participavam do processo. Os resultados mostraram que antes de formar as redes, espécies tóxicas de oxigênio são produzidas. Os sinais para as redes serem liberadas não possuem a participação de duas proteínas chamadas PAD e elastase, mas os sinais da enzima PI3K, gasdermina D e cálcio podem ter alguma função. Além disso, o vírus *Chikungunya* não foi preso na armadilha dos neutrófilos. Mais estudos são necessários para entender como o vírus é capaz de levar a liberação às redes e no impacto sobre a infecção.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema da distribuição Mundial de CHIKV
- Figura 2**- Vetores competentes para transmissão de CHIKV
- Figura 3**- Estrutura do vírus e organização genômica
- Figura 4**- Esquema do ciclo de replicação
- Figura 5**- Ilustração das diferenças dos infiltrados celulares nas fases crônica e aguda
- Figura 6**- Processo de rolamento, adesão e transmigração de neutrófilos
- Figura 7**- Ilustração do complexo NADPH oxidase
- Figura 8**- Esquema do processo de degranulação
- Figura 9**- Representação das redes extracelulares
- Figura 10**- Alterações da cromatina durante a liberação de redes extracelulares
- Figura 11**- Esquema representativo de vias de formação de NETs
- Figura 12**- Esquema ilustrativo da metodologia empregada no ensaio de plaque
- Figura 13**- Produção do vírus *Chikungunya* em células C6/36
- Figura 14**- Produção do vírus *Chikungunya* em células Vero
- Figura 15**- *Chikungunya* induz a liberação de NETs em neutrófilos humanos
- Figura 16**- Produção de ROS em neutrófilos humanos estimulados com *Chikungunya*
- Figura 17**- A sinalização da PI3K e do cálcio na liberação das NETs induzidas por *Chikungunya*.
- Figura 18**- O papel das PADs gasdermina e da elastase na liberação das NETs induzidas por *Chikungunya*
- Figura 19**- Caracterização da infecção pelo vírus *Chikungunya* em diferentes tipos celulares
- Figura 20**- As NETs na infecção das células HBMEC pelo vírus *Chikungunya*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Alguns componentes presentes nas NETs e suas funções

Tabela 2- Linhagens celulares e meios de cultura utilizados nos experimentos

Tabela 3- Estoques do CHIKV produzido e utilizado nos experimentos

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
RESUMO PARA LEIGOS.....	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
2 INTRODUÇÃO.....	13
2.1 O vírus Chikungunya:.....	13
2.1.1 Histórico	13
2.1.2 Vetores e transmissão	15
2.1.3 Estrutura viral	17
2.1.4 Replicação viral	19
2.2 Resposta imunitária e imunopatologia	21
2.3 Neutrófilos	24
2.4 Mecanismos efetores dos neutrófilos	27
2.5 Redes extracelulares de neutrófilos	30
2.6 Mecanismos envolvidos na formação das NETs	34
2.6.1 Vias de sinalização	36
2.7 As redes em resposta a vírus.....	39
3 JUSTIFICATIVA	41

4	OBJETIVOS.....	42
4.1	OBJETIVO GERAL.....	42
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
5	MATERIAIS E MÉTODO:.....	43
5.1	Animais.....	43
5.2	Purificação de células derivadas de medula óssea de camundongos.....	43
5.3	Diferenciação de células mononucleares em macrófagos murinos	43
5.4	Linhagens celulares	44
5.5	Purificação de PBMCs humanos e diferenciação em macrófagos	46
5.6	Purificação de neutrófilos humanos	46
5.7	Propagação do vírus <i>Chikungunya</i>	47
5.8	Ensaio com inibidores de NETs	48
5.9	Ensaio de infecção com o vírus <i>Chikungunya</i> em macrófagos, monócitos e células endoteliais.....	48
5.10	Ensaio das NETs na replicação do CHIKV.....	49
5.11	Dosagem de DNA.....	49
5.12	Análise de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	49
5.13	Imunofluorescência	50
5.14	Ensaio de viabilidade celular	50
5.15	Ensaio de Plaque.....	51
5.16	Análise Estatística	52

6	RESULTADOS	53
6.1	Linhagens C6/36 e Vero na produção de <i>Chikungunya</i>	53
6.2	O vírus <i>Chikungunya</i> induz liberação de NETs em neutrófilos humanos.....	55
6.3	ROS é induzido tardiamente por CHIKV em neutrófilos humanos	56
6.4	A PI3K e o cálcio na liberação das NETs estimuladas por CHIKV.....	57
6.5	As PADs, a elastase neutrofílica e a gasdermina D nas NETs induzidas por CHIKV.....	58
6.6	O vírus <i>Chikungunya</i> infecta linhagem de células endoteliais humana	59
6.7	As NETs na infecção da HBMEC pelo CHIKV	60
7	DISCUSSÃO.....	622
8	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 O vírus *Chikungunya*:

1.1.1 Histórico

Entre 1952 e 1953, no planalto Makonde, região da atual Tanzânia (Tanganyika), o primeiro surto de *Chikungunya* foi reportado alcançando aproximadamente 40% dos vilarejos locais. Aqueles que eram afetados manifestavam fortes dores articulares de início abrupto, febre intensa e, em certos casos, erupções cutâneas (Ross, 1956; Vu *et al.*, 2017). Foi nesta região que o termo *Chikungunya* foi introduzido, derivado de *kungunyala* um verbo do dialeto local que significa “aquilo que se curva” (do inglês *That which bends up*), enfatizando a postura corporal dos doentes acometidos com as fortes dores (Sudeep e Parashar, 2008). Com as técnicas de isolamento da época, as amostras obtidas de humanos foram utilizadas para desvendar o agente causador da epidemia, os resultados dos testes atribuíram ao mesmo uma íntima correlação com os vírus *Mayaro (MAYV)* e *Semliki Forest (SFV)* (Powers e Logue, 2007). Após este primeiro surto documentado, outros se seguiram de maneira esporádica em países da África e Ásia, mais especificamente, a doença pelo vírus *Chikungunya* foi marcada por períodos longos de inativação seguida por epidemias súbitas. A exemplo disso, destaca-se o grave surto que ocorreu em 2005 na Índia depois de um intervalo de 32 anos (Ganesan *et al.*, 2017; Mourad *et al.*, 2022). Neste mesmo ano, uma nova epidemia de desenrolar atípico afetou a ilha de La Réunion, dentre os quase 255.000 indivíduos afetados, altos índices de mortalidade (~48%) foram noticiados. Além disso, devido aos quadros observados nos pacientes, este foi o primeiro surto que levantou associações sobre um possível tropismo do vírus *Chikungunya* com o sistema nervoso, tecido hepático e cardíaco (Lemant *et al.*, 2008).

A inserção nas Américas ocorreu apenas em 2013, nas ilhas de St. Martin. Após esta entrada o vírus se espalhou por diversos países de tal forma que um ano após a introdução, aproximadamente 1 milhão de casos da doença foram registrados no continente (Pan American Health Organization - PAHO). Já no Brasil, os primeiros casos autóctones do vírus foram reportados em setembro de 2014, em Oiapoque (Amapá) e em Feira de Santana (Salvador-Bahia), com transmissões acontecendo em regiões altamente conectadas do Norte e Nordeste (Nunes *et al.*, 2015). Estimativas mais recentes sobre o contexto epidemiológico foram emitidas em março de 2023. Segundo documento oficial, houve um aumento relativo de 109,6% dos casos de *Chikungunya* em relação ao mesmo período de 2022 (incidência de 16,7/100.000

habitantes), no qual o Rio de Janeiro está entre os estados com notificações de casos da doença (PAHO/WHO, 2023).

Apesar do espalhamento do vírus para diversos continentes, as áreas classificadas como endêmicas, que representam alto risco de transmissão do vírus, incluem países da África, Ásia e Américas (Figura 1) (Mourad *et al.*, 2022). A extensão de surtos de CHIKV pode contribuir para a emergência de novas linhagens, atualmente estão caracterizadas: Oeste Africana (WA), Centro-Leste África do Sul (ECSA), linhagem Oceano Índico (IOL) e linhagem asiática. (Bartholomeeusen *et al.*, 2023).

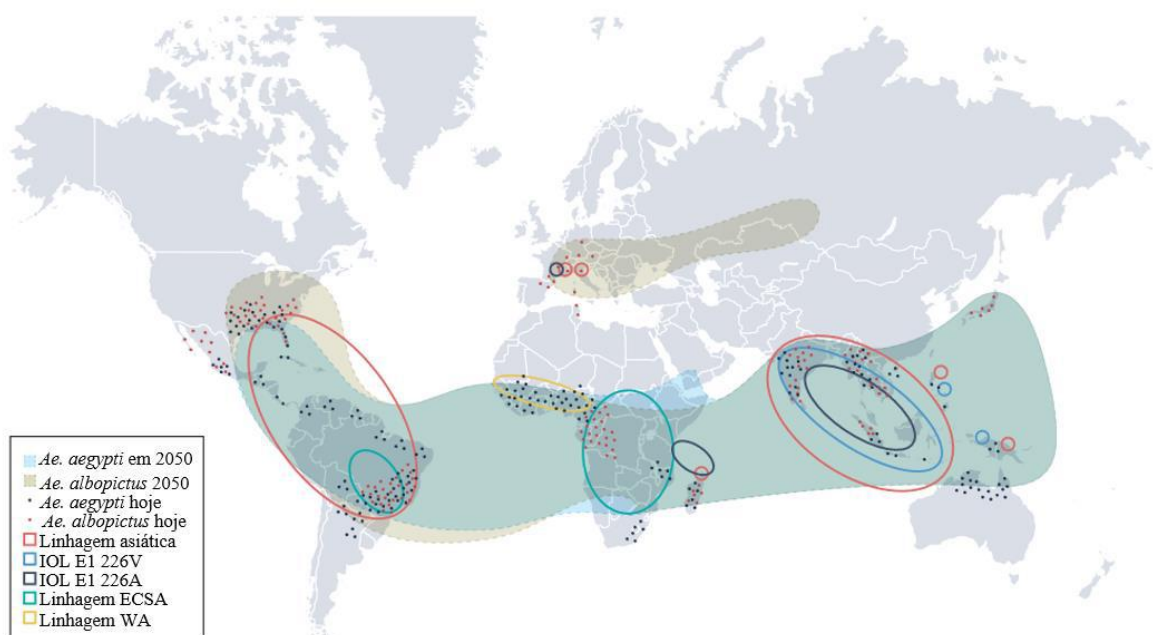


Figura 1- Esquema da distribuição Mundial de CHIKV. CHIKV possui locais com alto risco de transmissibilidade. Dentre os pontos endêmicos há destaque para as regiões de clima subtropical nas Américas, África e Ásia. Uma estimativa feita para até 2050, representada acima por áreas coloridas de azul e verde, prediz o potencial espalhamento dos vetores *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Adaptado de Bartholomeeusen *et al.*, 2023.

A doença causada pelo vírus, conhecida como febre Chikungunya (CHIKF) é um problema de saúde pública com impacto significativo na qualidade de vida, contribuindo com perdas econômicas nos setores da saúde pública e economia nacional (Costa *et al.*, 2023). No Brasil, os sintomas de CHIKF são responsáveis pela limitação de atividades rotineiras por um longo período ou de forma permanente, com altos índices de DALYs (anos de vida ajustados por incapacidade), sendo YLLs (anos de vida perdidos) correspondendo a 10% do total de DALY (Vidal *et al.*, 2021). Inúmeros fatores estão correlacionados com o rápido espalhamento do vírus e o impacto em escala mundial. Dentre eles podemos citar características territoriais e climáticas, baixos índices socioeconômicos da população, as mutações de linhagens do vírus e

seu alcance a populações susceptíveis do ponto de vista imunológico e as alterações mundiais na distribuição de espécies de vetores (Figura 1) (Silva e Dermody, 2017; Rueda *et al.*, 2019; Power *et al.*, 2022; Laporta *et al.*, 2023)

1.1.2 Vetores e transmissão

Os arbovírus (*arthropod-borne virus*) são espécies virais diversas com amplo espalhamento mundial transmitidas por vetores artrópodes, como mosquitos e carrapatos, que representam grandes desafios para a saúde pública (Viglietta *et al.*, 2021). Os vírus *Chikungunya* (*CHIKV*), *Dengue* (*DENV*) e *Zika* (*ZIKV*), que possuem como principal vetor mosquitos *Aedes spp.*, são exemplos de arbovírus (Gould *et al.*, 2017; Lwande *et al.*, 2020). No que diz respeito aos hábitos alimentares, as fêmeas adultas de mosquitos do gênero *Aedes* são hematófagas. O sangue adquirido possui componentes essenciais para produção e maturação dos ovos durante a ovogênese. Quanto à fonte do sangue, algumas espécies possuem predileções: enquanto fêmeas de *Aedes albopictus* alimentam-se indiscriminadamente entre humanos e animais, fêmeas de *Aedes aegypti* parecem restritas ao sangue humano (Madewell. 2020). Ademais, as fêmeas possuem comportamento endófilo, são altamente endofágicas e antropofílicas, características que contribuem para capacidade vetorial (Weaver *et al.*, 2020).

Fêmeas de mosquitos *Aedes spp.* adquirem partículas virais durante o repasto sanguíneo em hospedeiros virêmicos. Os vírus que adentram o organismo do mosquito vetor devem ser capazes de transpor de forma eficiente barreiras presentes no intestino médio e na glândula salivar (Tabachnick, 2013), dentre elas, destacam-se: (i) a matriz produzida e liberada pelas células epiteliais do intestino durante a digestão, que desempenha papel de prevenção ao acesso do vírion às células epiteliais (Lim *et al.*, 2018), e (ii) a própria microbiota do inseto. Contudo, para além da interação arbovírus-microbioma-vetor, outros mecanismos como a supressão de enzimas digestivas, liberação de moléculas antipatogênicas etc., ocorrem paralelamente e podem atuar diretamente estimulando um organismo competente para manutenção viral ou susceptibilidade ao vírus (Figura 2) (Gómez *et al.*, 2022). Aqueles considerados vetores competentes são munidos da capacidade de serem infectados, replicarem e transmitirem o vírus eficientemente aos hospedeiros suscetíveis, sustentando altos níveis de proliferação sem sofrer com a infecção (Tabachnick, 2013).

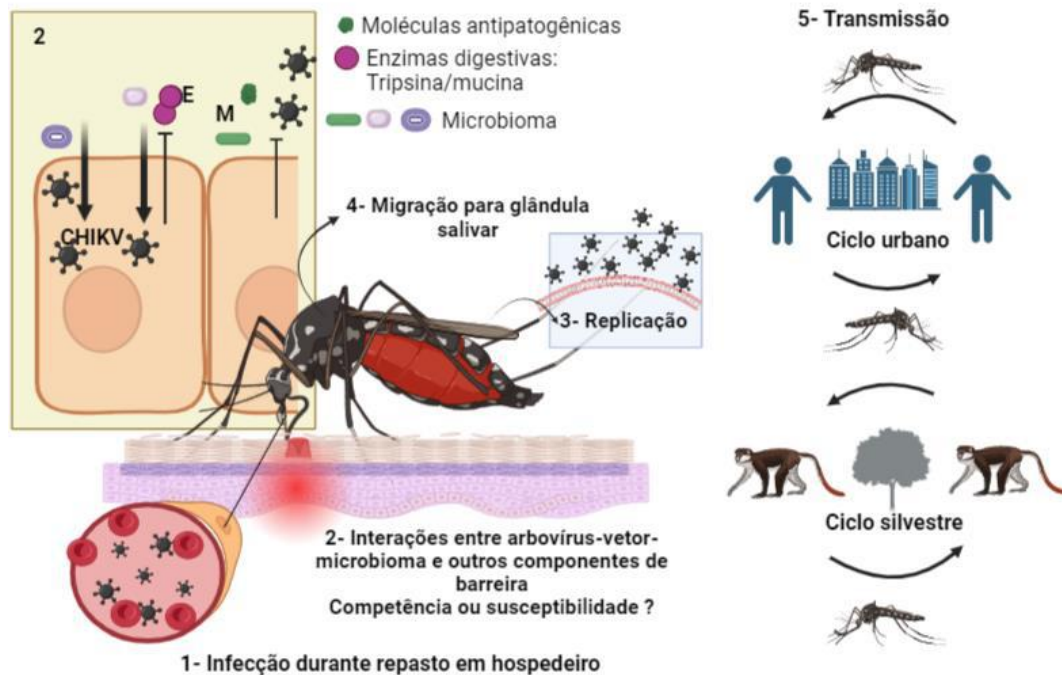


Figura 2- Vetores competentes para transmissão de CHIKV. Em um ciclo de transmissão os 1- Insetos hematófagos fêmeas de *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus* adquirem partículas virais durante o repasto sanguíneo em hospedeiros virêmicos, 2- o vírus no inseto vetor competente interage com a microbiota e passa por barreiras no intestino médio e das glândulas salivares, 3- em vetores competentes ocorre a replicação eficiente do vírus, 4- a migração das partículas virais do intestino para a glândula salivar, 5- no ciclo urbano (homem-vetor-homem) as fêmeas infectadas transmitem partículas virais para hospedeiros saudáveis durante novo repasto sanguíneo. **Produzido em BioRender.com**

A transmissão de espécies de arbovírus no contexto geral pode ocorrer por intermédio de três principais mecanismos: O primeiro diz respeito à transmissão promovida por vetores entre animais como macacos e aves (ciclo silvestre e enzoótico), podendo alcançar esporadicamente um hospedeiro humano; o segundo mecanismo engloba a transmissão após amplificação em animais domesticados (ciclo epizoótico) e o terceiro onde os insetos vetores transmitem o vírus entre hospedeiros humanos (ciclo urbano e epidêmico) (Tsetsarkin *et al.*, 2013; Weaver *et al.*, 2018). A manutenção de CHIKV na natureza se dá principalmente através dos ciclos silvestre e urbano. O ciclo silvestre, relatado principalmente no continente africano, ocorre em áreas rurais, florestais ou de proximidade e está envolvido com surtos de baixa magnitude (Paul e Sadanand, 2018). Já o ciclo urbano (homem-mosquito-homem) associa-se com grandes epidemias de CHIKV, inicialmente descritas na Ásia, onde o principal vetor envolvido na transmissão é o *Aedes aegypti*. Devido a mutações ocorridas em CHIKV, a espécie amplamente distribuída mundialmente *Aedes albopictus* tornou-se competente para transmissão (Constant *et al.*, 2021). Embora *Aedes aegypti* seja o principal vetor para o vírus *Chikungunya*, interações entre os vetores e o vírus parecem diferir a depender da área geográfica, logo este título de

principal vetor pode ser potencialmente transferido para *Aedes albopictus* em certas áreas (Honório *et al.*, 2018).

Ao ultrapassar as barreiras descritas acima, na glândula salivar, a transposição do epitélio associado e deposição na saliva formam a última fase para transmissão efetiva a novos hospedeiros. CHIKV é detectado na saliva já nos primeiros 4 dias após infecção das fêmeas (Vega-Rua *et al.*, 2015; Lim *et al.*, 2018). Com quantidades suficientes de vírus presente na saliva, as fêmeas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* infectadas podem transmitir o vírus em um novo repasto sanguíneo através da deposição de partículas virais na pele e/ou corrente sanguínea do hospedeiro (Matusali *et al.*, 2019).

1.1.3 Estrutura viral

O vírus Chikungunya pertence ao gênero *Alphavirus* e a família *Togaviridae* (Ahola *et al.*, 2021). Seu material genético é constituído de RNA fita simples positiva (fsRNA+) o que o categoriza no grupo IV da classificação de Baltimore (Baltimore, 1971). O genoma de CHIKV possui aproximadamente 11,8 Kb, codificando dois quadros abertos de leitura (**Open Reading Frame**, sigla ORF) flanqueados por regiões não traduzíveis (Khan *et al.*, 2002; Tsetsarkin *et al.*, 2011). As proteínas não estruturais são codificadas pela ORF1 na região 5' CAP e traduzidas a partir do RNA genômico, enquanto as proteínas estruturais do vírus são codificadas pela ORF2 na região 3' poli A e traduzidas a partir do RNA subgenômico (Figura 3) (Galán-Huerta, 2015). A partícula viral é esférica, com nucleocapsídeo possuindo morfologia icosaédrica, apresenta um envelope lipídico com glicoproteínas virais E1 e E2 organizadas como trímeros e E3 na periferia (Figura 3) (Peinado *et al.*, 2022). As ORFs 1 e 2 presentes no RNA de CHIKV codificam 4 percursos de proteínas não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3 e NSP4) e 6 de proteínas estruturais, respectivamente: capsídeo (C), proteínas do envelope (E1, E2 e E3), 6k e TF (do inglês *Transframe*) (Khongwichit *et al.*, 2021). As proteínas não estruturais, codificadas pela ORF presente na região 5' do RNA viral, compreendem 2/3 do genoma e são necessárias em processos de transcrição, tradução do RNA viral e clivagem poliproteica ou na evasão às respostas imunitárias antivirais (Figura 3) (Jose; Snyder e Kuhn, 2009; Kumar *et al.*, 2022).

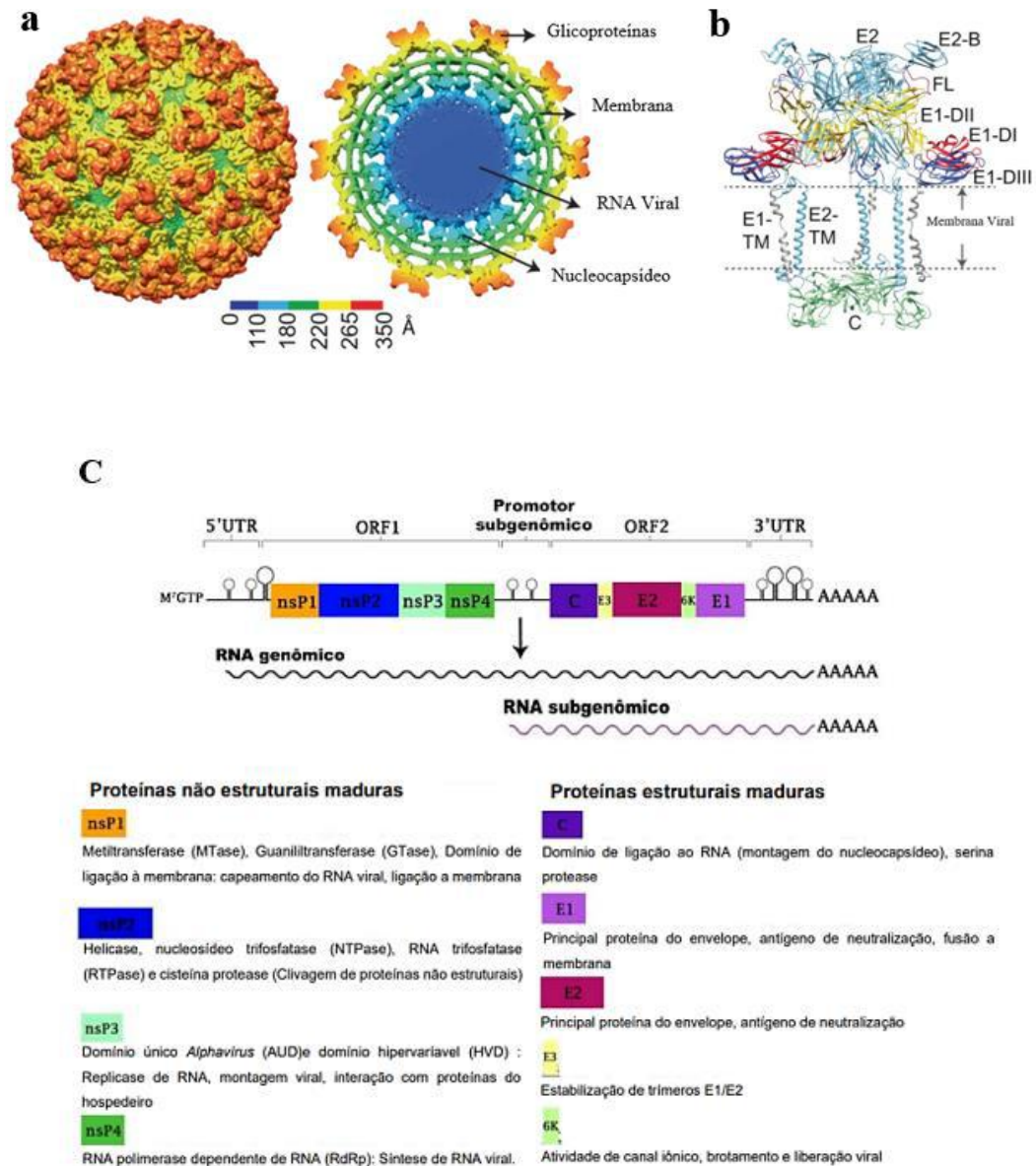


Figura 3- Estrutura do vírus e organização genômica. Imagens de microscopia eletrônica criogênica em que as cores representam a medida do raio, em **A**, uma visão da superfície da partícula (esquerda) e um corte transversal (direita), com setas indicando a membrana, nucleocapsídeo, glicoproteínas de superfície e RNA viral **B**, o heterodímero das glicoproteínas do envelope em contato com as proteínas do capsídeo. **C**, RNA fita simples positivo de ~11,8 kb apresenta regiões 5'CAP e 3'poliA. Dois quadros de leitura (ORF), onde a ORF1 codifica as proteínas não estruturais (nsP1-4) a partir do RNA genômico e a ORF2 as proteínas estruturais (C, E1, E2, E3, 6K e TF) a partir do RNA subgenômico, sendo esta tradução regulada por um promotor subgenômico. E- Glicoproteínas do envelope, C- capsídeo, TM- proteína transmembrana. **Adaptado de Prasad *et al*, Hakim e Aman, 2022**

1.1.4 Replicação viral

As proteínas do envelope viral E1/E2 são as principais responsáveis pelo início do ciclo de replicação na célula alvo susceptível e permissiva, já que são importantes para a interação com receptores de entrada. A ligação promovida por E2 a moléculas de superfície celular principia o processo de internalização por endocitose mediada por clatrina (De Lima-Cavalcanti *et al.*, 2022). Especula-se a respeito dos componentes que exercem este papel de receptor para adsorção de CHIKV. As mais diversas classes de moléculas são candidatas para esta função em mamíferos, dentre elas: Proibitina (Wintachai *et al.*, 2012); receptor de fosfatidilserina TIM-I (Moller-Tank *et al.*, 2013; Kirui *et al.*, 2021); MXRA8 (Zhang *et al.*, 2018; Basore *et al.*, 2019), DC-SIGN (Long *et al.*, 2013), glicosaminoglicanos (GAGs) e outras moléculas pertencentes ao complexo proteico CD147 (De Lima-Cavalcanti *et al.*, 2022).

Já na via endossômica, alterações irreversíveis no arranjo conformacional das proteínas E1-E2 ocorrem em decorrência do pH ácido do ambiente endossomal culminando na dissociação de E1-E2 e remoção de estruturas que recobrem o domínio de fusão. Homotrímeros de E1 então propiciam a fusão do envelope com a membrana endossomal e consequente liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular (Voss *et al.*, 2010). Esta exposição antecede o desnudamento e a tradução das proteínas não estruturais a partir do RNA genômico. A tradução inicial, ainda no citoplasma, imediatamente gera os precursores nsP123 e nsP1234 que sofrem clivagem por nsP2 nas junções nsP3/nsP4 (junção 3/4) formando P123 + nsP4, esta nsP4 livre ativa função de RNA polimerase (Kril *et al.*, 2021).

A síntese do genoma de *CHIKV* é realizada em componentes vesiculares denominados esférulas, local que reúne os elementos necessários para replicação em associação com a membrana (Figura 4). A biogênese destas estruturas parece requerer ação das proteínas não estruturais e a presença de um molde de RNA (Elmasri; Nasal e Jose, 2021; Reis *et al.*; Tan *et al.*, 2022). Em associação com as esférulas, o complexo de replicação formado pelos precursores parcialmente clivados nsP123 + nsP4 e as proteínas do hospedeiro é de curta duração e estão envolvidos na síntese do intermediário de RNA fita simples negativa (Solignat *et al.*, 2009; Rupp *et al.*, 2015; Laurent *et al.*, 2022). Esta compartimentalização é importante para replicação do genoma viral por evitar a detecção do intermediário de fita dupla de RNA pelos receptores de reconhecimento de padrão citosólicos (Silva e Dermody, 2017; Constant *et al.*, 2021). Com a progressão da infecção, as esférulas são internalizadas formando compartimentos que contém marcadores endossomais e lisossomais denominados vacúolos citopáticos do tipo

I (Reis *et al.*, 2022). O acúmulo de P123 e a ação de protease de nsP2 leva à clivagem total dos precursores e individualização das proteínas não estruturais (nsP1-nsP2-nsP3-nsP4); este evento resulta na troca de função de replicase para transcriptase e na geração e amplificação do RNA genômico e subgenômico 26S utilizando a fita de RNA negativo como molde (Figura 4) (Ahola e Merits, 2016; Silva e Dermody, 2017; Kril *et al.*, 2021).

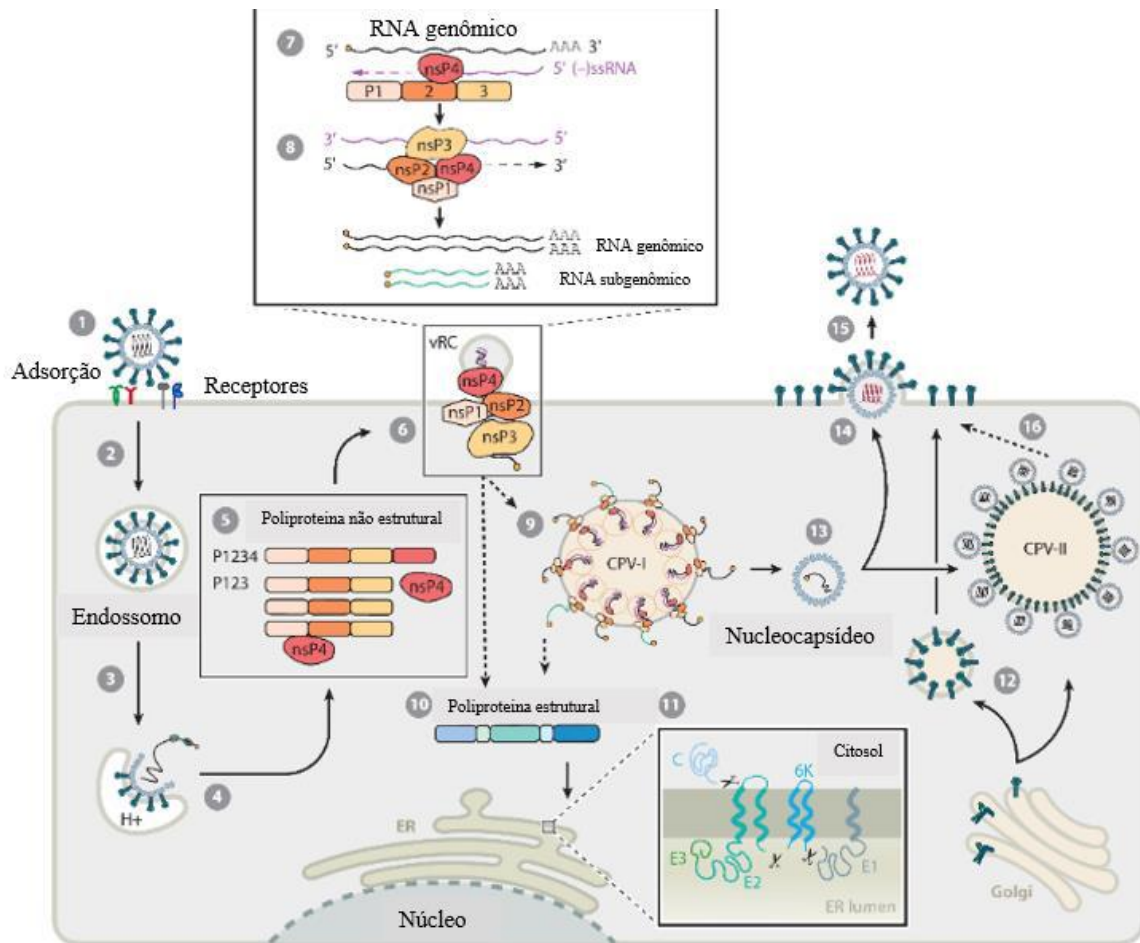


Figura 4- Esquema do ciclo de replicação. Inicialmente ocorre a interação com receptores da célula hospedeira (1), o vírus é endocitado em um sistema dependente de clatrina (2), o pH ácido na via endossomal promove a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo (3). Após fusão, o ocorre o desnudamento (4) e o RNA genômico rapidamente traduz os precursores das proteínas não estruturais, (5) a clivagem dos precursores por nsP2 e liberação de nsP4 formam o complexo de replicação viral (vRC). A síntese dos intermediários de RNA ocorre em compartimentos associados a membrana (esférulas). (6-7) Locais de síntese de RNA genômico e subgenômico. (8) Tendo o RNA como molde, em fases tardias de infecção, formam-se os vacúolos citopáticos do tipo I (9). A partir do RNA subgenômico há produção do precursor de proteínas estruturais (10). Precursores de proteínas do envelope são processados no retículo (11) e transportados através do complexo de Golgi (12); o nucleocapsídeo é formado no citoplasma (13) e encaminhado para a membrana para montagem da partícula (14) ou de forma alternativa recrutado para o vacúolo citopático do tipo II (16). Com a montagem, o vírus é liberado por brotamento (15). Adaptado: Kril *et al.*, 2021

A tradução do RNA subgenômico 26S produz as poliproteínas precursoras C-pE2-6K-E1 ou E3-E2-TF e, dos eventuais processamentos destes precursores, as proteínas estruturais maduras. A proteína do capsídeo por autoproteólise é liberada do precursor e os constituintes remanescentes pE2-6K-E1 são encaminhados e promovem fusão com o retículo endoplasmático, local de processamento de pE2 e E1 (Chevillon *et al.*, 2008). Os heterodímeros formados por pE2 e E1 são transportados através do complexo de golgi para a membrana plasmática. Durante o encaminhamento, E2 e E3 maduros são processados pela ação de proteases celulares sobre pE2 (Chevillon *et al.*, 2008; Abdelnabi; Neyts e Delang, 2015). As proteínas do capsídeo que interagem transitariamente com os ribossomos formam um complexo com o RNA genômico recém-sintetizado (Garoff; Sjoberg e Cheng, 2004). O nucleocapsídeo formado e as proteínas do envelope direcionadas à membrana interagem promovendo a montagem da partícula viral. Por fim, ocorre a liberação da partícula para o meio extracelular através do brotamento, processo que promove a obtenção do envelope lipídico por *CHIKV* (Figura 4) (Jose, Snyder e Kuhn, 2009; Galán-Huerta *et al.*, 2015).

1.2 Resposta imunitária e imunopatologia

Após a picada do artrópode vetor infectado, as partículas virais inoculadas na pele e corrente sanguínea do hospedeiro causam alta viremia em sítios periféricos e rápida disseminação para distintos órgãos, incluindo fígado, articulações, músculo, baço e, em casos atípicos, o tecido cerebral (Matusali *et al.*, 2019). Seguidamente à infecção decorre-se um período de incubação de 2-10 dias até o aparecimento dos sintomas da doença, subdividida em fases aguda e crônica (Figura 5). A fase aguda compreende as duas primeiras semanas pós início dos sintomas. Neste período, as manifestações mais comuns são febre alta de início súbito, calafrios, dores intensas nos músculos e articulações, fraqueza, erupções cutâneas e cefaleia. Neste momento, são observadas alta carga viral, linfopenia e moderada trombocitopenia (Tanabe *et al.*, 2018). Surpreendentemente, a carga viral detectada no sangue pode alcançar 10^8 PFU/ml de sangue (Schwartz e Albert, 2010). Em alguns casos os sintomas podem evoluir para uma fase crônica, ainda não bem estabelecida, com manutenção do quadro de artralgia, potencialmente incapacitante, e outros sinais, como erupções cutâneas e desordens cognitivas. Um estudo investigativo realizado em 2013 demonstrou a persistência de artralgia em mais de um sítio articular, recidiva ou incessante após 36 meses do início dos sintomas (Schwartz e Albert; Hoarau *et al.*, 2010; Schilte *et al.*, 2013; Tanabe *et al.*, 2018; Watson *et al.*; Noor *et al.*, 2020; O'Driscoll *et al.*, 2021).

As primeiras células a serem infectadas encontram-se presentes no local da picada (Figura 5). Essa replicação inicial contribui diretamente para o rápido aumento dos títulos virais. Dentre as células susceptíveis neste ambiente, destacam-se as células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos e os melanócitos (Wichit *et al.*, 2017; Matusali *et al.*, 2019). Macrófagos residentes também estão citados como alvos de *CHIKV*, aparentemente, essas células são consideradas reservatórios do vírus principalmente na fase crônica da doença. A infecção de macrófagos e de fibroblastos dermais antecede o espalhamento para os linfonodos e, mais tardiamente, via corrente sanguínea, para os músculos e articulações (Tanabe *et al.*, 2018).

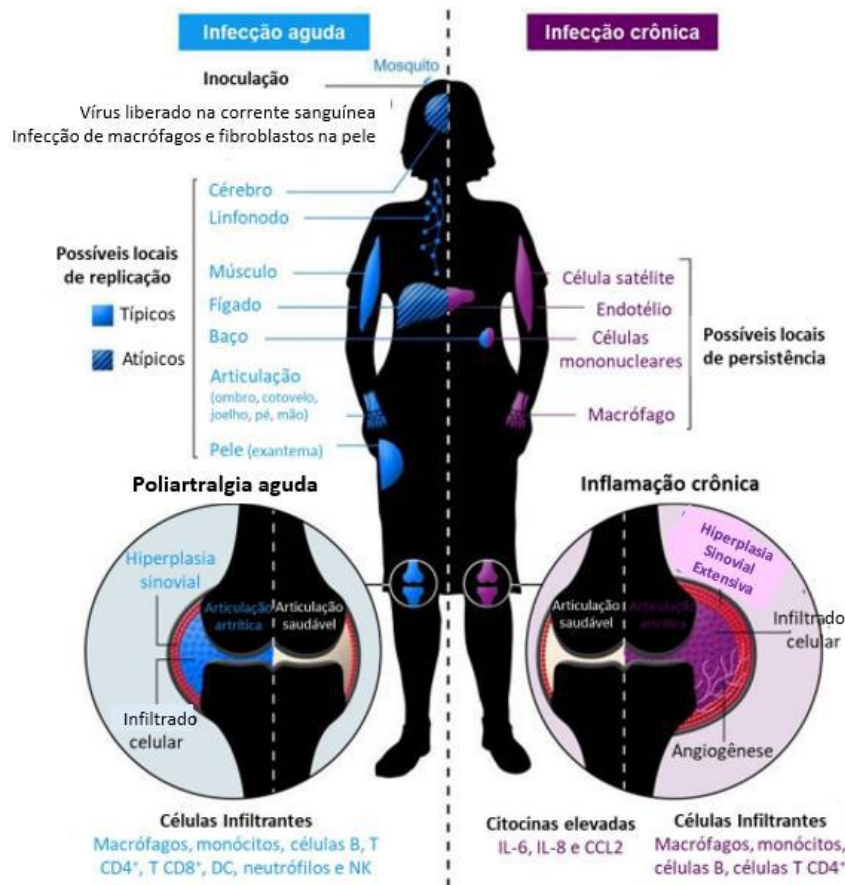


Figura 5 - Ilustração das diferenças nos infiltrados celulares nas fases aguda e crônica. Após a picada, o vírus pode ser liberado na corrente sanguínea ou infectar as células do microambiente, como os fibroblastos. A disseminação pela corrente sanguínea, vasos linfáticos ou por intermédio de células circulantes pode ocorrer para sítios típicos ou atípicos. No quadro agudo, com destacada poliartralgia, as principais células da resposta inata recrutadas para as articulações são os neutrófilos, monócitos e macrófagos. Já no quadro crônico da doença, as articulações sofrem com hiperplasia extensiva. Neste quadro, o vírus pode persistir em diferentes tipos celulares, sendo as células comumente recrutadas os monócitos e os macrófagos. Adaptado de Silva e Dermody, 2017

A detecção do genoma viral ou do intermediário de fita dupla por receptores do tipo *Toll* (TLR7, TLR8, TLR3) e do tipo RIG-I (RIG-I, MDA5) desencadeia ativação downstream de moléculas adaptadoras (MYD88, TRIF, MAVs) e consequente indução da expressão de

interferon do tipo I (IFN alfa/beta) (Fox e Diamond, 2016; Traverse *et al.*, 2022). Além da indução de interferon, células infectadas liberam quimiocinas e outras citocinas como MCP-1, G-CSF e GM-CSF. De fato, em pacientes com CHIKD (doença associada ao vírus) e em modelos murinos submetidos à infecção há a detecção de altos níveis de mediadores IL-6, IL-5, IL-10, IL-15, IL-1 β , CXCL9, CXCL10, TNF, FGF-básico e VEGF que promovem o recrutamento massivo de neutrófilos, monócitos, eosinófilos, basófilos e células dendríticas (Constant *et al.*, 2021). O papel das células do sistema adaptativo é influenciado por esta forte indução de citocinas e funções efetoras da resposta imunitária inata, com pico inicial de linfócitos TCD8⁺ e, em fases mais tardias uma função superior da modulação do curso da infecção por linfócitos TCD4⁺ (Wauquier *et al.*, 2010; Teo *et al.*, 2013; Fox e Diamond, 2016). Em condições ideais de ativação, os linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e células B são pontos chave para a imunidade protetora contra o vírus por sua capacidade de eliminação/indução de morte de células infectadas e geração de anticorpos neutralizantes específicos contra o vírus (Gasque *et al.*, 2015).

Intrigantemente, muitos destes fatores da imunidade inata e adaptativa, que proporcionam a proteção, resolução do processo infeccioso e o retorno da homeostase tecidual, também exercem efeito no estabelecimento da imunopatologia (Suhrbier, 2019). Exemplificando a afirmação anterior, o recrutamento massivo de células para o tecido alvo em resposta aos quimioatraentes na fase aguda tem forte correlação com alterações morfológicas de vasos sinoviais e nas células endoteliais do tecido associado e ao início dos sintomas característicos da artrite (Srivastava *et al.*, 2020). Os monócitos que são extensivamente recrutados para os sítios de infecção são descritos como susceptíveis para CHIKV. De fato, monócitos são os principais alvos do vírus durante a fase aguda, esse papel na imunopatologia está na contribuição para disseminação do vírus para outros sítios anatômicos (Her *et al.*, 2010; Nikitina *et al.*, 2018). Além disso, o processo infeccioso promovido por CHIKV é marcadamente citopático, apresentando rápida formação de sincícios e indução de apoptose pelas vias intrínsecas e extrínsecas (Tang, 2012). Acredita-se que o vírus permanece viável nos corpos apoptóticos e podem ser transmitidos para novas células por eferocitose, em especial desempenhada por macrófagos, sem serem atingidos por anticorpos neutralizantes (Krejbich-Trotot *et al.*, 2011).

Um mecanismo que impacta a morfologia funcional dos linfonodos e a resposta específica contra o vírus foi visualizada e demonstrada por McCarthy *et al.* (2020). Em experimentos

realizados em camundongos, o grupo demonstrou que o rápido influxo de monócitos e neutrófilos para os linfonodos de drenagem prejudica o correto funcionamento do órgão e impacta a produção de anticorpos anti-CHIKV. Além da modulação de outras células, os neutrófilos, principal foco deste trabalho, estão envolvidos em um extenso dano tecidual devido à ativação incontrolada por diversos vírus.

1.3 Neutrófilos

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na circulação sanguínea em humanos e estão em constante produção e reabastecimento pela medula óssea por possuírem curto tempo de vida (Németh; Sperandio e Mocsai, 2020). Grande parte da atividade hematopoiética está envolvida nesta produção, com uma liberação cotidiana entre 5×10^{10} – 10×10^{10} de neutrófilos da medula óssea (Cain *et al.*, 2011; Lawrence; Corriden e Nizel, 2018). Diariamente, é necessário um mecanismo fino de regulação da granulopoiese para que seja viável a produção de alta taxa de neutrófilos sem prejuízos à homeostase e à produção de outros tipos celulares gerados na medula (Mehta e Corey, 2021). Dois conceitos de granulopoiese podem explicar essa regulação, a granulopoiese de emergência consiste no aumento rápido de geração e liberação de alto número de células morfológica e fisiologicamente maduras em resposta a infecções ou danos e mantém-se ativa enquanto os estímulos estiverem presentes. Em contrapartida, a granulopoiese de estado estacionário assegura produção celular constante em um balanço seguro de proliferação e diferenciação (Hirai *et al.*, 2015).

A medula óssea é um ambiente com alta concentração de CXCL12 (SDF-1, fator derivado de células tronco), um ligante para o receptor CXCR4, e a interação CXCL12 e CXCR4 retém um pool de precursores de neutrófilos na medula óssea (Capucetti; Albano e Bonecchi, 2020). Com o decorrer da maturação, há diminuição gradativa de CXCR4 e aumento de CXCR2, desta maneira os neutrófilos respondem a sinais quimiotáticos de fora do ambiente medular, como as quimiocinas CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 e CXCL8; assim, essa maior expressão de CXCR2 permite a saída dos neutrófilos maduros da medula óssea (Nauseef e Borregard, 2014). Tanto pela abundância como pelo arsenal de mecanismos efetores, os neutrófilos fazem parte da primeira linha de defesa celular sanguínea do corpo contra bactérias, vírus, protozoários e fungos. Esta mesma maquinaria com amplo potencial

tóxico contra patógenos, a depender do tempo, tipo de estímulo e a espécie envolvida na infecção, pode ocasionar inflamação exacerbada e dano tecidual, sendo necessária uma correta e estratégica ativação (Ma; Zhang e Zhu; Burn *et al*, 2021).

Grande parte do seu poder efetor envolve grânulos citoplasmáticos, estruturas de bicamada lipídica formadas em diferentes estágios da maturação dos neutrófilos e que variam em conteúdo. Os grânulos são caracterizados de acordo com a positividade para peroxidase (azurofílicos ou primários), para lactoferrina (secundários ou específicos) e gelatinase (terciários); acredita-se que essa divergência está diretamente relacionada com o tempo de formação dos grânulos (Faurischou e Borregaard, 2003). Borregaard *et al* (2007), analisaram perfis gênicos dos neutrófilos maduros e precursores utilizando microarray e reafirmaram não apenas a teoria do desenvolvimento granular e tempo, como descreveram que neutrófilos em maturação não respondem a sinais indutores de morte. Desta forma, mediadores inflamatórios tem efeito no recrutamento e na ativação de vias de apoptose em neutrófilos maduros, enquanto formas imaturas dos neutrófilos são eliminados por erros durante a divisão celular (Borregaard *et al.*, 2007).

Leucócitos do sistema imunitário inato residentes dos tecidos e outros tipos celulares, incluindo células endoteliais e queratinócitos, podem ser ativados por estímulos associados à infecção ou inflamação estéril via receptores de reconhecimento de padrões semelhantes a toll (TLR), semelhantes a NOD (NLR), receptores de lectina C (CLR) ou semelhantes a RIG-1 (RLR) e induzidos a secretar moléculas proinflamatórias, como leucotrienos e citocinas (Kolaczkowska e Kubes, 2013; Passelli *et al.*, 2021). A marginação e extravasamento dos neutrófilos da vasculatura para o leito inflamado requer uma série de eventos fisiológicos, como a diminuição do fluxo sanguíneo e o aumento da expressão de moléculas de adesão, como selectinas, ICAM-1, VCAM-1 e matriz extracelular do endotélio (Arts *et al.*, 2021). Em condições ideais, em proximidade com a monocamada endotelial, a cascata de adesão leucocitária é subdividida em rolamento, ativação, parada, fortalecimento da adesão, rastreamento intraluminal e, finalmente, a diapedese (Figura 6) (Sadik; Kim e Luster, 2011).

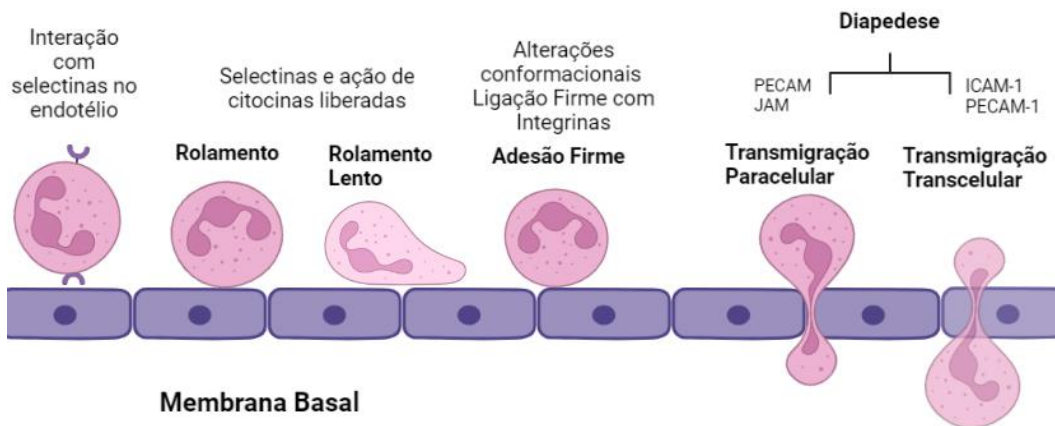


Figura 6- Processo de rolamento, adesão e transmigração de neutrófilos. Para que as células migrem para os tecidos em direção aos estímulos, uma série de processos deve acontecer no leito endotelial para que assim os neutrófilos possam interagir com as selectinas, através de interações de baixa afinidade, propiciando o rolamento. Estas interações possibilitam alterações morfológicas e a ligação de alta afinidade com integrinas. Em seguida, ocorre a passagem entre as células (paracelular) ou através (transcelular), entrando assim no tecido afetado, Adaptado de: Ley *et al.*, 2007. Desenvolvido em BioRender

A fase de rolamento acontece pela interação de selectinas da família P-selectina, L-selectina e E-selectina com glicoproteínas ligantes de selectina I (PSGLI) presentes nos leucócitos, CD44 glicosilado e ligante de E-selectina I (ESLI). Por causa do fluxo sanguíneo, há constante ligação e desprendimento devido à baixa afinidade da interação com o endotélio, permitindo o rolamento dos leucócitos (Ley *et al.*, 2007; Mayadas; Cullere e Lowell, 2015; Rosales, 2016). O momento de parada requer adesão firme e é possibilitada pelo aumento da expressão de constituintes de alta afinidade (Johnston e Kubes, 1999). Nos neutrófilos, integrinas da família do antígeno 1 ligado à função linfocitária (LFA-1- $\alpha L/\beta 2$ ou CD11a/CD18) e receptor do complemento (Mac-1- $\alpha M/\beta 2$, ou CD11b/CD18) estabelecem estas ligações firmes com ICAM-1 e ICAM-2 (Tang *et al.*, 1997; Margraf *et al.*, 2020). Para que o extravasamento finalmente ocorra é necessária a passagem através do endotélio, evento proporcionado através de alterações conformacionais e interação de proteínas juncionais das células pós-capilares (ou capilares dependendo do tecido inflamado), como PECAM-1 (Kraus e Gruber, 2021; Riddle *et al.*, 2022). A membrana basal se encontra após o fim da passagem pelas células, sua matriz extracelular é composta por moléculas como colágeno do tipo IV e lamininas. Os neutrófilos são capazes de se ligar às lamininas via receptor promíscuo (CD49f/CD29; VLA-6) e de forçar a passagem através da liberação de metaloproteases e elastase (Salvermoser *et al.*, 2018). Importante ressaltar que os neutrófilos, dependendo do patógeno, medeiam suas funções em grupo, em um aglomerado que a literatura descreve como

“*neutrophil swarming*”, que depende, principalmente, sobretudo da liberação inicial de leucotrieno B4 (LTB4) (Uderhardt; Knopf e Herrmann, 2021). Os primeiros neutrófilos que alcançam o sítio alvo produzem ainda mais leucotrienos B4, e sua secreção funciona como um mediador para uma segunda onda de recrutamento.

Oposto ao que se imaginaria de células com potencial tóxico se não reguladas, além da eliminação de patógenos, as mesmas fagocitam células necróticas (fortes indutoras de resposta inflamatória), eliminam debris celulares, produzem fatores de crescimento como TGF- β e indutores de angiogênese, como o fator de crescimento endotelial (VEGF), contribuem para resolução de inflamação com interrupção do recrutamento de mais células efetoras e favorecem o reparo tecidual (Peiseler e Kubes, 2019). Os neutrófilos também são capazes de impactar a resposta imunitária inata e adaptativa pela produção de um vasto repertório de citocinas, como IL-6, IL-12, IL-1beta, IL-8 IL-17A, IL-17F e IFN γ (Mantovani *et al.*, 2011), ou contato direto com outros tipos celulares, como células NK, células dendríticas e linfócitos. Na infecção pelo vírus *Influenza*, por exemplo, neutrófilos atuam como célula apresentadora de antígenos para linfócitos TCD8 (citotóxicos) via MHC de classe I e moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 (Hufford *et al.*, 2012).

1.4 Mecanismos efetores dos neutrófilos

Tratando das funções efetoras, os neutrófilos são células multicompetentes e uma vez mobilizados em resposta aos estímulos são capazes de efetivar a eliminação de microrganismos invasores por intermédio de três principais mecanismos: i- Fagocitose, ii- degranulação e iii- liberação de armadilhas extracelulares (NETs) (Kruger *et al.*, 2015; Rosales, 2018).

Os neutrófilos são amplamente reconhecidos como fagócitos profissionais, compartilhando com macrófagos e células dendríticas a habilidade de engolfar partículas alvo. Para tanto, possuem receptores que medeiam o processo de fagocitose, incluindo PRRs (receptores de reconhecimento de padrões moleculares), receptores Fc γ RIIA (CD32), Fc γ RIIIb (CD16) e Fc γ RI (CD64), bem como receptores para o sistema complemento (Lee; Harrison e Grinstein, 2003). Através da fagocitose os microrganismos são retidos em vacúolos citoplasmáticos (fagossomos), que passam por etapas subsequentes de maturação, com alterações no pH, favorecendo a eliminação do patógeno. Adicionalmente, pode ocorrer fusão com as membranas granulares e contato direcionado com moléculas antimicrobianas presentes nos grânulos (Nordenfelt e Tapper, 2011).

Na via oxidativa, os intermediários reativos de oxigênio ou espécies reativas de oxigênio são produzidos e liberados no fagossoma devido à montagem e ativação do complexo enzimático NADPH oxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) (Figura 7) na membrana do fagossoma. A notável importância deste complexo enzimático pode ser mais bem avaliada pelas consequências observadas na deficiência genética de alguns indivíduos (De Oliveira-Junior *et al.*, 2011). Mutações em componentes de NADPH oxidase causam a doença granulomatosa crônica, uma rara e severa imunodeficiência em que os indivíduos são acometidos por infecções bacterianas e fúngicas recorrentes (Giardino *et al.*, 2017; Thomas *et al.*, 2018).

Os neutrófilos expressam os constituintes deste complexo enzimático sob três formas de ativação: (i) estado de repouso, em que os constituintes estão distribuídos em distintas localizações (membranas dos grânulos, citoplasma e membrana celular), (ii) estado primado por estímulos, como a ligação de agonistas aos diferentes receptores e citocinas pró-inflamatórias, mediadores lipídicos e fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e (iii) um terceiro estado totalmente ativado caracterizado pela total montagem do complexo enzimático (Figura 7) (Belambri *et al.*, 2018). O complexo enzimático completo envolve um núcleo catalítico composto pelo heterodímero flavocitocromo b558, associado a duas proteínas transmembranas de cadeia pesada do citocromo b-245, também denominada NOX2 ou gp91^{phox} e de cadeia leve do citocromo b-245 ou gp22^{phox}, e proteínas advindas do citoplasma, incluindo fatores do citosol de neutrófilos do tipo 1, 2 e 4 (p47^{phox}, p67^{phox} e p40^{phox}) e Rac2 (Figura 7) (Moreau; Perianin e Arroyo, 2019). O processo de geração necessita de alto consumo de oxigênio molecular e parece haver dependência dos níveis de glicose. Em condições ideais de ativação, a enzima transfere elétrons do substrato NADPH intracelular para o oxigênio intrafagossomal ou ambiente extracelular, gerando o primeiro intermediário - ânion superóxido. A partir desta primeira geração, uma sucessão de produção das demais espécies

reativas, como peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e ácido hipocloroso, pode ser realizado (Winterbourn; Kettle e Hampton, 2016).

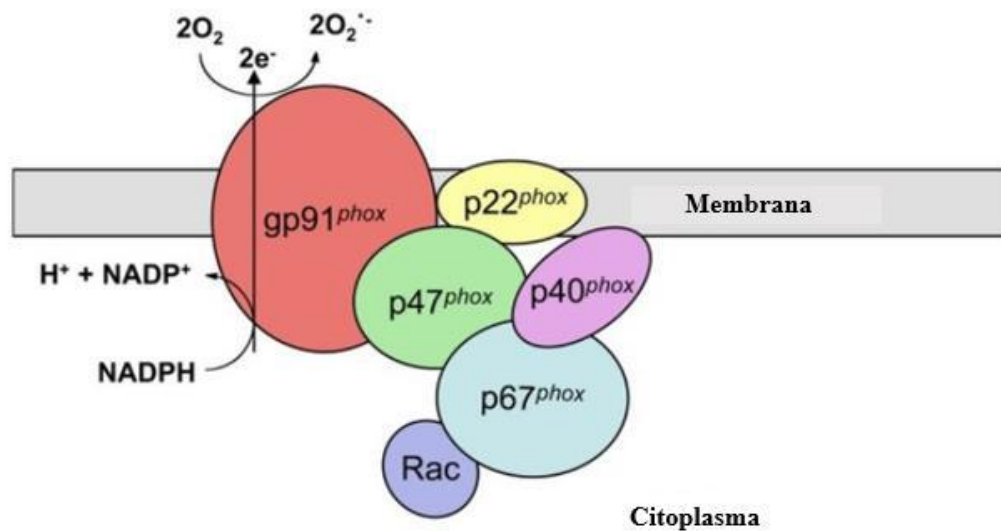


Figura 7- Ilustração do complexo NADPH oxidase. As subunidades de NADPH oxidase estão presentes nas membranas de vesículas intracelulares e na membrana plasmática. A enzima totalmente ativada transfere elétrons da molécula NADPH citoplasmática para o oxigênio molecular, iniciando assim a produção de reativos de oxigênio. Adaptado de: Gardiner *et al.*, 2013.

Além da via oxidativa, uma via não oxidativa da fagocitose ocorre por meio da fusão do fagossomo com os diferentes grânulos presentes nos neutrófilos (Cougoule *et al.*, 2002; Nordenfelt e Tapper, 2011). Essa via não apenas aumenta o potencial de geração de ROS pela disponibilidade de novos *pools* de NOX2, mas também disponibiliza um conjunto de proteínas antimicrobianas, como mencionado anteriormente, que estão presentes no interior dos grânulos. Os grânulos primários estão munidos das moléculas mais tóxicas, incluindo elastase, catepsinas, defensinas e mieloperoxidase. As gelatinases B (metaloproteinases de matriz 9), lisozimas e β2-microglobulinas dos grânulos secundários e lactoferrina e acetiltransferase dos grânulos terciários, assim como as proteínas dos grânulos primários, são liberadas para o interior do fagossomo em decorrência da fusão de membranas aumentando ainda mais o potencial de eliminação de microrganismos (Moreau; Perianin e Arroyo, 2019).

Em situações em que o patógeno não foi fagocitado, os estímulos podem direcionar os grânulos para exocitose, ou seja, fusão com a membrana plasmática ao invés da membrana fagossomal, em um processo, denominado degranulação (Figura 8) que envolve rearranjos do citoesqueleto, aumento dos fluxos de cálcio e hidrólise de ATP e GTP (Lacy, 2006). Os grânulos, mobilizados em sequência para locais da membrana alvo, ancoram-se de forma que

haja contato entre a porção externa da membrana granular com superfície interna da membrana plasmática, que evolui para uma fusão completa; por consequência, as moléculas antimicrobianas dos grânulos, citocinas e ROS produzidos são liberados no meio extracelular (Figura 8) (Lacy, 2006; Eichelberg e Goldman, 2020).

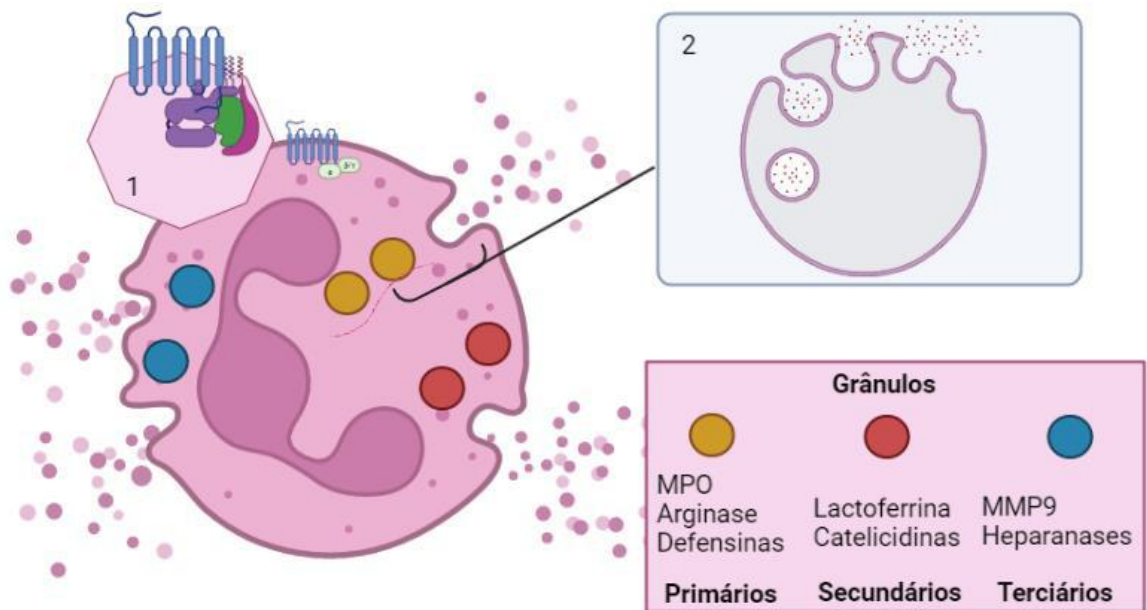


Figura 8- Esquema do processo de degranulação. Em resposta aos estímulos extracelulares em receptores dos neutrófilos, (1) vias intracelulares medeiam o processo de degranulação. O citoesqueleto está envolvido na mobilização dos grânulos em direção à membrana plasmática, assim os grânulos se fundem à membrana e o conteúdo granular é liberado (2). MPO-Mieloperoxidase, MMP8-Metaloproteinase 9. Desenvolvido em BioRender

1.5 Redes extracelulares de neutrófilos

Em resposta a microrganismos, produtos microbianos e moléculas sintéticas, os neutrófilos passam por alterações que resultam na liberação de uma estrutura de cromatina associadas a diversas moléculas, conhecida como redes extracelulares de neutrófilos (NETs) (Fuchs *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2020). Embora a primeira demonstração da liberação das NETs tenha ocorrido em 2004, quase uma década antes, Takei *et al.* (1996) observaram alterações morfológicas nos neutrófilos, semelhantes às observadas durante a formação de NETs, incluindo a descondensação da cromatina, com pouca fragmentação do DNA, sugerindo um novo tipo de morte celular diferente de necrose e apoptose (Takei *et al.*, 1996). Estudos conduzidos por Brinkmann *et al.*, (2004) demonstraram a liberação de fibras extremamente frágeis, denominadas redes extracelulares de neutrófilos (do inglês, *Neutrophil Extracellular*

Traps- NETs), após estímulo com IL-8, PMA ou bactérias. Ao verificar a composição destas redes, concluíram que eram fibras de DNA associadas a histonas e a proteínas provenientes dos grânulos (Figura 9), que apresentavam propriedades microbicidas contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Brinkmann *et al.*, 2004). Inicialmente, 24 proteínas foram identificadas nas redes de neutrófilos induzidas por PMA, incluindo histonas (H1, H2A, H2B, H3 e HA), elastase neutrofílica (NE), mieloperoxidase, entre outras (Tabela 1) (Urban. *et al.*, 2009; Dwyer *et al.*, 2014; Chapman *et al.*, 2019; Morales-Primo *et al.*, 2021). Estudos posteriores focados no proteoma das NETs sugeriram que a composição das redes era variável de acordo com a natureza do estímulo (Petretto *et al.*, 2019). De fato, a quantidade total de proteínas nas NETs induzidas por phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (24 proteínas) difere daquelas identificadas após o estímulo com cepas mucóides e não mucóides de *Pseudomonas aeruginosa* (80 proteínas) (Urban. *et al.*, 2009; O'Donoghue *et al.*, 2013; Dwyer *et al.*, 2014). Isso é esperado, uma vez que as fontes indutoras são diversas e não se limitam apenas a moléculas microbianas, como no caso da indução por PMA.

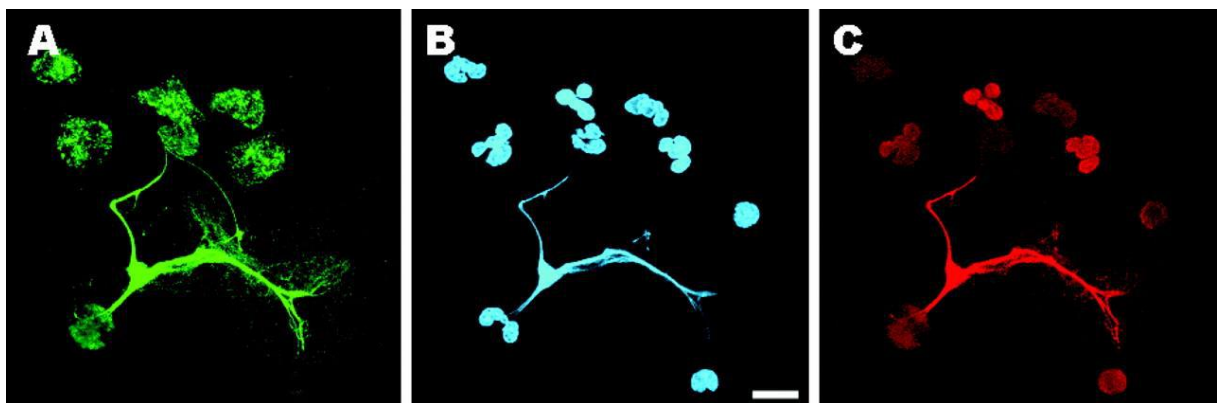


Figura 9. Representação das redes extracelulares. Neutrófilos estimulados com IL-8 liberam estruturas compostas por elastase (em verde), DNA (em azul) e histonas (em vermelho). Fonte: Brinkmann *et al.*, 2004.

Tabela 1- Alguns componentes presentes nas NETs e suas funções. (Adaptado de Morales-Primo *et al*, 2021)

Moléculas	Função
DNA/mtDNA	Armazenamento da informação genética
Histona	Arquitetura do DNA, conformação e regulação gênica
Histona citrulinada	Arquitetura do DNA, conformação e regulação gênica
Mieloperoxidase	Produção de ROS
Elastase neutrofilica	Serina Protease
Catepsina G	Serina Protease
Proteinase 3	Serina Protease
Azurocidina	Serina Protease inativada
Lactoferrina	Transferrina
Catelicidina	Peptídio antimicrobiano
Alfa defensina	Peptídio antimicrobiano
Calprotectina	Proteína de ligação ao cálcio

Fuchs *et al.* (2007) averiguaram as alterações morfológicas desde o estímulo até a liberação das redes extracelulares. Durante os experimentos, o grupo observou perda simultânea de distinção entre a eu- e heterocromatina e a estrutura lobular do núcleo (Figura 10). Com o decorrer do tempo, a compartimentalização no interior da célula se perde e por fim as redes são liberadas para o meio extracelular. Por tais características, o processo de extrusão das redes foi considerado como um tipo de morte celular programada, nomeado NETose. No entanto, há neutrófilos que após liberação do DNA permanecem viáveis e com funções efetoras funcionais (Yousefi *et al.*, 2009; Yipp 2012; Vorobjeva e Chernyak; Yousefi *et al.*; 2020). Assim segundo o Comitê de Morte Celular, é aconselhável a utilização do termo netose ao constatar a morte celular do neutrófilo e não apenas pela presença de NETs (Galluzzi *et al.*, 2018).

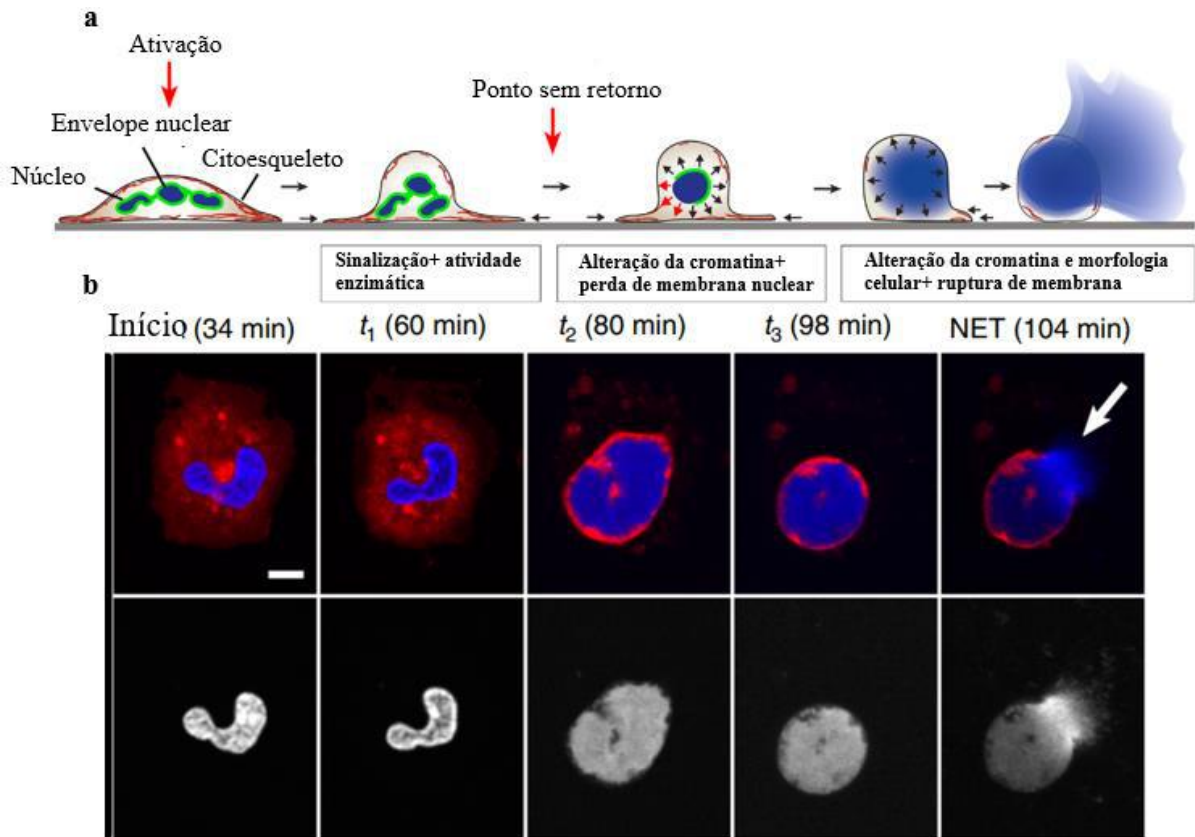


Figura 10- Alterações da cromatina durante a liberação de redes extracelulares. A- Após o estímulo indutor, toda arquitetura celular é acionada levando a diversas alterações morfológicas do neutrófilo, a ativação de vias intracelulares e de enzimas que promovem a indução de um ponto decisivo de não retorno, a partir do qual há progressão das alterações até a final ruptura da membrana plasmática e liberação das redes. **b-** Neutrófilos humanos foram estimulados com 100 nM de PMA e as alterações morfológicas ao longo do tempo foram detectadas por microscopia confocal de varredura (CLSM). O núcleo perde sua forma característica e a cromatina é descondensada até a extrusão das NETs no meio extracelular. As marcações representam a membrana celular (vermelho), a cromatina (azul) e a seta indica a rede extracelular sendo liberada. Adaptado de Neubert *et al.*, 2018

Inúmeros trabalhos identificaram a presença das redes em diferentes órgãos e tecidos, bem como em sítios de infecção ativa, onde estas estruturas propiciavam a eliminação do microrganismo por intermédio de seus constituintes tóxicos. Além disso, as redes ajudam a limitar a disseminação de patógenos para células não infectadas ou tecidos saudáveis adjacentes e auxiliam na captura e aprisionamento de patógenos, facilitando a ação de outros mecanismos efetores do sistema imunológico recrutados para o local (Fuchs *et al.*, 2007; Kaplan e Radic, 2012; Vorobjeva e Chemyak; Yousefi *et al.*; Li *et al.*; 2020). No entanto, embora seja um mecanismo efetor extremamente potente, as redes podem ser fontes de forte inflamação tecidual. A liberação inadvertida está diretamente associada à formação de trombos e em diferentes doenças, desde autoimunes (disponibilização de autoantígenos), arteriosclerose,

sepsis aguda, câncer e disfunção de órgãos (Delgado-Rizo *et al.*; Papayannopoulos, 2018; Li *et al.*; 2020; Wigerblad e Kaplan, 2023).

1.6 Mecanismos envolvidos na formação das NETs

Apesar dos avanços nos estudos a respeito das redes extracelulares, as vias de sinalização envolvidas na liberação de NETs ainda não estão totalmente elucidadas. No entanto, sabe-se que a indução de NETs envolve alterações nas concentrações de cálcio intracelular, mobilização de cascatas de quinases e a produção de espécies reativas de oxigênio, necessários para as alterações morfológicas nos neutrófilos (Thiam *et al.*, 2020). (Vorobjeva e Chemyak, 2020). Além disso, a descondensação da cromatina é um evento chave na produção das NETs (Sollberger; Tilley e Zychlinsky, 2018; Singh *et al.*, 2023).

As vias de liberação de NETs podem ou não envolver a participação da enzima NADPH oxidase ou NOX2. Até o momento, a maioria dos estímulos parece induzir NET de forma dependente de NOX2. Por exemplo, o clássico indutor de NETs, PMA, cria um influxo de cálcio no citoplasma, que promove um aumento da função de proteínas quinase, que, por sua vez, atuam fosforilando a subunidade gp91^{phox}/NOX2. (Ravindran; Khan e Palaniyar, 2019). A elastase de neutrófilos e a mieloperoxidase são liberadas dos grânulos após a ação de ROS sob a membrana granular e nuclear, assim, estas proteínas migram em direção ao núcleo. Ambas participam da descondensação da cromatina por mecanismos diferentes, a elastase age diretamente degradando as histonas nucleares, já a mieloperoxidase se liga à cromatina e promove o relaxamento da estrutura (Papayannopoulos *et al.*, 2010).

Estudos em neutrófilos humanos demonstraram que a indução das NETs estimulada por LPS e por bactérias Gram-negativas envolve a ativação da via de quinases MAP (mitogen-activated protein) dependente de JNK (c-Jun N-terminal kinase) e NADPH oxidase (Khan *et al.*, 2017). Um exemplo notável é a toxina da *Escherichia coli*, responsável pela síndrome urêmica hemolítica, que é capaz de induzir as NETs dependente de NOX2. A utilização de inibidores específicos de NOX reduz significativamente a produção de ROS e a formação de NETs (Feitz *et al.*, 2021).

Ainda que grande parte do conhecimento a respeito da liberação de NETs seja oriundo de vias dependentes de NOX2, ao que tudo indica, há evidências de que ROS não necessariamente sejam produzidos exclusivamente pela NADPH oxidase. Fontes alternativas,

como o ROS mitocondrial, mais especificamente do complexo de fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS), também podem estar envolvidas (Stoiber et al., 2015; Ravindran, Khan e Palaniyar, 2019). O ROS mitocondrial pode desempenhar um papel na indução das NETs durante doenças autoimunes na ausência da NADPH oxidase. A utilização de inibidores de ROS mitocondrial reduz o fenótipo de autoimunidade promovido por NETose em camundongos propensos ao desenvolvimento de lúpus eritematoso sistêmico (Lood *et al.*, 2016).

Outro mecanismo envolvido nas NETs é a modulação da cromatina pela proteína arginina deaminase tipo 4 (PAD4), uma enzima que participa da citrulinização de histonas. Sugere-se que a ativação de PAD4 esteja a jusante do ROS e seja mediada pelo cálcio e pela proteína quinase C (PKC) (Rohrbach et al., 2012; Papayannopoulos, 2018). De fato, o influxo de cálcio e a ligação aos sítios presentes em PAD4 regulam seu translocamento para o núcleo. Sua ação ocorre diretamente nas histonas, levando à redução da carga positiva e enfraquecendo sua ligação com o DNA. Essa redução resulta na descondensação da cromatina por uma via independente de ROS (Schoen et al., 2022). Os estímulos que reconhecidamente induzem a formação de NETs via PAD4 incluem bactérias vivas, componentes da parede celular (LPS, ácido lipoteicoico), zimosan, TNF-alfa, fMLP e H₂O₂ (Rohrbach et al., 2012). A utilização de inibidores seletivos de PAD afeta os mecanismos de citrulinização das histonas, reduzindo a formação de NETs em humanos e camundongos (Lewis et al., 2015). Demonstrando sua importância no processo, a deleção do gene que codifica a PAD4 em neutrófilos dificulta a capacidade de liberar NETs em resposta a estímulos externos. Como exemplo, camundongos deficientes para PAD4 em um modelo experimental que mimetiza doença cardíaca tornaram-se ineficientes na produção de NETs. Além disso, a deficiência de PAD4 não apenas protegeu os camundongos contra trombose profunda, mas o tratamento prévio com DNase I também reduziu significativamente a formação de trombos (Martinod *et al.*, 2013; Wong e Wagner, 2018; Li *et al.*, 2020).

Outros componentes podem associar-se aos descritos anteriormente, como a gasdermina D (GSDMD). A formação de poros pela gasdermina D já foi demonstrada na piroptose e consequente liberação de IL-1beta (He *et al.*, 2015). Estudos já demonstraram que esta proteína formadora de poros pode estar envolvida na produção das NETs (Sollberger *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2018). Os mecanismos ainda não estão claros, porém Chen e colaboradores (2018) demonstraram o papel de gasdermina D nas vias de liberação de NETs após estímulo com LPS

e bactérias gram-negativas. Este mecanismo dependente de GSDMD envolvia ativação de caspase 11. As NETs liberadas, dependentes de gasdermina, possuíam efeito protetor em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Esta correlação também foi vista em modelos experimentais de sepse, onde os efeitos deletérios observados após o aumento da expressão de NETs dependentes de GSDMD foram diminuídos com a utilização de inibidores seletivos de gasdermina (Silva *et al.*, 2021). Em contraste, a produção de NETs em resposta ao clássico indutor das redes, PMA, envolve a participação da gasdermina D de forma dependente de elastase. A elastase neutrofílica cliva e ativa a gasdermina D, neste caso (Sollberger *et al.*, 2018).

1.6.1 Vias de sinalização

Diferentes vias de sinalização e receptores já foram propostos como sendo importantes para liberação de NETs. Por análises genéticas químicas realizadas em neutrófilos humanos purificados, Hakkim *et al.* (2011) demonstraram o envolvimento de Raf-Mek-Erk na geração de NETs dependente de NADPH oxidase e do aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas Mcl-I. Para tais experimentos utilizaram os inibidores DPI (inibidor de ROS), GW5074 (inibidor de Raf quinase) e U0126 (inibidor de MEK) e confirmaram a inibição das NETs nos grupos amostrais. A PKC, como descrito anteriormente, é ativada com o aumento das concentrações intracelulares de cálcio e atua diretamente sob NOX2 (Ravindran; Khan e Palaniyar, 2019). Uma representação das vias pode ser visualizada na Figura 11.

Dados controversos levantam a questão da via de indução de autofagia PI3K/AKT/mTOR na indução de NETs. Itakura e McCarty (2013) demonstraram que a inibição farmacológica de mTOR acelera e aumenta liberação de NETs induzida por fMLP. Por outro lado, o uso de inibidores inespecíficos de PI3K, como o Wortmannin, reduziu a liberação de NETs induzida por diferentes estímulos. Além disso, a deleção de WDFY3, um regulador da autofagia, reduziu a produção de ROS e NETs em neutrófilos de camundongos (Rosazza; Warner e Sollberger, 2020). Devido à complexidade das NETs e do próprio mecanismo autofágico, juntamente com os dados divergentes encontrados na literatura, são necessários mais estudos abrangentes para investigar os efeitos da autofagia nas NETs e os principais intermediários envolvidos (Li *et al.*, 2020). Trabalhos utilizando diferentes fontes de estímulos tem demonstrado um mecanismo conservado de participação de PI3K na liberação de NETs. Estas proteínas estão expressas em diferentes isoformas, sendo PI3K γ e PI3K δ , preferencialmente em leucócitos. Para parasitos, bactérias ou PMA, estas subunidades foram associadas com a liberação de redes, de forma

dependente ou independente de ROS. A utilização de inibidores específicos AS60 e IC87 diminuiu consideravelmente as redes formadas por *Leishmania spp* (De Souza-Vieira *et al.*, 2016)

A ativação dos neutrófilos desencadeia a abertura de canais de cálcio, como exemplo, durante a indução de NETs pela interleucina-8 (IL-8). Os estoques de cálcio tanto no interior quanto no exterior das células são mobilizados. Esse processo parece envolver a ação da enzima fosfolipase C, uma vez que os tratamentos com inibidores de proteína G, proteína quinase C (PKC) e fosfolipase C reduziram a liberação de redes extracelulares de neutrófilos (Gupta *et al.*, 2014). A regulação do influxo de cálcio por meio de um sistema de vesículas também influencia a formação de NETs em pacientes com doença inflamatória sistêmica. Estudos mostraram que a diminuição do influxo de cálcio intracelular está associada a uma redução na produção de NETs nesses indivíduos (Liao *et al.*, 2021). Além disso, o cálcio intracelular é necessário para a translocação da proteína arginina deaminase tipo 4 (PAD) para o núcleo. Em experimentos com linhagens de células epiteliais humanas superexpressando PAD, o tratamento com o quelante de cálcio BAPTA-AM reduziu a citrulinação da histona H3 de maneira dependente da dose administrada (Leshner *et al.*, 2012). O BAPTA-AM também foi capaz de reduzir a formação de NETs induzidas por PMA e nigericina (Kenny *et al.*, 2017).

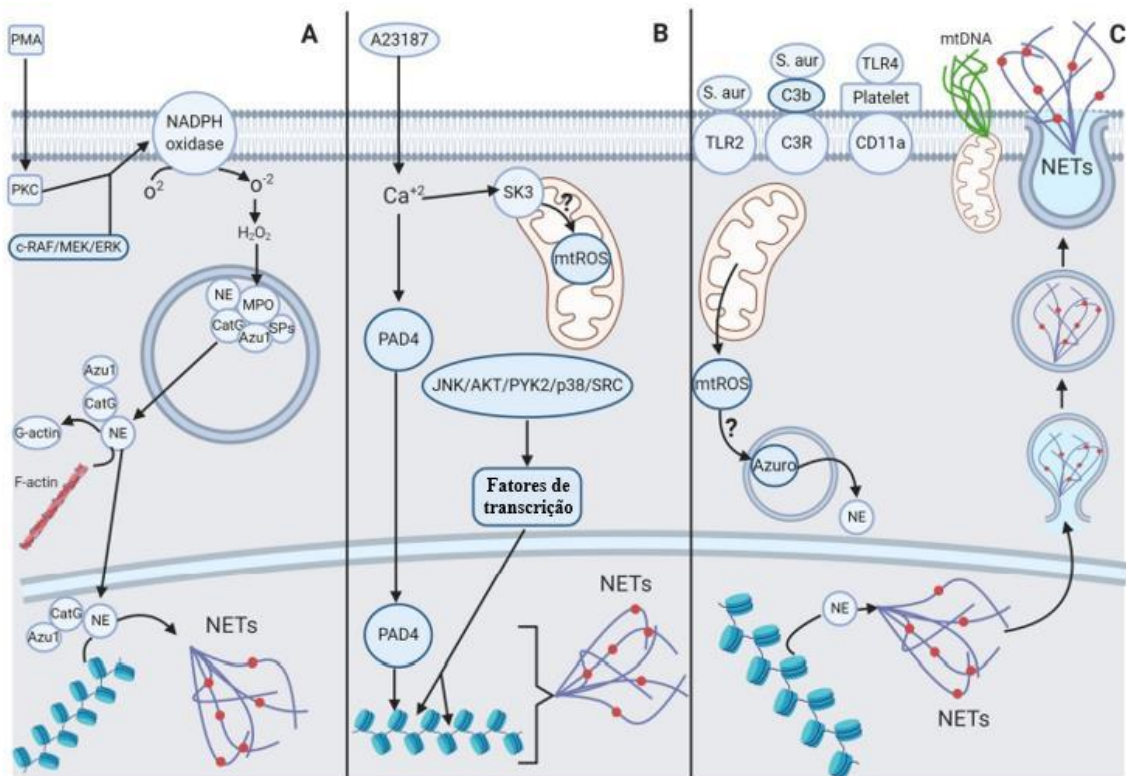


Figura 11- Esquema representativo de vias de formação de NETs. As vias moleculares que participam da liberação de redes são múltiplas e diferem na dependência de NOX2. **a-** O estímulo clássico de indução por PMA é dependente de NADPH; no ambiente intracelular proporciona ativação de PKC a jusante de Raf-Mek-Erk. A produção de ROS possibilita atuação direcionada dos grânulos azurofílicos. A elastase de neutrófilos, catepsinas G (CatG) e Azurocina 1 (AZU1) degradam componentes do citoesqueleto antes de atuarem sobre as histonas no ambiente nuclear. Ao fim dos eventos intracelulares, as NETs são liberadas. **b-** O estímulo promovido por A23187 aumenta diretamente as concentrações de Ca^{2+} , ativando a PAD4 e SK3 (mecanismo desconhecido envolvendo ROS mitocondrial). Por causa da citrulinização mediada pela PAD4 nas histonas H3 e H4 ocorre o relaxamento da cromatina. Em paralelo há participação da via JNK/AKT/PYK2/p38/SRC auxiliando na formação de NETs. **c-** Múltiplos receptores podem iniciar a indução de NETs após ligação do estímulo (representado na figura). Uma hipótese alternativa sugere que o ROS mitocondrial pode estar envolvido na liberação da elastase do grânulo. Esta protease livre migra para o núcleo promovendo o relaxamento da cromatina pela degradação de histonas. A liberação de NETs nesta hipótese envolveria o transporte intermediado por vesículas. Adaptado de Morales-Primo *et al.*, 2021.

Como é um campo não totalmente caracterizado, estes apanhados reforçam que o processo que leva a liberação não é uniforme, diferentes estímulos podem modular as diferentes vias que serão engajadas para extrusão das redes de modo que a própria composição difere dentre os estímulos (Kenny *et al.*, 2017).

1.7 As redes em resposta a vírus

Os vírus podem ativar a produção das redes extracelulares direta ou indiretamente por meio da ligação aos receptores de reconhecimento de padrão expressos pelos neutrófilos. As NETs já foram relatadas em infecções por diferentes vírus, como HIV-1, CHIKV, vírus sincicial respiratório, Hantavírus e Sars-Cov (Saitoh *et al.*, 2012; Funchal *et al.*, 2015; Raftery *et al.*, 2014; Hiroki *et al.*, 2020; Veras *et al.*, 2020). O primeiro trabalho a sugerir a participação das NETs em uma infecção viral demonstrou que neutrófilos purificados de gatos naturalmente infectados com o vírus da leucemia felina (FeLV) e sintomáticos produzem mais NETs em comparação aos gatos infectados assintomáticos (Wardini *et al.*, 2010). Além dos vírus que diretamente induzem a produção das NETs, o microambiente inflamatório induzido após ativação, possivelmente por infecção por vírus, de células epiteliais e endoteliais é rico em citocinas e quimiocinas, dentre elas a IL-8, forte indutora de NETs (Gupta *et al.*, 2010).

As vias de produção de NETs em resposta aos vírus vêm sendo exploradas e caracterizadas. Saitoh e colaboradores, por exemplo, demonstraram que o vírus HIV-1 ativa os neutrófilos via TLR7 e TLR8 a liberarem NETs. As redes capturam e inativam a partícula viral, impedindo a disseminação do vírus. Como mecanismo de escape, o grupo sugeriu que as células dendríticas produzem IL-10 em resposta ao vírus, regulando, assim, negativamente a produção das redes (Saitoh *et al.*, 2012). O mecanismo envolvido na produção de NETs induzida por RSV foi proposto por Funchal e colaboradores. A proteína F (*fusion protein*) ativa a liberação das redes ao interagir com TLR4 e ativar a produção de ROS, com participação de ERK e p38 (Funchal *et al.* 2015). SARS-Cov-2 ativa a produção de NETs de forma dependente do receptor ACE2 (*angiotensin-converting enzyme 2*), serino proteases do neutrófilo, a replicação viral e a enzima PAD-4, responsável pela descondensação da cromatina (Veras *et al.*, 2020).

A depender do vírus, a produção de NETs pode contribuir para a resolução da infecção ou influenciar no estabelecimento da patologia. A título de exemplo, experimentos feitos com neutrófilos humanos demonstraram que as redes extracelulares foram eficientes em capturar partículas do vírus respiratório sincicial (RSV), impedindo a infecção de células alvo. No entanto, em quadros graves da doença, a exagerada presença de redes extracelulares nas vias aéreas contribui para a obstrução de vias aéreas (Cortjens *et al.*, 2016). Em infecções pelo vírus influenza, parece que o excesso de produção de NETs aumenta a extensão de danos causados no pulmão (Yi *et al.*, 2022; Narasaraju *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2018). Talvez em infecções que envolvam o tecido pulmonar, a produção das NETs parece ser deletéria. As redes produzidas

em resposta à infecção pelo vírus SARS-Cov-2 são tóxicas para células epiteliais pulmonares (Veras *et al.*, 2020).

Não há dados que reforcem ou mesmo expliquem o papel das redes na maioria das infecções por arbovírus. Os primeiros dados de NETs para *CHIKV* foram publicados apenas em 2020. Nestes achados o vírus *CHIKV*, no MOI 5, foi capaz de induzir a liberação de NETs em neutrófilos murinos, de maneira dependente de TLR7 e ROS. Reforçando o papel das NETs, o tratamento com DNase I aumenta a susceptibilidade à infecção no modelo *in vivo*. (Hiroki *et al.*, 2020). Os resultados deste estudo abriram questões sobre o papel protetor das NETs na infecção por *CHIKV*, no entanto, não há mais dados disponíveis que detalhem as funções das redes ou quais vias e intermediários moleculares estão envolvidos no mecanismo. Elucidar tais pontos é de grande valia para compreensão desta estrutura nas fases aguda e crônica da infecção, bem como tornar viável a inibição, modulação ou interferência direcionada como ferramenta na busca de redução de danos.

2 JUSTIFICATIVA

As doenças causadas por insetos vetores constituem um problema de saúde pública, sendo responsáveis por mais de 1 milhão de mortes por ano (WHO, 2014). No ano de 2022, nas Américas, verificou-se 3.110.442 casos de arboviroses, sendo aproximadamente 9% dos casos associados a transmissão do vírus *Chikungunya* (OPAS, 2023). Não obstante ao alto potencial de surtos promovidos pelo CHIKV, a doença ainda é considerada negligenciada (Montalvo Zurbia-Flores *et al.*, 2023).

Após inoculação propiciada pelo vetor, o CHIKV possui amplo tropismo celular, sendo capaz de infectar principalmente células endoteliais, epiteliais e fibroblastos (Traverse *et al.*, 2022). Os macrófagos são descritos como reservatórios virais durante a fase crônica. A infecção destes e de monócitos contribuem para a disseminação viral para articulações e músculos (Nikitina *et al.*, 2018; Her *et al.*, 2010). Contudo, resultados *in vitro* de infecção utilizando células mononucleares do sangue periférico humano (do inglês, *Human Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC) são contraditórios, o que remete a necessidade de mais estudos demonstrando a susceptibilidade destes tipos celulares ao CHIKV (Sousa *et al.*, 2023). No sítio de infecção, diversas citocinas e quimioatraentes são liberados propiciando o recrutamento massivo de outros tipos celulares, como os neutrófilos, descritos por possuírem potentes mecanismos efetores contra patógenos (Gabriel *et al.*, 2013; Nemeth *et al.*, 2020)

As redes extracelulares de neutrófilos são estruturas formadas em resposta a diferentes estímulos, que podem atuar na resposta imunitária inata através dos componentes citotóxicos associados ao arcabouço de DNA, impedindo a disseminação de microrganismos (Santoki e Kolaczowska, 2020; Schultz *et al.*, 2022). No entanto, sua ativação e liberação descontrolada estão relacionadas a diversas doenças (Yipp e Kubes, 2013). O papel das NETs para *Alphavirus* não está bem estabelecido. Para *Chikungunya*, a liberação das redes extracelulares por neutrófilos murinos obteve efeito protetor na sobrevivência *in vivo*. Em experimentos *in vitro*, a função de armadilha foi visualizada limitando a infecção de células alvo, proteção revertida após utilizar DNase I (Hiroki *et al.*, 2020). Todavia, as vias de sinalização envolvidas na liberação de redes extracelulares induzidas por CHIKV em neutrófilos não estão descritas. Sendo assim, visto a ambiguidade do papel das redes extracelulares, é relevante esclarecer alguns pontos que envolvem o papel das NETs na infecção por *Chikungunya* em neutrófilos humanos, assim como os possíveis intermediários da sinalização envolvidos no processo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a liberação de redes extracelulares em neutrófilos humanos induzida por *Chikungunya*, bem como analisar os intermediários da sinalização envolvidos neste processo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a.** Produzir os estoques do CHIKV nas linhagens C6/36 e Vero.
- b.** Demonstrar e quantificar a liberação de redes extracelulares por neutrófilos humanos estimulados com CHIKV.
- c-** Analisar a produção de espécies reativas de oxigênio induzida pelo vírus em neutrófilos humanos.
- d-** Averiguar a participação de intermediários da sinalização (PI3K, cálcio, PADs e elastase) nas NETs induzidas por CHIKV.
- e-** Aferir o papel das redes extracelulares de neutrófilos na modulação da infecção de células alvo.

4 MATERIAIS E MÉTODO:

4.1 Animais

Camundongos C57BL/6, fêmeas com aproximadamente três meses foram utilizados para obtenção de macrófagos murinos. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, em gaiolas contendo ração e água *ad libitum*, ciclos de claro e escuro de 12 horas e os devidos cuidados na higienização e preservação do bem-estar animal. Todos os testes realizados em animais foram conduzidos com a aprovação do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ (número de protocolo 064/2019).

4.2 Purificação de células derivadas de medula óssea de camundongos

Os animais foram submetidos a eutanásia por inalação com isoflurano seguido de deslocamento cervical. Na cabine de fluxo laminar, os camundongos foram posicionados em decúbito dorsal. Primeiramente, a pele do meio do abdômen e dos membros inferiores foi removida. Após limpeza dos músculos, a tíbia e o fêmur foram separados e rinsados em placa de petri contendo álcool 70% e, em sequência, os ossos foram inseridos em uma segunda placa de petri com PBS. As extremidades dos ossos foram cortadas e, com auxílio de uma seringa acoplada a uma agulha 25G, a medula foi lavada com aproximadamente 5 ml de meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 2mM de EDTA. O conteúdo obtido foi filtrado em membrana com poro de 100µm de diâmetro e centrifugado a 400 g por 7 minutos a 4°C. O precipitado foi resuspenso em solução de lise (16,8 M de NH₄Cl, 0,1 M de KHCO₃ e 1,3 mM EDTA) gelada para remoção dos eritrócitos. Em seguida, completou-se a solução de lise com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina-estreptomicin); as células foram novamente centrifugadas a 400 g por 7 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 para contagem na câmara de Neubauer e posteriormente, diferenciadas em macrófagos murinos.

4.3 Diferenciação de células mononucleares em macrófagos murinos

Para diferenciação em macrófagos, as células mononucleares murinas foram plaqueadas (5x10⁶ células) em placas de petri (100x15mm, Corning) e incubadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina-estreptomicina e 20% do

sobrenadante da linhagem de fibroblastos murinos (células L929) durante 6 dias a 37°C, 5% de CO₂. Três dias após o plaqueamento, adicionamos mais 10 ml de meio de cultura às placas. No sexto dia, o meio condicionado foi removido e substituído por RPMI 1640 gelado e, posteriormente, as células foram mantidas a 4°C por 5 minutos. Após este tempo, os macrófagos aderidos foram soltos com auxílio da pipeta e, em seguida, foram centrifugados a 400 g a 4°C por 5 minutos. As células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina-estreptomicina e contados em câmara de Neubauer para serem utilizados nos experimentos.

4.4 Linhagens celulares

Para esta monografia foram utilizadas seis linhagens celulares: monócitos humanos (THP-1), macrófagos murinos (RAW 264.7), células epiteliais de macaco verde africano (Vero), células humanas endoteliais da microvasculatura cerebral (HBMEC), células de larvas do mosquito *Aedes albopictus* (C6/36) e células de fibroblasto murino (L929) (TABELA 2).

Tabela 2. Linhagens celulares e meios de cultura utilizados nos experimentos.

Linhagem	Meio de cultura utilizado (%)
RAW 264.7 e THP-1	RPMI 1640 Soro Fetal Bovino (10%) Penicilina-estreptomicina (1%)
HBMEC e Vero	DMEM Soro Fetal Bovino (10%) Penicilina-estreptomicina (1%)
C6/36	Leibovitz Caldo Triptose Fosfato (0,3%) L-Glutamina (0,2%) Aminoácidos não essenciais (1%) Bicarbonato de Sódio (0,75%) Soro Fetal Bovino (10%) Penicilina-estreptomicina (1%)

A linhagem THP-1, gentilmente cedida pelo professor Fabianno Dutra, do departamento de Imunologia (IMPG, UFRJ), foi cultivada em suspensão no meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e 1% de penicilina-estreptomicina (2×10^5 células/ml) a 37°C, 5% de CO₂. Os repiques foram realizados a cada 2-3 dias: as células

foram centrifugadas a 400 g por 5 minutos e posteriormente plaqueadas em placas de 96 poços (JetBiofil, 2×10^5 células) para a realização dos experimentos de infecção.

A linhagem celular RAW 264.7 foi cultivada em garrafas de 25 cm^2 (10^6 células, KASVI em meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina-estreptomicina a 37°C com 5% de CO_2 . Os repiques foram feitos manualmente, a cada dois dias, utilizando rodinho (*cell scraper*, JetBiofil) seguido de centrifugação a 400 g durante 5 minutos. As células foram ressuspensas, contadas e plaqueadas em placas de 24 poços (10^5 células/poço, JetBiofil) para os experimentos.

As células Vero foram gentilmente cedidas pela professora Irania Assunção Miranda do departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG, UFRJ). Esta linhagem foi cultivada em garrafas de 25 cm^2 (5×10^5 células, Kasvi) utilizado meio DMEM alta glicose (Gibco), 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina-estreptomicina a 37°C com 5% de CO_2 . Os repiques foram realizados de maneira enzimática, a cada dois dias, utilizando 0,12% tripsina-0,02% EDTA. Em seguida, as células foram centrifugadas a 400 g por 5 minutos e transferidas para placas de 24 poços (6×10^4 /poço, Kasvi) para os experimentos.

A linhagem HBMEC foi gentilmente cedida pela professora Luciana Barros de Arruda, do departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG-UFRJ). As células foram cultivadas a 37°C com 5% de CO_2 , em garrafas de 25 cm^2 (7×10^5 células, Sarstedt). Para o cultivo, utilizamos o meio DMEM alta glicose (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina-estreptomicina. Os repiques foram realizados a cada dois dias com utilização de solução 0,12% tripsina-0,02% EDTA. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 400 g por 5 minutos e plaqueadas em placas de 96 poços (10^4 células/poço, Corning).

A linhagem C6/36 nos foi gentilmente cedida pela professora Andreia Da Poian, do Instituto de Bioquímica Médica (IBqM, UFRJ). Para manutenção celular, cultivamos em garrafas de 25 cm^2 (10^6 células, Kasvi), a 28°C em meio Leibovitz (L-15, Sigma-Aldrich) com adição de 0,3% caldo triptose fosfato (Sigma), 0,2% de L-glutamina (Sigma), 1% de aminoácidos não essenciais (Sigma), 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 0,75% de bicarbonato de sódio e 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma). Após atingirem a confluência (80-90%), as células eram utilizadas para os experimentos de infecção.

4.5 Purificação de PBMCs humanos e diferenciação em macrófagos

Sangue obtido por voluntários foram disponibilizadas pelo banco de sangue do Hospital Clementino Fraga Filho (UFRJ, Brasil) e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Universidade Federal do Rio de Janeiro, número de protocolo: 4261015400005257). Brevemente, o conteúdo celular foi separado por gradiente de densidade (Histopaque 1077, Sigma-Aldrich) na proporção 2:1 (sangue: histopaque) e centrifugação por 30 minutos a 400 g, 21°C, sem frenagem e baixa aceleração. Posteriormente, a camada de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foi retirada com pipeta Pasteur e centrifugada por 10 minutos a 400 g e 21°C. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS, ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro humano (Sigma) e 1% de penicilina-estreptomicina e, posteriormente, plaqueadas na densidade de 50×10^6 em placas de petri (100x15 mm) a 37°C, 5% de CO₂ por 7 dias. Assim como nos macrófagos murinos, para a soltura das células diferenciadas aderidas, o meio foi descartado e substituído por meio RPMI 1640 gelado e mantido por 5 minutos a 4°C. As células foram soltas, centrifugadas a 400 g por 5 minutos a 4°C e por fim, ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro humano e 1% penicilina-estreptomicina. Após contagem na câmara de Neubauer, os macrófagos diferenciados foram plaqueados e utilizados nos experimentos propostos.

4.6 Purificação de neutrófilos humanos

Para obtenção de neutrófilos humanos, amostras de sangue de doadores saudáveis e voluntários foram coletadas, após prévia informação e consentimento, em seringas heparinizadas (HEMOFOL, Cristália). As amostras foram centrifugadas por gradiente de densidade com Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich) a 400 g durante 30 minutos, em baixa aceleração e ausência de frenagem. A camada de células polimorfonucleares foi coletada com pipeta Pasteur e submetida duas vezes à lise hipotônica de eritrócitos (16,8M de NH₄Cl, 0,1M de KHCO₂ e 1,3 mM de EDTA), seguida por lavagem com PBS (Gibco). Para contagem, as células (<95% de pureza de neutrófilos) foram ressuspensas em RPMI 1640 (Gibco) e utilizadas imediatamente. Os procedimentos com sangue humano foram aprovados pelo Comitê

de Ética em Pesquisa (Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ, Brasil) com número de protocolo 4261015400005257).

4.7 Propagação do vírus *Chikungunya*

Vírus *Chikungunya* (CHIKV), isolado no Rio de Janeiro (cepa RJ-IB1, Brasil) e gentilmente cedido pela professora Luciana Jesus da Costa (Instituto de Microbiologia Paulo de Goés, UFRJ), foi expandido nas linhagens celulares C6/36 ou Vero. As células confluentes (aproximadamente 80%) foram infectadas com o MOI (*multiplicity of infection*) 0,1 e incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por 2 horas, em baixo volume de meio sem soro (meio L15 para as células C6/36 e DMEM alta glicose para a Vero) sob agitação manual a cada 10 minutos. Após este período, adicionou-se meio suplementado com 2% de soro fetal bovino (Cultilab) e as células foram incubadas por 48 horas, no qual foi possível constatar o efeito citopático (CPE) promovido pelo vírus. Posteriormente, os sobrenadantes foram coletados, centrifugados a 1000 g por 5 minutos para remoção do *debris* celular e filtrados com auxílio de uma membrana com poro de 0,22 µm de diâmetro (JetBiofil). Em seguida, alíquotas de 50µl e 100µl foram produzidas e armazenadas a -80°C (TABELA 3). O *mock* (sobrenadante celular sem o vírus) utilizado nos experimentos foi gerado em paralelo à produção do CHIKV, em garrafas de células que são submetidas a mesma técnica de produção.

Tabela 3. Estoques do CHIKV produzido e utilizado nos experimentos.

Vírus	Título (PFU/ml)	Produção
CHIKV (C6/36)	3,5x10 ⁸	16/08/2022
CHIKV (Vero)	1,7x10 ⁷	11/05/2023
CHIKV (Vero)	1,6x10 ⁷	15/03/2023
CHIKV (Vero)	2,7x10 ⁷	15/03/2023

CHIKV (C6/36), *Chikungunya* produzido em células de linhagem de mosquito C6/36; **CHIKV (Vero)**, *Chikungunya* produzido em células Vero (epitelial de rim de macaco verde).

4.8 Ensaio com inibidores de NETs

Neutrófilos purificados (10^5 células/poço) foram cultivados em placas de 96 poços (Kasvi) e mantidos a 37°C com 5% de CO_2 por aproximadamente 20 minutos para adesão. Em seguida, as células foram pré-tratadas durante 30 minutos com os inibidores GW311616A (20 μM , Sigma), AS605240 (10 μM , Caymann Chemical), IC87114 (1 μM , Caymann Chemical) e Cloroamidina (12 μM , Caymann Chemical) ou com o quelante de cálcio BAPTA AM (10 μM). Posteriormente, o *Chikungunya* (MOI 5) foi adicionado e incubado por 4 horas a 37°C com 5% de CO_2 . Nos experimentos foram utilizados phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA, 100 nM) ou *Leishmania amazonensis* (1:1, Leishmania: neutrófilo), cultivadas no próprio laboratório, como controles positivos e DMSO como veículo. Os ensaios foram realizados em meio RPMI 1640 na ausência de soro.

4.9 Ensaios de infecção com o vírus *Chikungunya* em macrófagos, monócitos e células endoteliais.

Independentemente do tipo celular, a infecção com o CHIKV foi realizada utilizando a mesma metodologia. Resumidamente, soltamos as células (RAW 264.7 e HBMEC) de um poço de cada placa experimental a fim de sabermos a quantidade exata de células para o cálculo do MOI. Experimentos envolvendo macrófagos e monócitos foram realizados com MOI 5, enquanto os MOIs 0,1, 1 e 10 foram utilizados para a linhagem HBMEC. Após cálculo do MOI, efetuamos a lavagem dos poços com PBS, adicionamos o CHIKV e o *mock* diluídos em meio RPMI ou DMEM (dependendo do tipo celular) e incubamos as placas a 37°C , 5% de CO_2 por 1 hora e 30 minutos, efetuando agitação manual a cada 10 minutos. Após este tempo, os poços foram lavados três vezes com PBS e meio (RPMI ou DMEM) suplementado com 2% de soro fetal bovino foi adicionado aos poços. Os sobrenadantes foram recolhidos imediatamente (0 h) ou após 24, 48 horas de infecção. Posteriormente, foram centrifugados a 2000 rpm (Centrífuga Sorvall Heraeus – rotor #3328) por 5 minutos, e armazenados no -80°C até o momento de utilização.

4.10 Ensaio das NETs na replicação do CHIKV

Neutrófilos purificados ($5,5 \times 10^5$ células) foram plaqueados em placas de 24 poços (JetBiofil) e estimulados com PMA (100 nM) por 3 horas a 37°C, 5% de CO₂ para liberação das redes extracelulares de neutrófilos. Em seguida, os sobrenadantes foram recolhidos e incubados com o CHIKV (MOI 0,1 - padronizado para infecção de HBMEC) em eppendorfs a 37°C durante 1 hora. Em seguida, este conteúdo foi adicionado a células HBMEC durante 2 horas, sob suave agitação de 10 em 10 minutos, a 37°C, 5% de CO₂. Após este período, o sobrenadante foi removido e as células lavadas com PBS. O meio DMEM alta glicose (Gibco) suplementado com 2% de soro fetal bovino foi adicionado as células e estas incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por 24 horas. O sobrenadante gerado após o período de incubação foi recolhido, centrifugado a 400 xg durante 5 minutos e utilizado no ensaio do plaque.

4.11 Dosagem de DNA

Os sobrenadantes obtidos nos ensaios dos inibidores foram centrifugados a 400 g por 5 minutos a fim de remover o *debris* celular. Os sobrenadantes com *L. amazonensis* foram centrifugados novamente a 4000 rpm (Centrífuga Sorvall Heraeus – rotor #3328) durante 10 minutos para a remoção do parasito. A dosagem de DNA foi realizada utilizando-se o kit Quanti-iT™ PicoGreen™ dsDNA (Invitrogen Life Technologies). Para isso, sobrenadantes diluídos em tampão Tris-EDTA (1:1) foram incubados com PicoGreen™ em placas opacas (JetBiofil) de acordo com as instruções do fabricante. As leituras foram realizadas no leitor de placas SpectraMax® Paradigm® (Molecular Devices) a 485/538 nm (excitação/emissão).

4.12 Análise de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Neutrófilos purificados (10^5 /poço) foram incubados a 37°C, 5% de CO₂ por 20 minutos para adesão celular. Posteriormente, as células foram estimuladas com *Chikungunya* (MOI 5) ou PMA (100 nM) seguido da sonda fluorescente dihydrorhodamine 123 (DHR, 1,2µM, Sigma-Aldrich). O aparelho SpectraMax® Paradigm® (Molecular Devices) foi utilizado para análise da fluorescência de uma cinética de 120 ou 240 minutos, com leituras de 15 em 15 minutos a 500/540 nm (excitação/emissão).

4.13 Imunofluorescência

Neutrófilos foram plaqueados (2×10^5 /poço) em lamínulas de vidro (Knittel) revestidas com poli-L-lisina (0,001%, Sigma-Aldrich). Após adesão nas lamínulas, as células foram estimuladas com PMA (100nM) ou com *Chikungunya* (MOI 5) e incubados durante 4 horas a 37°C com 5% de CO₂. Em seguida, 8% de paraformaldeído (PFA, concentração final de 4%) foi adicionado delicadamente em cima dos sobrenadantes e este permaneceu por aproximadamente 16 horas a 4°C. Em lamínulas fixadas foram retiradas dos poços, lavadas três vezes com PBS e bloqueadas com 1% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Posteriormente, o anticorpo primário anti-elastase neutrofílica (Calbiochem, 1:500) foi adicionado e as lamínulas foram incubadas novamente a 37°C por 1 hora. O controle negativo do experimento foi feito com BSA, sem adição do anticorpo primário. As lamínulas foram lavadas três vezes com PBS e o anticorpo secundário Alexa Flúor 488 anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific, 1:800) adicionado a todas as condições. Uma nova incubação a 37°C por 1 hora em câmara úmida foi realizada com 3 lavagens posteriores com PBS. Logo após as lavagens, as lamínulas foram coradas com DAPI (1µg/ml, Sigma-Aldrich) por 5 minutos, lavadas duas vezes com PBS seguida de uma lavagem com água destilada. A montagem da lâmina para microscopia foi feita com o meio ProLong™ Gold Antifade with DAPI (Thermo Fisher Scientific). As marcações foram visualizadas por microscopia confocal, no microscópio Zeiss Elyra PS.1 com módulo LSM 710 e SR-SIM (do inglês, *Super Resolution Structure Illumination Microscopy*). Com o objetivo de não prejudicar a visualização das redes extracelulares, devido à sua fragilidade, todo o procedimento foi realizado sob uma gota, em cama feita com Parafilm®, segundo protocolo de Brinkmann *et al*, 2010.

4.14 Ensaio de viabilidade celular

Após o fim dos experimentos, os sobrenadantes foram centrifugados a 400 xg por 5 minutos e o precipitado foi descartado. Para condições que tinham *L. amazonensis*, foi realizada uma nova centrifugação a 4000 rpm (Centrífuga Sorvall Heraeus – rotor #3328) por 10 minutos para baixar o parasito. A avaliação da viabilidade celular foi feita pelo kit *CytoTox 96® Non-*

Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega), de acordo com instruções do fabricante. Resumidamente, 50µl dos sobrenadantes foram adicionados juntamente com 50 µl do substrato da enzima lactato desidrogenase e incubados por 30 minutos, protegidos da luz. Após este tempo, 50 µl de ácido acético 1M foi adicionado para parar a reação. A absorbância foi medida no aparelho SpectraMax® Paradigm® a 490 nm.

4.15 Ensaio de Plaque

O plaque foi realizado para avaliar o título viral do CHIKV. Para isso, células Vero foram plaqueadas (6×10^4 /poço) e incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ por 48 horas para atingirem confluência de 90%. Posteriormente, os poços foram lavados com PBS e incubados com diluições seriadas dos sobrenadantes armazenados dos experimentos. A infecção foi realizada durante 1 hora e 30 minutos a 37°C, 5% de CO₂, com agitação manual a cada 10 minutos. Após esse tempo, o sobrenadante foi retirado e os poços lavados três vezes com PBS. Ao final da lavagem, adicionou-se 2% de carboximetilcelulose (Sigma-Aldrich) aos poços e a placa foi mantida na incubadora nas mesmas condições. Após 48 horas, a carboximetilcelulose foi retirada e os poços lavados com PBS. A fixação foi realizada adicionando PFA 4% durante 20 minutos, seguida de uma segunda lavagem com PBS. Cristal violeta 1% foi adicionado aos poços para coloração e visualização dos plaques formados. O título viral foi expresso em PFU/ml (FIGURA 12).

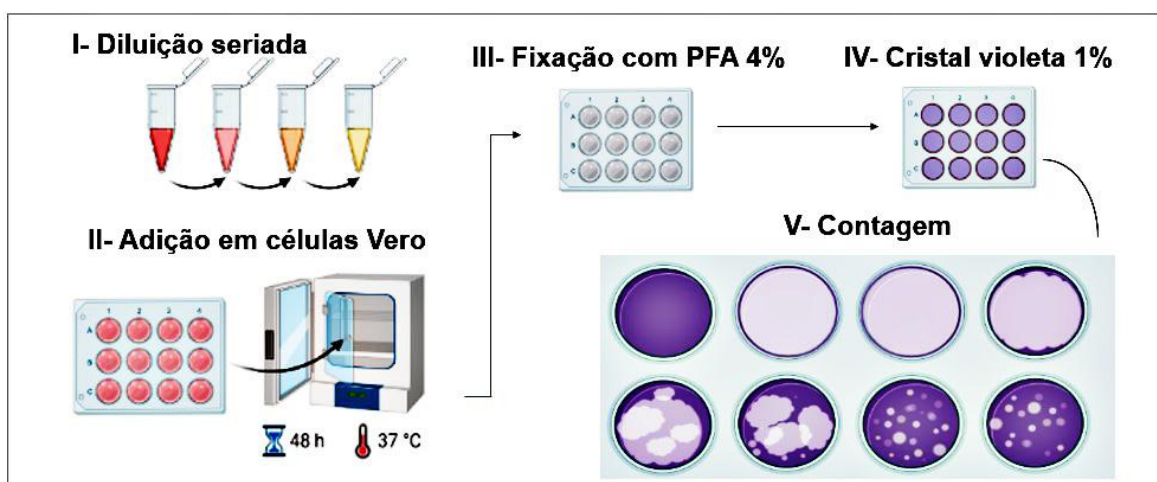


Figura 12. Esquema ilustrativo da metodologia empregada no ensaio de plaque. (I) Os sobrenadantes das células possivelmente infectadas foram diluídos de 10 em 10 vezes em meio DMEM alta glicose. Em seguida, as amostras foram (II) adicionadas em células Vero a 37°C, 5% de CO₂, sob suave agitação. Após 90 minutos, as células foram lavadas com PBS e mantidas com 2% de carboximetilcelulose por 48 horas na incubadora. (III) Posteriormente, retirou-se o meio, as células foram lavadas e fixadas com 4% de paraformaldeído (PFA) durante 20 minutos. (IV) Por fim, as células foram coradas com 1% de cristal violeta e (V) os plaques foram contados e expressos em PFU/ml.

4.16 Análise Estatística

As estatísticas foram feitas no programa GraphPad Prism com ANOVA e pós-teste de Fisher's LSD. Os experimentos foram realizados em duplicatas e o n amostral está descrito nas legendas. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Linhagens C6/36 e Vero na produção de *Chikungunya*.

Com o objetivo de produzir os estoques virais utilizados para os experimentos, optamos pela escolha de modelos celulares susceptíveis à infecção por CHIKV (Sudeep *et al.*, 2019). Inicialmente, utilizamos a linhagem de mosquito C6/36. As células foram infectadas com CHIKV no MOI 0,1 e analisadas após 24 e 48 horas. Através de microscopia de campo claro, o efeito citopático promovido pela infecção por CHIKV foi avaliado ao decorrer dos dois dias de produção. Nas primeiras 24 horas pós infecção (hpi), nenhuma alteração morfológica de perda da integridade da monocamada foi observada entre as células não infectadas (mock) ou infectadas com CHIKV, embora as infectadas apresentassem morfologia arredondada (**FIGURA 13A**). Já após 48 horas de infecção, as células infectadas apresentaram perda da integridade da monocamada, formação de aglomerados celulares e perda de adesão, características conhecidas do efeito citopático. Não houve alteração morfológica na condição mock. (**FIGURA 13A**).

Os títulos virais obtidos com a produção nas células C6/36 estavam de acordo com os achados na literatura, alcançando aproximadamente $3,6 \times 10^8$ PFU/ml. Em seguida, realizamos o ensaio de liberação de NETs, no qual neutrófilos foram estimulados com CHIKV nos MOIs 0,5 e 5. Nossos achados demonstraram que neutrófilos estimulados com o mock apresentaram níveis altos de NET-DNA no sobrenadante semelhante ao encontrado com CHIKV em ambos os MOIs (**FIGURA 13B**).

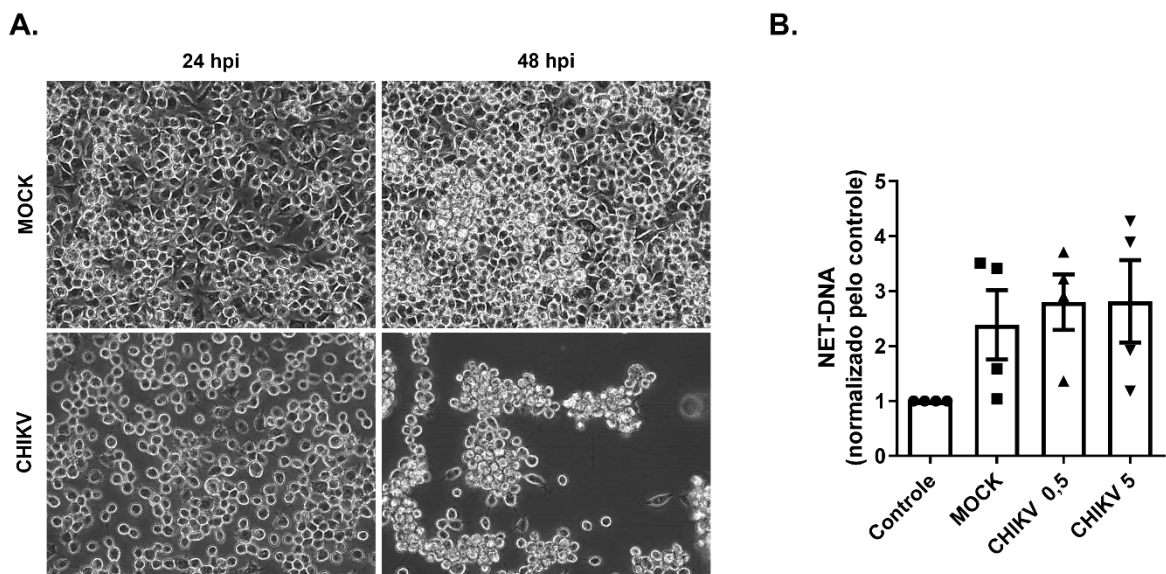


Figura 13. Produção do vírus *Chikungunya* em células C6/36. (A) Microscopia de campo claro de células C6/36 após serem infectadas com vírus *Chikungunya* (MOI 0,1) por 24 ou 48 horas. (B) Quantidade de NET-DNA detectada por PicoGreen™ no sobrenadante de neutrófilos humanos estimulados com mock ou com CHIKV (MOIs 0,5 e 5) durante 4 horas. O gráfico representa a média \pm erro de 4 doadores. hpi: horas pós infecção. Objetiva: 40X.

Posteriormente, decidimos testar a produção do CHIKV em células Vero. Nesta linhagem celular, o efeito citopático observado 48 hpi nas células infectadas apresentou além da perda de integridade da monocamada, a soltura sem formação de sincícios. Não visualizamos mudanças morfológicas na condição mock. (FIGURA 14A). Os títulos virais produzidos na célula Vero estavam de acordo com a literatura, sendo aproximadamente 10^7 PFU/ml. No ensaio de NETs, nosso principal intuito foi avaliar se o mock produzido na Vero repetia a detecção de NET-DNA vista anteriormente com o mock das células C6/36. Nossos dados demonstraram que a quantidade de NET-DNA no mock produzido em Vero foi semelhante ao encontrado em sobrenadante de neutrófilos controle, enquanto o mock produzido em C6/36 demonstrou alta detecção de NET-DNA semelhante ao encontrado em neutrófilos estimulados com *Leishmania amazonensis*, nosso controle positivo (FIGURA 14B). Com isto, concluímos que, devido aos níveis de NET-DNA, o CHIKV produzido em células Vero era a melhor escolha para prosseguir com os experimentos de indução de NETs em neutrófilos humanos.

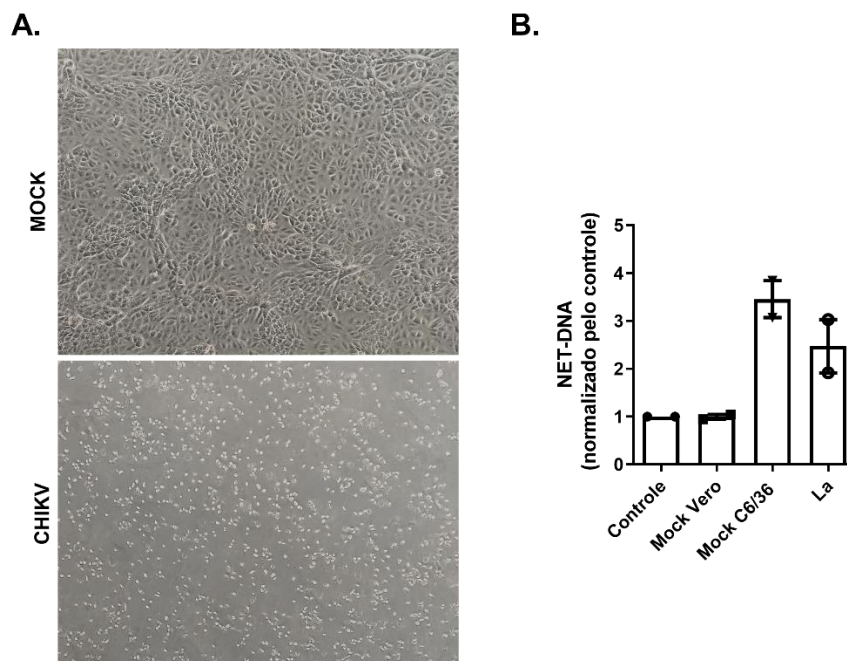


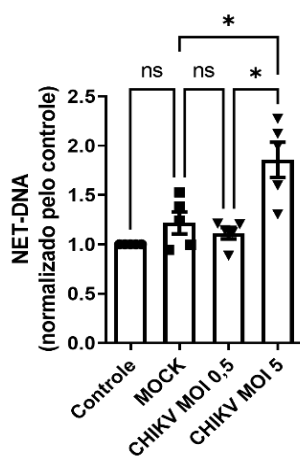
Figura 14. Produção do vírus *Chikungunya* em células Vero. (A) Fotografia de células Vero após serem infectadas com vírus *Chikungunya* (MOI 0,1) por 48 horas. (B) Quantidade de NET-DNA detectada por PicoGreen™ no sobrenadante de neutrófilos humanos estimulados com mock originado de células C6/36 ou Vero

durante 4 horas. O parasito *Leishmania amazonensis* (La, proporção neutrófilos:parasito, 1:1) foi utilizado como controle positivo. O gráfico representa a média \pm erro de 2 doadores.

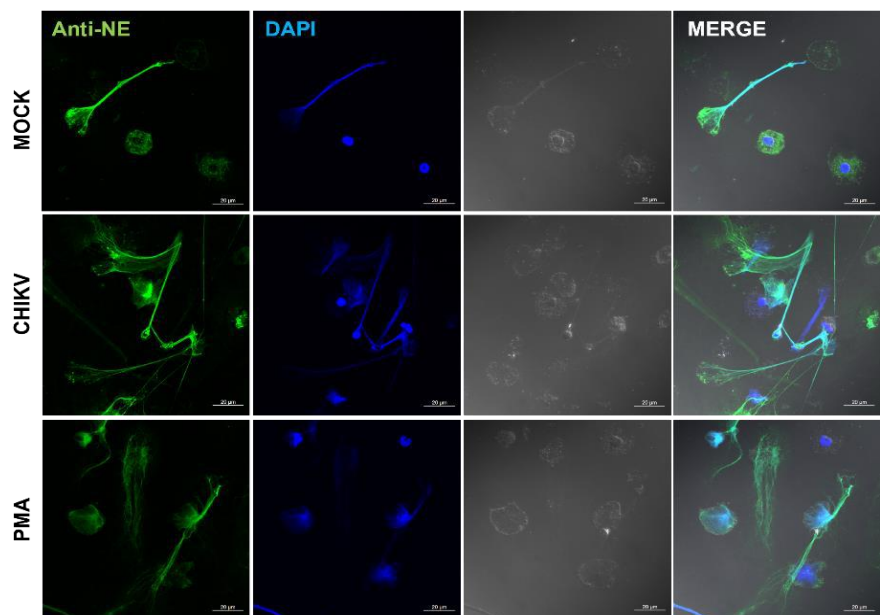
5.2 O vírus *Chikungunya* induz liberação de NETs em neutrófilos humanos

Por não termos detectado quantidades elevadas de NET-DNA no mock feito em células Vero, avaliamos se o CHIKV produzido nesta linhagem induzia a liberação de redes extracelulares em neutrófilos humanos. Após estímulo por 4 horas em diferentes MOIs, verificamos que o MOI 0,5 não induziu liberação de NETs. No entanto, nossos resultados demonstraram que para CHIKV no MOI 5 houve liberação de NETs em uma média de 1,5x mais redes em relação ao neutrófilos humanos incubados com mock ou com CHIKV MOI 0,5 (**FIGURA 15A**). Nossos achados com CHIKV foram confirmados por imunofluorescência. Neutrófilos submetidos à interação com o vírus (MOI 5) liberaram redes identificadas pela marcação dupla colocalizada de elastase neutrofilica (verde) e DNA (azul). PMA foi utilizado como controle positivo da marcação das NETs (**FIGURA 15B**). Ao avaliar a atividade da enzima lactato desidrogenase no sobrenadante da cultura de neutrófilos estimulados ou não com o vírus, observamos um aumento considerável no sobrenadante de neutrófilos incubados com CHIKV, sugerindo morte dessas células (**FIGURA 15C**).

A.



B.



C.

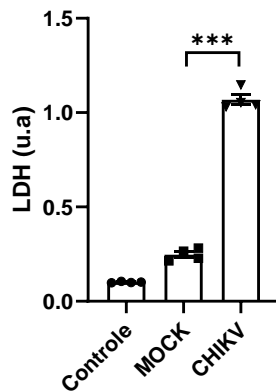
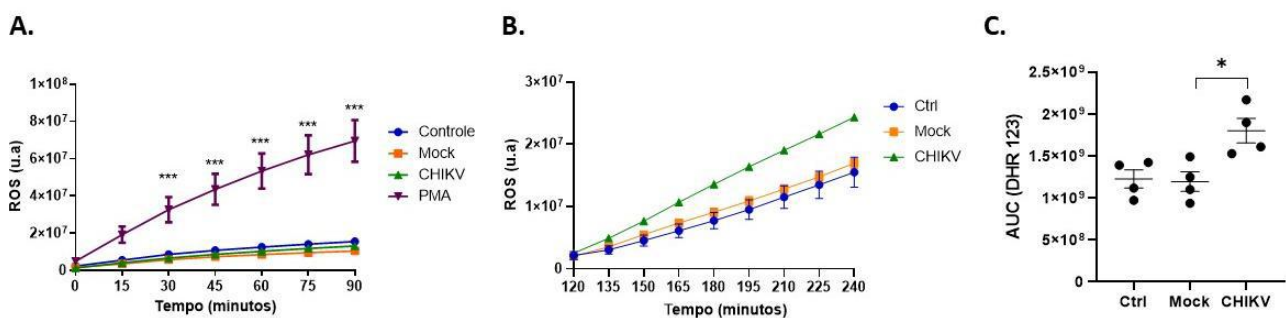


Figura 15. *Chikungunya* induz a liberação de NETs em neutrófilos humanos. (A) Quantidade de NET-DNA dosada por PicoGreen™ nos sobrenadantes de neutrófilos estimulados com CHIKV durante 4 horas. (B) Imunofluorescência das NETs liberadas pelos neutrófilos estimuladas com CHIKV (MOI 5) ou PMA (100nM) e marcadas com anticorpo anti-elastase neutrofilica (anti-NE, verde), DAPI (azul) e visualizadas no campo claro. O gráfico A representa a média \pm erro de 5 doadores. (C) Dosagem da enzima lactato desidrogenase no sobrenadante obtido em (A), utilizando o MOI 5. (C) O gráfico mostra os resultados obtidos de 4 doadores. A análise estatística foi realizada com ANOVA e pós teste de Fisher's LSD. * $p < 0,05$; *** $p < 0,01$; ns: não significativo. Barra de calibração: 20 μ m.

5.3 ROS é induzido tardiamente por CHIKV em neutrófilos humanos

A produção de espécies reativas de oxigênio possui papel central nos mecanismos envolvidos com a liberação de NETs (Thiam *et al*, 2020). Logo, buscamos avaliar se durante interação, o CHIKV induzia aumento da produção de ROS em neutrófilos humanos. Para isto, submetemos os neutrófilos a interação com CHIKV no MOI 5 e estimamos a produção de ROS em cinéticas de 90 minutos ou 240 minutos, utilizando PMA como controle positivo. Não houve



produção de ROS nas primeiras horas após estímulo com CHIKV (FIGURA 16A). Este resultado mudou após 180 minutos, no qual houve produção de ROS induzida por CHIKV em neutrófilos correspondendo aproximadamente a 40% de indução em relação ao mock (FIGURA 16B e 16C). Desta forma, nossos dados sugerem que o estímulo propiciado pelo vírus em neutrófilos humanos é capaz de induzir a produção de ROS em tempos superiores a 3 horas.

Figura 16. Produção de ROS em neutrófilos humanos estimulados com *Chikungunya*. (A) Cinética da quantidade de ROS liberada pelos neutrófilos estimulados com CHIKV (MOI 5) ou PMA (100nM) durante 90 minutos. (B) Cinética da quantidade de ROS produzida por neutrófilos a partir de 120 minutos de interação com o CHIKV, no equipamento. (C) Área da curva (AUC) da quantidade de ROS liberada pelos neutrófilos estimulados com CHIKV após 4 horas de estimulação. A análise estatística foi realizada com two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni para o gráfico A e ANOVA com pós teste de Fisher's LSD para o gráfico C. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$. u.a: unidades arbitrárias.

5.4 A PI3K e o cálcio na liberação das NETs estimuladas por CHIKV

As vias de sinalização envolvidas na liberação de NETs induzidas por CHIKV ainda não estão elucidadas. Portanto, fomos investigar o papel de alguns intermediários da sinalização nas NETs induzidas por CHIKV (FIGURA 17A e 17B). Inicialmente, inibimos individualmente as subunidades da PI3K expressas em células imunitárias, utilizando os inibidores AS60 (PI3K γ) e IC87 (PI3K δ). Como esperado, ambos os inibidores de PI3K foram eficientes em reduzir as NETs liberadas por *Leishmania*, nosso controle positivo, em percentuais de redução correspondendo a 30% (IC87) e 38% (AS60). Já em NETs induzidas por CHIKV, os inibidores geraram redução de liberação em níveis distintos de eficiência. Nossos achados sugerem que enquanto IC87 reduziu apenas 11% das NETs em relação ao CHIKV, o inibidor AS60 provocou redução em média de 26% das NETs induzidas pelo vírus (FIGURA 17A).

Para verificarmos o papel do cálcio intracelular, optamos por utilizar o quelante de Ca^{2+} clássico BAPTA-AM e PMA como controle positivo. Os resultados sugerem redução de aproximadamente 13% na liberação de NETs por CHIKV após adição do quelante, enquanto o controle positivo reduziu em média 19% (FIGURA 17B).

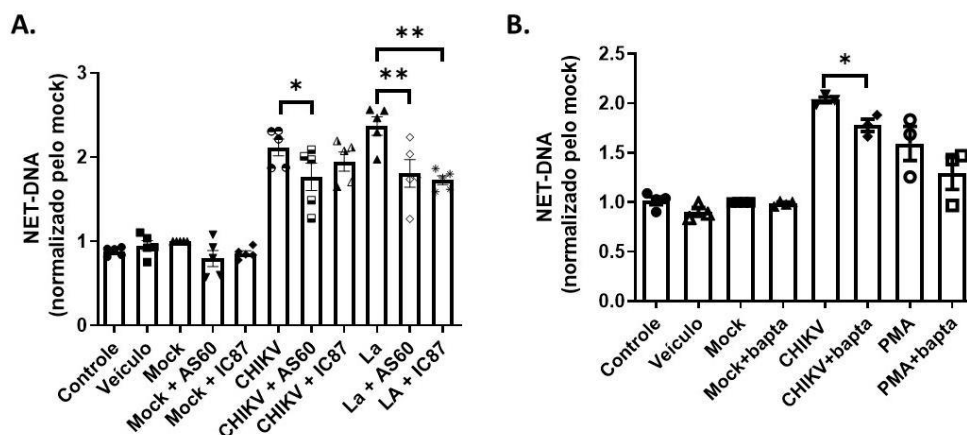
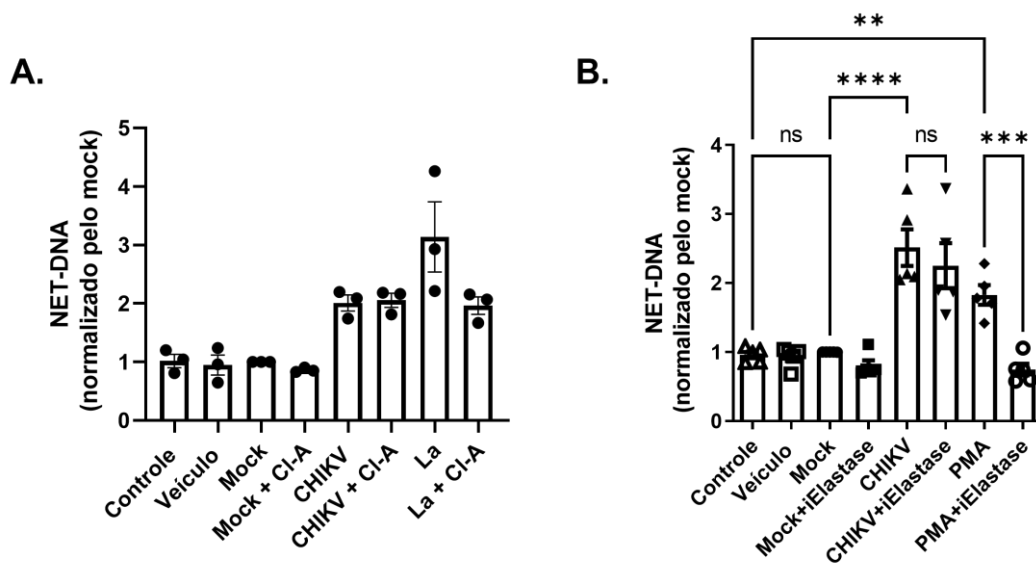


Figura 17. A sinalização da PI3K e do cálcio na liberação das NETs induzidas por *Chikungunya*. Neutrófilos humanos (10^5 /poço) foram pré-tratados com (A) o inibidor da PI3K γ (AS60, 10 μ M), inibidor da PI3K δ (IC87, 1 μ M) ou com o (B) quelante de cálcio BAPTA-AM (10 μ M) durante 30 minutos e posteriormente estimulados com CHIKV (MOI 5) por 4 horas. *Leishmania amazonensis* (La, 1 neutrófilo:1 La) e PMA (100 nM) foram utilizados

como controles positivos dos experimentos. DMSO foi utilizado como veículo. Os gráficos representam a média \pm erro da quantidade de NET-DNA dosada por PicoGreen™ nos sobrenadantes referentes a (A) 5 e (B) 4 indivíduos.

5.5 As PADs, a elastase neutrofílica e a gasdermina D nas NETs induzidas por CHIKV

A liberação de redes extracelulares envolve descondensação da cromatina dos neutrófilos. Dentre os fatores que estão envolvidos neste processo, pode-se destacar a influência de PADs na citrulinização das histonas e da elastase neutrofílica na clivagem das caudas das histonas. Por estas razões, buscamos avaliar se NETs induzidas por CHIKV dependem destas proteínas. Para alcançar este objetivo, utilizamos Cloramidina (inibidor de PADs) (**FIGURA 18A**) e GW311616A (inibidor de elastase) (**FIGURA 18B**). No entanto, nenhum destes inibidores levou a reduções significativas na liberação de NETs (**FIGURA 18A e 18B**), sugerindo que estes intermediários não participam das vias de sinalização induzidas por CHIKV. Em paralelo, nós avaliamos a participação da proteína gasdermina D na produção de NETs induzida por CHIKV. Apesar da elastase não estar envolvida na ativação dos neutrófilos, a inibição da gasdermina D reduziu em 20% a liberação de NETs por neutrófilos humanos (**FIGURA 18C**).



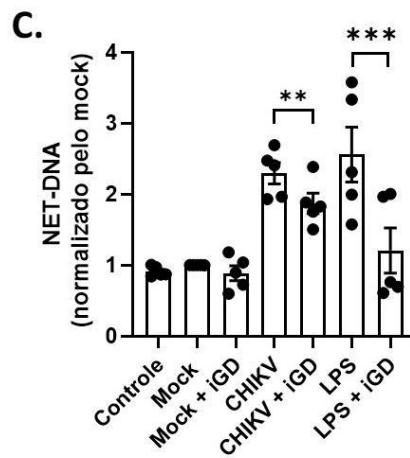


Figura 18. O papel das PADs , gasdermina e da elastase na liberação das NETs induzidas por *Chikungunya*. Neutrófilos humanos (10^5 /poço) foram pré-tratados com (A) o inibidor das PADs (cloroamidina, Cl-A, 12 μ M), com o (B) inibidor da elastase (GW311616A, 20 μ M) ou com (C) inibidor da gasdermina D (iGD, Disulfiram, 10 μ M) durante 30 minutos e posteriormente estimulados com CHIKV (MOI 5) por 4 horas. *Leishmania amazonensis* (La, 1 neutrófilo: 1 La), PMA (100 nM) ou LPS (100 ng/mL) foram utilizados como controles positivos dos experimentos, DMSO foi utilizado como veículo. Os gráficos representam a média \pm erro da quantidade de NET-DNA dosada por PicoGreen™ nos sobrenadantes referentes a (A) 3, (B) 5 e (C) 5 indivíduos. A análise estatística foi realizada com ANOVA e pós teste de Fisher's LSD. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns: não significativo

5.6 O vírus *Chikungunya* infecta linhagem de células endoteliais humana

Após avaliação dos intermediários de sinalização participantes da via de liberação de NETs por CHIKV, buscamos um modelo de infecção *in vitro*. Inicialmente, nos propomos a caracterizar a infecção de células mieloides, principalmente macrófagos de linhagem murina (RAW 264.7), de cultura primária (BMDMs e PBMCs) e linhagem de monócitos humanos (THP-1), utilizando o CHIKV no MOI 5. No entanto, os resultados das nossas titulações (expressos em PFU/ml) não evidenciaram aumento nos plaques formados entre os períodos de 0, 24 ou 48 horas, o que demonstra ausência de produção de novas partículas infecciosas nestas células testadas (FIGURA 19 A-D). Como alternativa, nosso próximo passo consistiu em testar se conseguíamos infectar células endoteliais. Diferente do que foi visto acima, as células endoteliais HBMEC foram infectadas por CHIKV, com aumento logarítmico dos títulos virais em todos os MOI testados (MOI 0,1, 1 e 10) quando comparados entre 0 e 24 horas (FIGURA 19E).

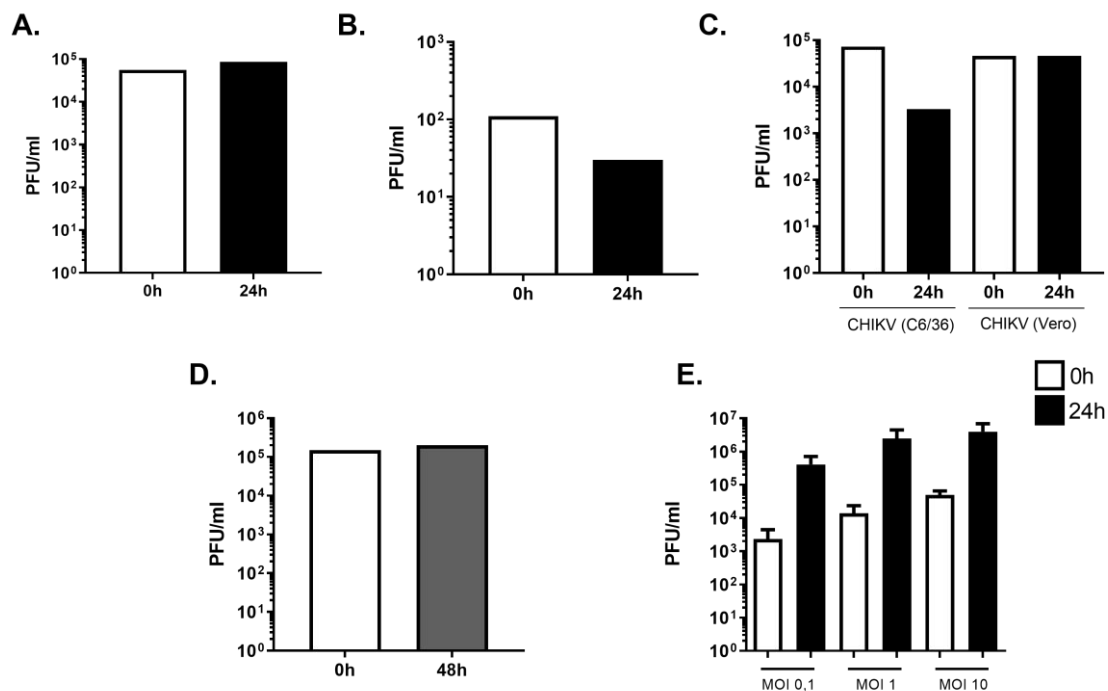


Figura 19. Caracterização da infecção pelo vírus *Chikungunya* em diferentes tipos celulares. Macrófagos provenientes da (A) linhagem murina RAW264.7, de (B) cultura primária murina e de (C) diferenciação de PBMCs humanos foram submetidos a infecção por CHIKV (MOI 5) durante 120 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas e os sobrenadantes foram coletados em diferentes tempos. A mesma metodologia foi utilizada para a (D) linhagem de monócitos humanos THP-1. (E) Curva de MOIs na linhagem de células HBMEC nos tempos de 0 e 24 horas. O ensaio do plaque foi utilizado para detecção da carga viral nos sobrenadantes, sendo expresso em PFU/ml. Os gráficos A-D apresentam resultado de 01 experimento, enquanto o gráfico E evidencia o resultado de 03 experimentos independentes.

5.7 As NETs na infecção da HBMEC pelo CHIKV

As redes extracelulares podem capturar diretamente o microrganismo e limitar a infecção de novas células alvo. Como observamos que as células HBMEC foram permissivas a infecção por *Chikungunya* de forma a produzir significativamente novas partículas virais em relação ao ponto 0 horas (FIGURA 20E), buscamos avaliar se as NETs eram capazes de modular a infecção pelo CHIKV nestas células. Para isso, neutrófilos foram estimulados com PMA durante 4 horas para a produção de NETs. Os sobrenadantes foram quantificados e confirmaram o dobro de indução de NET-DNA na condição estimulada com PMA (FIGURA 20A). Posteriormente, estes sobrenadantes foram incubados com o CHIKV durante 1 hora e este conteúdo foi adicionado as células HBMEC. Contudo, as células HBMEC que receberam sobrenadante rico em NETs apresentaram o mesmo título viral (10^6 PFU/ml) das células estimuladas apenas com o vírus ou com sobrenadante que não possuía NETs, demonstrando que as redes não influenciaram na infecção celular (FIGURA 20B).

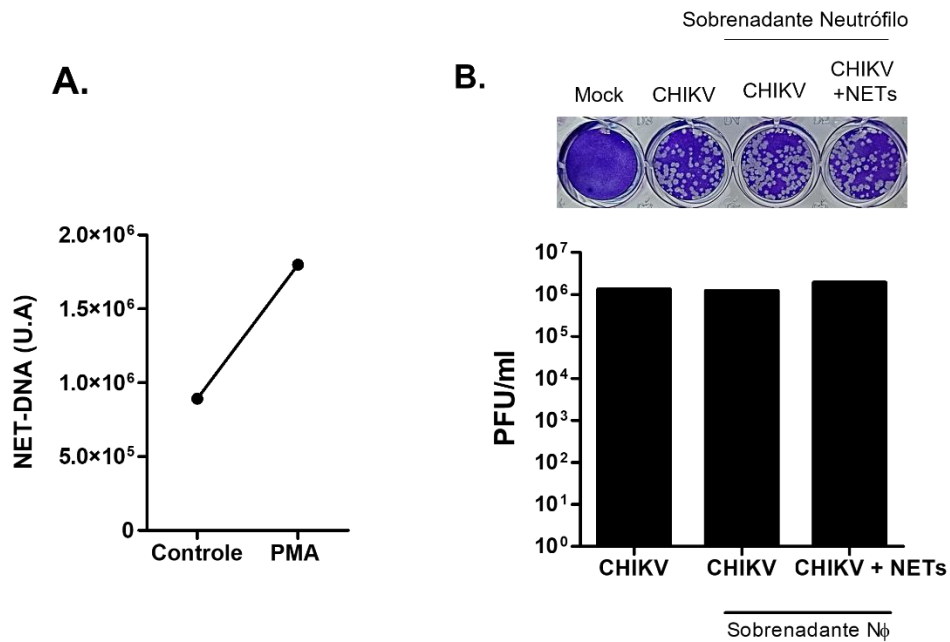


Figura 20. As NETs na infecção das células HBMEC pelo vírus *Chikungunya*. Neutrófilos humanos ($5,5 \times 10^5$ células) foram plaqueados e estimulados com PMA (100 nM) por 4 horas para indução da liberação das NETs. (A) A quantificação da NET-DNA foi realizada por PicoGreenTM. Em seguida, os sobrenadantes foram recolhidos e incubados com o CHIKV (MOI 0,1) em microtubos a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, o vírus e as NETs foram adicionados na célula HBMEC durante 2 horas, sob suave agitação de 10 em 10 minutos. Após este período, o sobrenadante foi removido, as células foram lavadas e mantidas por 24 horas em meio DMEM suplementado com 2% de SFB. O sobrenadante foi recolhido e a carga viral foi quantificada através do (B) ensaio de plaque. Os gráficos evidenciam o resultado de 01 indivíduo.

6 DISCUSSÃO

As redes extracelulares produzidas por neutrófilos podem ser induzidas em resposta a uma ampla variedade de estímulos por diferentes vias de sinalização. O papel destas estruturas nas infecções virais vem ganhando destaque nos últimos anos. O vírus Chikungunya induz a liberação de NETs (Hiroki *et al.* 2020), mas os mecanismos envolvidos na liberação não estão elucidados. Neste projeto nós investigamos as moléculas sinalizadoras envolvidas na ativação de neutrófilos pelo vírus Chikungunya. Nosso trabalho aponta para um possível papel das espécies reativas de oxigênio, da enzima PI3k, do influxo de cálcio e da gasdermina D. No entanto, até o momento, estamos trabalhando apenas com a possibilidade destas moléculas estarem envolvidas, tendo em vista que precisamos repetir experimentos e confirmar nossos dados preliminares.

A capacidade em induzir a produção de NETs por vírus vem sendo demonstrada ao longo dos anos. Desta forma, HIV-1, SARS-CoV-2, vírus influenza, RSV e CHIKV já foram relatados como potentes ativadores deste mecanismo (Saitoh *et al.*, 2012; Funchal *et al.*, 2015; Cortjens *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2018; Hiroki *et al.*; Veras *et al.*, 2020; Yi *et al.*, 2022). O aumento da liberação de redes por neutrófilos induzido pelo vírus *Chikungunya* corrobora com os dados demonstrados por Hiroki *et al.* (2020) em modelo murino. Nossa demonstração de ativação de neutrófilos humanos *in vitro*, atrelada às informações em neutrófilos murinos e detecções de NETs em amostras de sangue de pacientes que apresentaram diagnóstico de CHIKD (proporcional a carga viral) (Hiroki *et al.*, 2020), sugerem que estas estruturas possam ter alguma função durante a infecção por este vírus.

A liberação das NETs requer sinalização intracelular e eventos nucleares que permitem a descondensação da cromatina. Desde os primeiros relatos nessa área, a produção de espécies reativas de oxigênio tem sido associada à liberação das NETs (Fuchs *et al.*, 2007). Nossos resultados demonstraram um aumento estimado em 40% na produção de ROS (em relação ao mock) apenas a partir de 3 horas de incubação com o vírus. Estes dados contrastam com a produção de ROS em neutrófilos murinos estimulados com CHIKV no mesmo MOI, os quais apresentam pico de produção de ROS 1 hora após estímulo com o vírus (Hiroki *et al.*, 2020). Numerosos estudos que empregam cinéticas de até duas horas, incluindo dados anteriores no nosso grupo, e distintos estímulos, como PMA, vírus sincicial respiratório (RSV), *Leishmania amazonensis* e *Staphylococcus aureus*. Todos estes trabalhos demonstram aumento na produção

de ROS em 2h de estímulo (Fuchs *et al*, 2007; Rochael *et al*, 2016; Kenny *et al*, 2017; Muraro *et al*, 2018). Embora esperássemos que CHIKV induzisse rápido aumento de ROS, tendo como critério os dados de neutrófilos murinos, no entanto, alguns fatores podem estar por detrás desta diferença, como: a sensibilidade das metodologias empregadas para quantificação de ROS ou a origem destas células (sangue periférico humano *versus* medula óssea murina). Para determinar se a produção de ROS é de fato necessária para a liberação de NETs, seria preciso a visualização do comprometimento da extrusão de redes após inibição das fontes produtoras de ROS (Stoiber *et al*, 2015; Buck *et al*, 2019; Kouki *et al*, 2023). Além disso, seria interessante avaliar um possível envolvimento mitocondrial na produção de ROS envolvida na liberação das NETs, bem como espécies reativas de nitrogênio.

A descondensação da cromatina, etapa crucial para formação de NETs, pode ser alcançada por meio da atividade da elastase, MPO e PAD4 (Wang *et al*, 2009; Papayannopoulos *et al*, 2010; Leshner *et al*, 2012). O papel da enzima PAD parece ser controverso. A produção de NETs após estímulo por PMA, ionóforo de cálcio, nigericina ou *Candida albicans* envolve MPO e elastase. Apesar de haver citrulinização das histonas pela PAD4, este evento não é relevante para a formação das redes (Kenny *et al*, 2017). A produção de NETs em resposta ao vírus dengue também parece acontecer de forma independente de PAD4 (Opasawatchai *et al*, 2019). Para *Leishmania*, por exemplo, a liberação das redes ocorre de forma parcialmente dependente de PAD4 e elastase (Rochael *et al.*, 2015). Apesar de estranho, nossos dados demonstram que a ativação de NETs por CHIKV independe das enzimas elastase e PAD. Podemos levantar algumas hipóteses possíveis para explicar estes resultados, tais como: **i)** ação da mieloperoxidase, em um mecanismo dependente de ROS, **ii)** a inibição individual de uma enzima pode não ter resultado em fenótipo de menor produção das NETs porque a outra enzima compensa e realiza a descondensação da cromatina, ou **iii)** outros mecanismos ainda não estabelecidos. Por exemplo, modulações epigenéticas, como acetilação ou metilação de histonas, podem estar envolvidas na produção de NETs (Hamam *et al*; Hamam e Palaniyar, 2019a, 2019b, 2019c; Poli *et al*, 2021). O envolvimento da caspase 11, tendo em vista nossos dados com o inibidor da Gasdermina D, também não pode ser descartado.

Além das espécies reativas de oxigênio e os eventos nucleares, durante a formação das NETs, a ativação de PKC, ERK, PI3K e mobilização de cálcio é necessária dependendo do estímulo. Atualmente, temos conhecimento de que diferentes estímulos podem desencadear vias distintas para a liberação das NETs (Kenny *et al*, 2017). Para a elaboração deste projeto,

decidimos avaliar moléculas já descritas na literatura por participarem deste mecanismo. Apesar de, até este ponto, não podermos afirmar com certeza quais são os intermediários envolvidos na ativação de NETs por CHIKV, a ativação de PI3K e o influxo de cálcio parecem ser potenciais eventos.

Diversos microrganismos como bactérias, fungos, protozoários e vírus podem ativar vias de liberação de NETs pelos receptores de reconhecimento de padrão, receptores Fc ou receptores de complemento (Kaplan e Radic, 2012). Hiroki *et al.* (2020) caracterizou a dependência do engajamento de TLR7 para ativação de NETs induzidas por *Chikungunya* durante a infecção. Entretanto, não podemos excluir uma possível participação de outros receptores já descritos como receptores que interagem com o vírus. Os receptores e moléculas de superfície Mxra8, glicosaminoglicanos, receptores de fosfatidilserina (TAM e TIM), DC-SIGN, CD147 e a proteína FHL1 (Meertens *et al.*, 2019; Reyes-Ballista *et al.*, 2023) já foram demonstrados como alternativas para entrada do vírus (Constant *et al.*, 2021). Como as vias de sinalização desencadeadas por esta ligação aos receptores podem variar com o estímulo, a complexidade do entendimento dos intermediários envolvidos só aumenta.

Desde sua descoberta, as funções principais atribuídas às NETs são prender e matar/neutralizar patógenos. Sabemos hoje que estas redes desempenham outras funções, em especial a de modular outras células do sistema imunitário. Além disso, é necessária uma fina regulação da ativação das NETs para que não haja a perda da função protetora e estímulo à doenças (Brinckmann *et al.*, 2004; Papayannopoulos, 2018). Na infecção por dengue, por exemplo, as NETs parecem ter um papel controverso. *In vitro*, o vírus induz a produção de NETs e estas redes diminuem a capacidade do vírus de infectar outras células. Contudo, ao analisar o soro de pacientes com dengue hemorrágica, Opasawatchai e colaboradores (2018) observaram maiores concentrações de NETs em comparação com pacientes com casos mais leves da doença. Na verdade, altas concentrações de NETs têm sido relatadas em diversas doenças. Como exemplo, no soro de pacientes com sepse estas concentrações elevadas estão associadas com piora do quadro e falha múltipla de órgãos (Li e Tablin, 2018). Estas estruturas estão envolvidas na resposta inflamatória na psoríase e são fontes de autoantígenos em pacientes com lúpus sistêmico eritematoso (Hakkim *et al.*, 2010; Czerwińska e Owczarczyk-Saczonek; Wang *et al.*, 2022). Com relação à infecção por Chikungunya, até o presente momento, apenas um trabalho relata um possível papel protetor na infecção. A infecção de camundongos na presença de DNase resulta em aumento da carga viral 24h pós-inoculação,

sugerindo que as NETs são importantes para controlar a infecção no momento inicial. Contudo, não sabemos ainda o papel das NETs durante o curso da infecção. É possível que as redes estimulem a produção de interferon do tipo I, como já demonstrado em outras condições (Garcia-Romo *et al.*, 2011). Além disso, é possível que as redes ao longo da infecção exacerbem a resposta inflamatória e, desta forma, contribuam para o agravamento da doença.

Com objetivo de avaliar o papel das NETs na infecção, buscamos primeiramente o melhor modelo celular *in vitro* permissivo à replicação por *Chikungunya*. Dentre as células descritas como reservatórios ou susceptíveis, nossos dados demonstraram que apenas as células de linhagem endotelial humana (HBMEC) apresentaram infecção produtiva, confirmando os resultados de infecção bem-sucedidas em células endoteliais *in vitro* (Lim e Chu, 2014). Embora já tenha sido demonstrado por diferentes artigos a infecção de macrófagos humanos e murinos com CHIKV, em nossos ensaios estas células mieloides não foram capazes de produzir novas partículas viáveis (Kumar *et al.*, 2012; Guerrero-Arguero *et al.*, 2020). Com estes resultados, seguimos para o próximo passo para avaliar o papel modulatório das NETs utilizando HBMEC como modelo. Contudo, os sobrenadantes contendo ou não as redes extracelulares estimuladas com PMA não induziram qualquer alteração nos títulos virais. Estes dados vão contra a modulação apresentada em neutrófilos murinos (Hiroki *et al.*, 2020), onde foi vista a captura e neutralização do vírus. A provável falha da modulação pode ser um resultado da especificidade da rede ou um problema metodológico. O fato é que nestes experimentos, como descrito acima, as redes foram produzidas utilizando o PMA como estímulo e não o próprio vírus. A estrutura e composição das NETs podem variar dependendo da fonte indutora (Petretto *et al.*, 2019). Desta forma, seria justo sugerir que em outro contexto as NETs induzidas por CHIKV apresentariam composição distinta (Petretto *et al.*, 2019) e, portanto, funções distintas.

Em suma, o trabalho aqui apresentado corresponde ao início da caracterização das vias moleculares envolvidas na liberação das NETs induzidas por CHIKV. Apesar de não podermos ainda afirmar quais são os intermediários envolvidos na geração de NETs neste contexto, nossos dados preliminares sugerem a participação de PI3K e cálcio. As NETs não modularam a infecção de células endoteliais permissivas, porém, mais experimentos precisam ser realizados para confirmar estes resultados. Como perspectivas futuras, além de concluirmos as vias envolvidas, nosso grupo pretende avaliar os receptores envolvidos na produção das redes em

resposta ao vírus. Por fim, avaliaremos também o papel da saliva do mosquito vetor, *Aedes aegypti* na produção das NETs e o impacto na infecção.

7 CONCLUSÕES

- O mock produzido nas células Vero foi mais adequado para utilização nos experimentos de quantificação de NETs;
- O vírus Chikungunya induziu a liberação de NETs em neutrófilos humanos;
- O CHIKV estimulou a liberação de espécies reativas de oxigênio a partir de três horas;
- Nossos dados sugerem o papel de PI3K, cálcio e gasdermina D na liberação de NETs induzidas por CHIKV;
- As redes extracelulares induzidas por CHIKV são independentes de elastase e PAD.
- As NETs não foram eficientes na diminuição da infecção de células endoteliais suscetíveis ao CHIKV.

REFERÊNCIAS

- ABDELNABI, Rana; NEYTS, Johan; DELANG, Leen. Towards antivirals against chikungunya virus. **Antiviral Research**, v. 121, p. 59–68, 2015.
- AHOLA, Tero; MCINERNEY, Gerald; MERITS, Andres. Alphavirus RNA replication in vertebrate cells. *In: Advances in Virus Research*. [s.l.]: Elsevier, 2021, v. 111, p. 111–156. <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S006535272100021X>>.
- AHOLA, Tero; MERITS, Andres. Functions of Chikungunya Virus Nonstructural Proteins. *In: OKEOMA, Chioma M. (Org.). Chikungunya Virus*. Cham: Springer International Publishing, 2016, p. 75–98. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-42958-8_6>. Acesso em: 10 jun. 2023.
- ARTS, Janine Jg; MAHLANDT, Eike K; GRÖNLOH, Max Lb; *et al.* Endothelial junctional membrane protrusions serve as hotspots for neutrophil transmigration. **eLife**, v. 10, p. e66074, 2021.
- BALTIMORE, D. Expression of animal virus genomes. **Bacteriological Reviews**, v. 35, n. 3, p. 235–241, 1971.
- BARTHOLOMEEUSEN, Koen; DANIEL, Matthieu; LABEAUD, Desiree A.; *et al.* Chikungunya fever. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 9, n. 1, p. 17, 2023.
- BASORE, Katherine; KIM, Arthur S.; NELSON, Christopher A.; *et al.* Cryo-EM Structure of Chikungunya Virus in Complex with the Mxra8 Receptor. **Cell**, v. 177, n. 7, p. 1725–1737.e16, 2019.
- BELAMBRI, Sahra A.; ROLAS, Loïc; RAAD, Houssam; *et al.* NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 48, p. e12951, 2018.
- BORREGAARD, Niels; SØRENSEN, Ole E.; THEILGAARD-MÖNCH, Kim. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 8, p. 340–345, 2007.
- BRINKMANN, Volker; LAUBE, Britta; ABU ABED, Ulrike; *et al.* Neutrophil Extracellular Traps: How to Generate and Visualize Them. **Journal of Visualized Experiments**, n. 36, p. 1724, 2010.
- BRINKMANN, Volker; REICHARD, Ulrike; GOOSMANN, Christian; *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 2004.
- BUCK, Alicia; SANCHEZ KLOSE, Felix P.; VENKATAKRISHNAN, Vignesh; *et al.* DPI Selectively Inhibits Intracellular NADPH Oxidase Activity in Human Neutrophils. **ImmunoHorizons**, v. 3, n. 10, p. 488–497, 2019.
- BURN, Garth Lawrence; FOTI, Alessandro; MARSMAN, Gerben; *et al.* The Neutrophil. **Immunity**, v. 54, n. 7, p. 1377–1391, 2021.
- CAIN, Derek W.; SNOWDEN, Pilar B.; SEMPOWSKI, Gregory D.; *et al.* Inflammation Triggers Emergency Granulopoiesis through a Density-Dependent Feedback Mechanism. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e19957, 2011.
- CAPUCETTI, Arianna; ALBANO, Francesca; BONECCHI, Raffaella. Multiple Roles for Chemokines in Neutrophil Biology. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1259, 2020.
- CHAPMAN, Elinor A.; LYON, Max; SIMPSON, Deborah; *et al.* Caught in a Trap? Proteomic Analysis of Neutrophil Extracellular Traps in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 423, 2019.
- CHEN, Kaiwen W.; MONTELEONE, Mercedes; BOUCHER, Dave; *et al.* Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps. **Science Immunology**, v. 3, n. 26, p. eaar6676, 2018.
- CHEVILLON, Christine; BRIANT, Laurence; RENAUD, François; *et al.* The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 80–88, 2008.

- CONSTANT, Larissa E. C.; RAJSFUS, Bia F.; CARNEIRO, Pedro H.; *et al.* Overview on Chikungunya Virus Infection: From Epidemiology to State-of-the-Art Experimental Models. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 744164, 2021.
- CORTJENS, Bart; DE BOER, Onno J; DE JONG, Rineke; *et al.* Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease: NETs in RSV disease. **The Journal of Pathology**, v. 238, n. 3, p. 401–411, 2016.
- COSTA, Lourrany Borges; BARRETO, Francisca Kalline De Almeida; BARRETO, Marina Carvalho Arruda; *et al.* Epidemiology and Economic Burden of Chikungunya: A Systematic Literature Review. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 6, p. 301, 2023.
- COUGOULE, Céline; CONSTANT, Patricia; ETIENNE, Gilles; *et al.* Lack of Fusion of Azurophil Granules with Phagosomes during Phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis* by Human Neutrophils Is Not Actively Controlled by the Bacterium. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 3, p. 1591–1598, 2002.
- CZERWIŃSKA, Joanna; OWCZARCZYK-SACZONEK, Agnieszka. The Role of the Neutrophilic Network in the Pathogenesis of Psoriasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1840, 2022.
- DE CARVALHO OLIVEIRA, Vanessa; TATSIY, Olga; MCDONALD, Patrick P. Phosphoinositol 3-kinase-driven NET formation involves different isoforms and signaling partners depending on the stimulus. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1042686, 2023.
- DE LIMA CAVALCANTI, Thaise Yasmine Vasconcelos; PEREIRA, Mylena Ribeiro; DE PAULA, Sergio Oliveira; *et al.* A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development. **Viruses**, v. 14, n. 5, p. 969, 2022.
- DE OLIVEIRA-JUNIOR, E. B.; BUSTAMANTE, J.; NEWBURGER, P. E.; *et al.* The Human NADPH Oxidase: Primary and Secondary Defects Impairing the Respiratory Burst Function and the Microbicidal Ability of Phagocytes: Human NADPH Oxidase Defects. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, n. 5, p. 420–427, 2011.
- DELGADO-RIZO, Vidal; MARTÍNEZ-GUZMÁN, Marco A.; IÑIGUEZ-GUTIERREZ, Liliana; *et al.* Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00081/full>>. Acesso em: 23 jun. 2023.
- DESOUZA-VIEIRA, Thiago; GUIMARÃES-COSTA, Anderson; ROCHAEL, Natalia C; *et al.* Neutrophil extracellular traps release induced by *Leishmania*: role of PI3K γ , ERK, PI3K σ , PKC, and [Ca²⁺]. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 4, p. 801–810, 2016.
- DWYER, Markryan; SHAN, Qiang; D'ORTONA, Samantha; *et al.* Cystic Fibrosis Sputum DNA Has NETosis Characteristics and Neutrophil Extracellular Trap Release Is Regulated by Macrophage Migration-Inhibitory Factor. **Journal of Innate Immunity**, v. 6, n. 6, p. 765–779, 2014.
- EICHELBERGER, Kara R.; GOLDMAN, William E. Manipulating neutrophil degranulation as a bacterial virulence strategy. **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 12, p. e1009054, 2020.
- ELMASRI, Zeinab; NASAL, Benjamin L.; JOSE, Joyce. Alphavirus-Induced Membrane Rearrangements during Replication, Assembly, and Budding. **Pathogens**, v. 10, n. 8, p. 984, 2021.
- FAURSCHOU, Mikkel; BORREGAARD, Niels. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 14, p. 1317–1327, 2003.
- FEITZ, Wouter J. C.; SUNTHARALINGHAM, Samuel; KHAN, Meraj; *et al.* Shiga Toxin 2a Induces NETosis via NOX-Dependent Pathway. **Biomedicines**, v. 9, n. 12, p. 1807, 2021.
- FOX, Julie M.; DIAMOND, Michael S. Immune-Mediated Protection and Pathogenesis of Chikungunya Virus. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 11, p. 4210–4218, 2016.

- FUCHS, Tobias A.; ABED, Ulrike; GOOSMANN, Christian; *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **Journal of Cell Biology**, v. 176, n. 2, p. 231–241, 2007.
- FUNCHAL, Giselle A.; JAEGER, Natália; CZEPIELEWSKI, Rafael S.; *et al.* Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Promotes TLR-4–Dependent Neutrophil Extracellular Trap Formation by Human Neutrophils. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0124082, 2015.
- GABRIEL, Christelle; HER, Zhisheng; NG, Lisa F.P. Neutrophils: Neglected Players in Viral Diseases. **DNA and Cell Biology**, v. 32, n. 12, p. 665–675, 2013
- GALÁN-HUERTA, K.A.; RIVAS-ESTILLA, A.M.; FERNÁNDEZ-SALAS, I.; *et al.* Chikungunya virus: A general overview. **Medicina Universitaria**, v. 17, n. 68, p. 175–183, 2015.
- GALLUZZI, Lorenzo; VITALE, Ilio; AARONSON, Stuart A.; *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486–541, 2018.
- GANESAN, Vaishnavi; DUAN, Bin; REID, St. Chikungunya Virus: Pathophysiology, Mechanism, and Modeling. **Viruses**, v. 9, n. 12, p. 368, 2017.
- GARCIA-ROMO, Gina S.; CAIELLI, Simone; VEGA, Barbara; *et al.* Netting Neutrophils Are Major Inducers of Type I IFN Production in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 73, 2011. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3001201>.
- GARDINER, Gail J.; DEFFIT, Sarah N.; MCLETCHIE, Shawna; *et al.* A Role for NADPH Oxidase in Antigen Presentation. **Frontiers in Immunology**, v. 4, 2013. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00295/abstract>.
- GAROFF, Henrik; SJÖBERG, Mathilda; CHENG, R. Holland. Budding of alphaviruses. **Virus Research**, v. 106, n. 2, p. 103–116, 2004.
- GASQUE, Philippe; COUDERC, Therese; LECUIT, Marc; *et al.* Chikungunya Virus Pathogenesis and Immunity. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 4, p. 241–249, 2015.
- GIARDINO, Giuliana; CICALESE, Maria Pia; DELMONTE, Ottavia; *et al.* NADPH Oxidase Deficiency: A Multisystem Approach. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–23, 2017.
- GIERLIKOWSKA, Barbara; STACHURA, Albert; GIERLIKOWSKI, Wojciech; *et al.* Phagocytosis, Degranulation and Extracellular Traps Release by Neutrophils—The Current Knowledge, Pharmacological Modulation and Future Prospects. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 666732, 2021.
- GÓMEZ, Marcela; MARTINEZ, David; MUÑOZ, Marina; *et al.* Aedes aegypti and Ae. albopictus microbiome/virome: new strategies for controlling arboviral transmission? **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, p. 287, 2022.
- GOULD, Ernest; PETTERSSON, John; HIGGS, Stephen; *et al.* Emerging arboviruses: Why today? **One Health**, v. 4, p. 1–13, 2017.
- GUERRERO-ARGUERO, Israel; HØJ, Taalin R.; TASS, E. Shannon; *et al.* A comparison of Chikungunya virus infection, progression, and cytokine profiles in human PMA-differentiated U937 and murine RAW264.7 monocyte derived macrophages. **PLOS ONE**, v. 15, n. 3, p. e0230328, 2020.
- GUPTA, Anurag Kumar; GIAGLIS, Stavros; HASLER, Paul; *et al.* Efficient Neutrophil Extracellular Trap Induction Requires Mobilization of Both Intracellular and Extracellular Calcium Pools and Is Modulated by Cyclosporine A. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e97088, 2014.
- GUPTA, Anurag Kumar; JOSHI, Manjunath B.; PHILIPPOVA, Maria; *et al.* Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. **FEBS Letters**, v. 584, n. 14, p. 3193–3197, 2010.

- HAKKIM, Abdul; FUCHS, Tobias A; MARTINEZ, Nancy E; *et al.* Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 2, p. 75–77, 2011.
- HAKKIM, Abdul; FÜRNRÖHR, Barbara G.; AMANN, Kerstin; *et al.* Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 21, p. 9813–9818, 2010.
- HAMAM, Hussein J.; PALANIYAR, Nades. Histone Deacetylase Inhibitors Dose-Dependently Switch Neutrophil Death from NETosis to Apoptosis. **Biomolecules**, v. 9, n. 5, p. 184, 2019c.
- HAMAM, Hussein; KHAN, Meraj; PALANIYAR, Nades. Histone Acetylation Promotes Neutrophil Extracellular Trap Formation. **Biomolecules**, v. 9, n. 1, p. 32, 2019a.
- HAMAM; PALANIYAR. Post-Translational Modifications in NETosis and NETs-Mediated Diseases. **Biomolecules**, v. 9, n. 8, p. 369, 2019b.
- HE, Wan-ting; WAN, Haoqiang; HU, Lichen; *et al.* Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. **Cell Research**, v. 25, n. 12, p. 1285–1298, 2015.
- HEMMERS, Saskia; TEIJARO, John R.; ARANDJELOVIC, Sanja; *et al.* PAD4-Mediated Neutrophil Extracellular Trap Formation Is Not Required for Immunity against Influenza Infection. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e22043, 2011.
- HENDERSON SOUSA, Filipa; GHAISANI KOMARUDIN, Amalina; FINDLAY-GREENE, Fern; *et al.* Evolution and immunopathology of chikungunya virus informs therapeutic development. **Disease Models & Mechanisms**, v. 16, n. 4, p. dmm049804, 2023.
- HER, Zhisheng; MALLERET, Benoit; CHAN, Monica; *et al.* Active Infection of Human Blood Monocytes by Chikungunya Virus Triggers an Innate Immune Response. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 10, p. 5903–5913, 2010.
- HIRAI, Hideyo; ZHANG, Pu; DAYARAM, Tajhal; *et al.* C/EBP β is required for “emergency” granulopoiesis. **Nature Immunology**, v. 7, n. 7, p. 732–739, 2006.
- HIROKI, Carlos H.; TOLLER-KAWAHISA, Juliana E.; FUMAGALLI, Marcilio J.; *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Effectively Control Acute Chikungunya Virus Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 3108, 2020.
- HOARAU, Jean-Jacques; JAFFAR BANDJEE, Marie-Christine; KREJBICH TROTOT, Pascale; *et al.* Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 10, p. 5914–5927, 2010.
- HONÓRIO, Nildimar Alves; WIGGINS, Keenan; CÂMARA, Daniel Cardoso Portela; *et al.* Chikungunya virus vector competency of Brazilian and Florida mosquito vectors. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006521, 2018.
- HUFFORD, Matthew M.; RICHARDSON, Graham; ZHOU, Haixia; *et al.* Influenza-Infected Neutrophils within the Infected Lungs Act as Antigen Presenting Cells for Anti-Viral CD8+ T Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e46581, 2012.
- ITAKURA, Asako; MCCARTY, Owen J. T. Pivotal role for the mTOR pathway in the formation of neutrophil extracellular traps via regulation of autophagy. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 305, n. 3, p. C348–C354, 2013.
- JOHNSTON, Brent; KUBES, Paul. The α 4-integrin: an alternative pathway for neutrophil recruitment? **Immunology Today**, v. 20, n. 12, p. 545–550, 1999.

- JOSE, Joyce; SNYDER, Jonathan E; KUHN, Richard J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 837–856, 2009.
- KAPLAN, Mariana J.; RADIC, Marko. Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 6, p. 2689–2695, 2012.
- KASPERKIEWICZ, Paulina; HEMPEL, Anne; JANISZEWSKI, Tomasz; *et al.* NETosis occurs independently of neutrophil serine proteases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 51, p. 17624–17631, 2020.
- KENNY, Elaine F; HERZIG, Alf; KRÜGER, Renate; *et al.* Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. **eLife**, v. 6, p. e24437, 2017.
- KHAN, Afjal Hossain; MORITA, Kouichi; PARQUET, Maria Del Carmen; *et al.* Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 12, p. 3075–3084, 2002.
- KHAN, Meraj A.; FARAHVASH, Armin; DOUDA, David N.; *et al.* JNK Activation Turns on LPS- and Gram-Negative Bacteria-Induced NADPH Oxidase-Dependent Suicidal NETosis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3409, 2017.
- KHONGWICHIT, Sarawut; CHANSAENROJ, Jira; CHIRATHAWORN, Chintana; *et al.* Chikungunya virus infection: molecular biology, clinical characteristics, and epidemiology in Asian countries. **Journal of Biomedical Science**, v. 28, n. 1, p. 84, 2021.
- KIRUI, Jared; ABIDINE, Yara; LENMAN, Annasara; *et al.* The Phosphatidylserine Receptor TIM-1 Enhances Authentic Chikungunya Virus Cell Entry. **Cells**, v. 10, n. 7, p. 1828, 2021.
- KOLACZKOWSKA, Elzbieta; KUBES, Paul. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, 2013.
- KOUKI, Ahmed; FERJANI, Wafa; GHANEM-BOUGHANMI, Néziha; *et al.* The NADPH Oxidase Inhibitors Apocynin and Diphenyleiodonium Protect Rats from LPS-Induced Pulmonary Inflammation. **Antioxidants**, v. 12, n. 3, p. 770, 2023.
- KRAUS, Richard Felix; GRUBER, Michael Andreas. Neutrophils—From Bone Marrow to First-Line Defense of the Innate Immune System. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 767175, 2021.
- KREJBICH-TROTOT, Pascale; DENIZOT, Melanie; HOARAU, Jean-Jacques; *et al.* Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defenses. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 1, p. 314–325, 2011.
- KRIL, Vasiliya; AÏQUI-REBOUL-PAVIET, Olivier; BRIANT, Laurence; *et al.* New Insights into Chikungunya Virus Infection and Pathogenesis. **Annual Review of Virology**, v. 8, n. 1, p. 327–347, 2021.
- KRUGER, Philipp; SAFFARZADEH, Mona; WEBER, Alexander N. R.; *et al.* Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 3, p. e1004651, 2015.
- KUMAR, Shiril; JAFFAR-BANDJEE, Marie-Christine; GIRY, Claude; *et al.* Mouse macrophage innate immune response to chikungunya virus infection. **Virology Journal**, v. 9, n. 1, p. 313, 2012.
- LACY, Paige. Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 2, n. 3, p. 98, 2006.
- LAPORTA, Gabriel Z.; POTTER, Alexander M.; OLIVEIRA, Janeide F. A.; *et al.* Global Distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a Climate Change Scenario of Regional Rivalry. **Insects**, v. 14, n. 1, p. 49, 2023.
- LAURENT, Timothée; KUMAR, Pravin; LIESE, Susanne; *et al.* Architecture of the chikungunya virus replication organelle. **eLife**, v. 11, p. e83042, 2022.

- LAWRENCE, Shelley M.; CORRIDEN, Ross; NIZET, Victor. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 82, n. 1, p. e00057-17, 2018.
- LEE, Warren L.; HARRISON, Rene E.; GRINSTEIN, Sergio. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 14, p. 1299–1306, 2003.
- LEMANT, Jérôme; BOISSON, Véronique; WINER, Arnaud; *et al.* Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the reunion island outbreak in 2005–2006*: **Critical Care Medicine**, v. 36, n. 9, p. 2536–2541, 2008.
- LESHNER, Marc; WANG, Shu; LEWIS, Carrie; *et al.* PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. **Frontiers in Immunology**, v. 3, 2012. <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00307/abstract>>. Acesso em: 24 jun. 2023.
- LEWIS, Huw D; LIDDLE, John; COOTE, Jim E; *et al.* Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. **Nature Chemical Biology**, v. 11, n. 3, p. 189–191, 2015.
- LEY, Klaus; LAUDANNA, Carlo; CYBULSKY, Myron I.; *et al.* Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678–689, 2007.
- LI, Ronald H. L.; TABLIN, Fern. A Comparative Review of Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, p. 291, 2018.
- LI, Tiewei; ZHANG, Zhengyan; LI, Xiaojuan; *et al.* Neutrophil Extracellular Traps: Signaling Properties and Disease Relevance. **Mediators of Inflammation**, v. 2020, p. 1–14, 2020.
- LIAO, Tsai-Ling; CHEN, Yi-Ming; TANG, Kuo-Tung; *et al.* MicroRNA-223 inhibits neutrophil extracellular traps formation through regulating calcium influx and small extracellular vesicles transmission. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 15676, 2021.
- LIM, Elisa; LEE, Wai; MADZOKERE, Eugene; *et al.* Mosquitoes as Suitable Vectors for Alphaviruses. **Viruses**, v. 10, n. 2, p. 84, 2018.
- LIM, Pei Jin; CHU, Justin Jang Hann. A Polarized Cell Model for Chikungunya Virus Infection: Entry and Egress of Virus Occurs at the Apical Domain of Polarized Cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. e2661, 2014.
- LONG, Kristin M.; WHITMORE, Alan C.; FERRIS, Martin T.; *et al.* Dendritic Cell Immunoreceptor Regulates Chikungunya Virus Pathogenesis in Mice. **Journal of Virology**, v. 87, n. 10, p. 5697–5706, 2013.
- LOOD, Christian; BLANCO, Luz P; PURMALEK, Monica M; *et al.* Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. **Nature Medicine**, v. 22, n. 2, p. 146–153, 2016.
- LWANDE, Olivia Wesula; OBANDA, Vincent; LINDSTRÖM, Anders; *et al.* Globe-Trotting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Risk Factors for Arbovirus Pandemics. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 20, n. 2, p. 71–81, 2020.
- MA, Yuan; ZHANG, Yue; ZHU, Liuluan. Role of neutrophils in acute viral infection. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 9, n. 4, p. 1186–1196, 2021.
- MADEWELL, Zachary J. Arboviruses and Their Vectors. **Southern Medical Journal**, v. 113, n. 10, p. 520–523, 2020.
- MANTOVANI, Alberto; CASSATELLA, Marco A.; COSTANTINI, Claudio; *et al.* Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 519–531, 2011.

- MARGRAF, Andreas; GERMENA, Giulia; DREXLER, Hannes C. A.; *et al.* The integrin-linked kinase is required for chemokine-triggered high-affinity conformation of the neutrophil β 2-integrin LFA-1. **Blood**, v. 136, n. 19, p. 2200–2205, 2020.
- MARTINOD, K.; WITSCH, T.; FARLEY, K.; *et al.* Neutrophil elastase-deficient mice form neutrophil extracellular traps in an experimental model of deep vein thrombosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 14, n. 3, p. 551–558, 2016.
- MARTINOD, Kimberly; DEMERS, Melanie; FUCHS, Tobias A.; *et al.* Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 21, p. 8674–8679, 2013.
- MATUSALI, Giulia; COLAVITA, Francesca; BORDI, Licia; *et al.* Tropism of the Chikungunya Virus. **Viruses**, v. 11, n. 2, p. 175, 2019.
- MAYADAS, Tanya N.; CULLERE, Xavier; LOWELL, Clifford A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, n. 1, p. 181–218, 2014.
- MCCARTHY, Mary K.; REYNOSO, Glennys V.; WINKLER, Emma S.; *et al.* MyD88-dependent influx of monocytes and neutrophils impairs lymph node B cell responses to chikungunya virus infection via Irf5, Nos2 and Nox2. **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 1, p. e1008292, 2020.
- MEERTENS, Laurent; HAFIRASSOU, Mohamed Lamine; COUDERC, Thérèse; *et al.* FHL1 is a major host factor for chikungunya virus infection. **Nature**, v. 574, n. 7777, p. 259–263, 2019.
- MEHTA, Hrishikesh M.; COREY, Seth J. G-CSF, the guardian of granulopoiesis. **Seminars in Immunology**, v. 54, p. 101515, 2021.
- METZLER, Kathleen D.; GOOSMANN, Christian; LUBOJEMSKA, Aleksandra; *et al.* A Myeloperoxidase-Containing Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics during NETosis. **Cell Reports**, v. 8, n. 3, p. 883–896, 2014.
- MOLLER-TANK, Sven; KONDRATOWICZ, Andrew S.; DAVEY, Robert A.; *et al.* Role of the Phosphatidylserine Receptor TIM-1 in Enveloped-Virus Entry. **Journal of Virology**, v. 87, n. 15, p. 8327–8341, 2013.
- MONTALVO ZURBIA-FLORES, Gerardo; REYES-SANDOVAL, Arturo; KIM, Young Chan. Chikungunya Virus: Priority Pathogen or Passing Trend? **Vaccines**, v. 11, n. 3, p. 568, 2023
- MORALES-PRIMO, Abraham U.; BECKER, Ingeborg; ZAMORA-CHIMAL, Jaime. Neutrophil extracellular trap-associated molecules: a review on their immunophysiological and inflammatory roles. **International Reviews of Immunology**, v. 41, n. 2, p. 253–274, 2022.
- MOREAU, Richard; PÉRIANIN, Axel; ARROYO, Vicente. Review of Defective NADPH Oxidase Activity and Myeloperoxidase Release in Neutrophils From Patients With Cirrhosis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1044, 2019.
- MOURAD, Omar; MAKHANI, Leila; CHEN, Lin H. Chikungunya: An Emerging Public Health Concern. **Current Infectious Disease Reports**, v. 24, n. 12, p. 217–228, 2022.
- MURARO, Stéfanie P.; DE SOUZA, Gabriela F.; GALLO, Stephanie W.; *et al.* Respiratory Syncytial Virus induces the classical ROS-dependent NETosis through PAD-4 and necroptosis pathways activation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 14166, 2018.
- NARASARAJU, Teluguakula; YANG, Edwin; SAMY, Ramar Perumal; *et al.* Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Contribute to Acute Lung Injury of Influenza Pneumonitis. **The American Journal of Pathology**, v. 179, n. 1, p. 199–210, 2011.
- NAUSEEF, William M. Human neutrophils \neq murine neutrophils: Does it matter? **Immunological Reviews**, v. 314, n. 1, p. 442–456, 2023.

- NAUSEEF, William M; BORREGAARD, Niels. Neutrophils at work. **Nature Immunology**, v. 15, n. 7, p. 602–611, 2014.
- NÉMETH, Tamás; SPERANDIO, Markus; MÓCSAI, Attila. Neutrophils as emerging therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 19, n. 4, p. 253–275, 2020.
- NEUBERT, Elsa; MEYER, Daniel; ROCCA, Francesco; *et al.* Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3767, 2018.
- NIKITINA, Ekaterina; LARIONOVA, Irina; CHOINZONOV, Evgeniy; *et al.* Monocytes and Macrophages as Viral Targets and Reservoirs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 2821, 2018.
- NOOR, Farha Musharrat; HOSSAIN, Md Belal; ISLAM, Quazi Tarikul. Prevalence of and risk factors for long-term disabilities following chikungunya virus disease: A meta-analysis. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 35, p. 101618, 2020.
- NORDENFELT, Pontus; TAPPER, Hans. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 2, p. 271–284, 2011.
- NUNES, Marcio Roberto Teixeira; FARIA, Nuno Rodrigues; DE VASCONCELOS, Janaina Mota; *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 102, 2015.
- O'DONOGHUE, Anthony J.; JIN, Ye; KNUDSEN, Giselle M.; *et al.* Global Substrate Profiling of Proteases in Human Neutrophil Extracellular Traps Reveals Consensus Motif Predominantly Contributed by Elastase. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e75141, 2013.
- O'DRISCOLL, Megan; SALJE, Henrik; CHANG, Aileen Y.; *et al.* Arthralgia resolution rate following chikungunya virus infection. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 112, p. 1–7, 2021.
- OPASAWATCHAI, Anunya; AMORNSUPAWAT, Panicha; JIRAVEJCHAKUL, Natnicha; *et al.* Neutrophil Activation and Early Features of NET Formation Are Associated With Dengue Virus Infection in Human. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 3007, 2019.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE / Organização Mundial de Saúde. Atualização Epidemiológica: Dengue, Chikungunya e Zika. 25 de janeiro de 2023. Washington, D.C. OPAS/OMS. 2023PAHO
- PAHO/WHO. **Epidemiological Alert Increase in cases and deaths from chikungunya in the Region of the Americas**. [s.l.: s.n.], 2023. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-alert-increase-cases-and-deaths-chikungunya-region-americas>>.
- PAPAYANNOPOULOS, Venizelos. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 2, p. 134–147, 2018.
- PAPAYANNOPOULOS, Venizelos; METZLER, Kathleen D.; HAKKIM, Abdul; *et al.* Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. **Journal of Cell Biology**, v. 191, n. 3, p. 677–691, 2010.
- PARKER, Heather; WINTERBOURN, Christine C. Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. **Frontiers in Immunology**, v. 3, 2013. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00424/abstract>>. Acesso em: 3 jun. 2023.
- PASSELLI, Katuska; BILLION, Oaklyne; TACCHINI-COTTIER, Fabienne. The Impact of Neutrophil Recruitment to the Skin on the Pathology Induced by Leishmania Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 649348, 2021.
- PAUL, Binoy J.; SADANAND, Shajit. Chikungunya Infection: A Re-emerging Epidemic. **Rheumatology and Therapy**, v. 5, n. 2, p. 317–326, 2018.

- PEINADO, Rafaela Dos S.; EBERLE, Raphael J.; ARNI, Raghuvir K.; *et al.* A Review of Omics Studies on Arboviruses: Alphavirus, Orthobunyavirus and Phlebovirus. **Viruses**, v. 14, n. 10, p. 2194, 2022.
- PEISELER, Moritz; KUBES, Paul. More friend than foe: the emerging role of neutrophils in tissue repair. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 7, p. 2629–2639, 2019.
- PETRETTO, Andrea; BRUSCHI, Maurizio; PRATESI, Federico; *et al.* Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli: A comparative proteomic analysis. **PLOS ONE**, v. 14, n. 7, p. e0218946, 2019.
- POLI, Valentina; PUI-YAN MA, Victor; DI GIOIA, Marco; *et al.* Zinc-dependent histone deacetylases drive neutrophil extracellular trap formation and potentiate local and systemic inflammation. **iScience**, v. 24, n. 11, p. 103256, 2021.
- POWER, Grace M; VAUGHAN, Aisling M; QIAO, Luxi; *et al.* Socioeconomic risk markers of arthropod-borne virus (arbovirus) infections: a systematic literature review and meta-analysis. **BMJ Global Health**, v. 7, n. 4, p. e007735, 2022.
- POWERS, Ann M.; LOGUE, Christopher H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 9, p. 2363–2377, 2007.
- RAFTERY, Martin J.; LALWANI, Pritesh; KRAUTKRÄMER, Ellen; *et al.* β 2 integrin mediates hantavirus-induced release of neutrophil extracellular traps. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 7, p. 1485–1497, 2014.
- RAVINDRAN, Mithunan; KHAN, Meraj A.; PALANIYAR, Nades. Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology. **Biomolecules**, v. 9, n. 8, p. 365, 2019.
- REIS, Erik V. S.; DAMAS, Beatriz M.; MENDONÇA, Diogo C.; *et al.* In-Depth Characterization of the Chikungunya Virus Replication Cycle. **Journal of Virology**, v. 96, n. 3, p. e01732-21, 2022.
- REYES BALLISTA, Judith Mary; MIAZGOWICZ, Kerri L.; ACCIANI, Marissa D.; *et al.* Chikungunya virus entry and infectivity is primarily facilitated through cell line dependent attachment factors in mammalian and mosquito cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 11, p. 1085913, 2023.
- RIDDLE, Rebecca B.; JENNBÄCKEN, Karin; HANSSON, Kenny M.; *et al.* Endothelial inflammation and neutrophil transmigration are modulated by extracellular matrix composition in an inflammation-on-a-chip model. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 6855, 2022.
- ROCHAEL, Natalia C.; GUIMARÃES-COSTA, Anderson B.; NASCIMENTO, Michelle T. C.; *et al.* Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by Leishmania parasites. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 18302, 2015.
- ROHRBACH, Amanda S.; SLADE, Daniel J.; THOMPSON, Paul R.; *et al.* Activation of PAD4 in NET formation. **Frontiers in Immunology**, v. 3, 2012. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00360/abstract>>.
- ROSALES, Carlos. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 113, 2018.
- ROSAZZA, Thibault; WARNER, Jordan; SOLLBERGER, Gabriel. NET formation – mechanisms and how they relate to other cell death pathways. **The FEBS Journal**, v. 288, n. 11, p. 3334–3350, 2021.
- ROSS, R. W. The Newala epidemic: III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **Journal of Hygiene**, v. 54, n. 2, p. 177–191, 1956.
- RUEDA, Juan C.; SANTOS, Ana M.; ANGARITA, Jose-Ignacio; *et al.* Demographic and clinical characteristics of chikungunya patients from six Colombian cities, 2014–2015. **Emerging Microbes & Infections**, v. 8, n. 1, p. 1490–1500, 2019.

- RUPP, Jonathan C.; SOKOLOSKI, Kevin J.; GEBHART, Natasha N.; *et al.* Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 9, p. 2483–2500, 2015.
- SADIK, Christian D.; KIM, Nancy D.; LUSTER, Andrew D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 10, p. 452–460, 2011.
- SAITOH, Tatsuya; KOMANO, Jun; SAITOH, Yasunori; *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Mediate a Host Defense Response to Human Immunodeficiency Virus-1. **Cell Host & Microbe**, v. 12, n. 1, p. 109–116, 2012.
- SALVERMOSER, Melanie; BEGANDT, Daniela; ALON, Ronen; *et al.* Nuclear Deformation During Neutrophil Migration at Sites of Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2680, 2018.
- SCHILTE, Clémentine; STAIKOVSKY, Frédéric; COUDERC, Thérèse; *et al.* Chikungunya Virus-associated Long-term Arthralgia: A 36-month Prospective Longitudinal Study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, p. e2137, 2013.
- SANTOCKI, Michal; KOLACZKOWSKA, Elzbieta. On Neutrophil Extracellular Trap (NET) Removal: What We Know Thus Far and Why So Little. **Cells**, v. 9, n. 9, p. 2079, 2020.
- SCHOEN, Janina; EULER, Maximilien; SCHAUER, Christine; *et al.* Neutrophils' Extracellular Trap Mechanisms: From Physiology to Pathology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, p. 12855, 2022.
- SCHULTZ, Bárbara M.; ACEVEDO, Orlando A.; KALERGIS, Alexis M.; *et al.* Role of Extracellular Trap Release During Bacterial and Viral Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 798853, 2022.
- SCHWARTZ, Olivier; ALBERT, Matthew L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 491–500, 2010.
- SEBINA, Ismail; RASHID, Ridwan B.; SIKDER, Md. Al Amin; *et al.* IFN- λ Diminishes the Severity of Viral Bronchiolitis in Neonatal Mice by Limiting NADPH Oxidase-Induced PAD4-Independent NETosis. **The Journal of Immunology**, v. 208, n. 12, p. 2806–2816, 2022.
- SELDERS, Gretchen S.; FETZ, Allison E.; RADIC, Marko Z.; *et al.* An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. **Regenerative Biomaterials**, v. 4, n. 1, p. 55–68, 2017.
- SILVA, Camila Meirelles S.; WANDERLEY, Carlos Wagner S.; VERAS, Flavio P.; *et al.* Gasdermin D inhibition prevents multiple organ dysfunction during sepsis by blocking NET formation. **Blood**, v. 138, n. 25, p. 2702–2713, 2021.
- SILVA, Laurie A.; DERMODY, Terence S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 737–749, 2017.
- SINGH, Jeeshan; BOETTCHER, Michael; DÖLLING, Maximilian; *et al.* Moonlighting chromatin: when DNA escapes nuclear control. **Cell Death & Differentiation**, v. 30, n. 4, p. 861–875, 2023.
- SOLIGNAT, Maxime; GAY, Bernard; HIGGS, Stephen; *et al.* Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n. 2, p. 183–197, 2009.
- SOLLBERGER, Gabriel; CHOIDAS, Axel; BURN, Garth Lawrence; *et al.* Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. **Science Immunology**, v. 3, n. 26, p. eaar6689, 2018.
- SOLLBERGER, Gabriel; TILLEY, Dorothea Ogmores; ZYCHLINSKY, Arturo. Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization. **Developmental Cell**, v. 44, n. 5, p. 542–553, 2018.
- SRIVASTAVA, Priyanshu; KUMAR, Ankit; HASAN, Abdul; *et al.* Disease Resolution in Chikungunya—What Decides the Outcome? **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 695, 2020.

- STOIBER, Walter; OBERMAYER, Astrid; STEINBACHER, Peter; *et al.* The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of Extracellular Traps (ETs) in Humans. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 702–723, 2015.
- SUDEEP, A. B.; PARASHAR, D. Chikungunya: an overview. **Journal of Biosciences**, v. 33, n. 4, p. 443–449, 2008.
- SUDEEP, AnakkathilBalan; VYAS, PratikB; PARASHAR, Deepti; *et al.* Differential susceptibility & replication potential of Vero E6, BHK-21, RD, A-549, C6/36 cells & Aedes aegypti mosquitoes to three strains of chikungunya virus. **Indian Journal of Medical Research**, v. 149, n. 6, p. 771, 2019.
- SUHRBIER, Andreas. Rheumatic manifestations of chikungunya: emerging concepts and interventions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 15, n. 10, p. 597–611, 2019.
- TABACHNICK, Walter. Nature, Nurture and Evolution of Intra-Species Variation in Mosquito Arbovirus Transmission Competence. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 1, p. 249–277, 2013.
- TAKEI, Hiroshi; ARAKI, Akemi; WATANABE, Hiroshi; *et al.* Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, n. 2, p. 229–240, 1996.
- TAN, Yaw Bia; CHMIELEWSKI, David; LAW, Michelle Cheok Yien; *et al.* Molecular architecture of the Chikungunya virus replication complex. **Science Advances**, v. 8, n. 48, p. eadd2536, 2022.
- TANABE, Ithallo S. B.; TANABE, Eloiza L. L.; SANTOS, Elane C.; *et al.* Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 345, 2018.
- TANG, Bor Luen. The cell biology of Chikungunya virus infection: Cell biology of CHIKV infection. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 1354–1363, 2012.
- TANG, Tao; ROSENKRANZ, Alexander; ASSMANN, Karel J.M.; *et al.* A Role for Mac-1 (CD11b/CD18) in Immune Complex–stimulated Neutrophil Function In Vivo: Mac-1 Deficiency Abrogates Sustained Fc γ Receptor–dependent Neutrophil Adhesion and Complement-dependent Proteinuria in Acute Glomerulonephritis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 11, p. 1853–1863, 1997.
- TEO, Teck-Hui; LUM, Fok-Moon; CLASER, Carla; *et al.* A Pathogenic Role for CD4⁺ T Cells during Chikungunya Virus Infection in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 1, p. 259–269, 2013.
- THIAM, Hawa Racine; WONG, Siu Ling; WAGNER, Denisa D.; *et al.* Cellular Mechanisms of NETosis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 36, n. 1, p. 191–218, 2020.
- THOMAS, David C.; CHARBONNIER, Louis-Marie; SCHEJTMAN, Andrea; *et al.* EROS/CYBC1 mutations: Decreased NADPH oxidase function and chronic granulomatous disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 143, n. 2, p. 782-785.e1, 2019.
- TRAVERSE, Elizabeth M.; MILLSAPPS, Erin M.; UNDERWOOD, Emma C.; *et al.* Chikungunya Immunopathology as It Presents in Different Organ Systems. **Viruses**, v. 14, n. 8, p. 1786, 2022.
- TSETSARKIN, Konstantin A; CHEN, Rubing; SHERMAN, Michael B; *et al.* Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. **Current Opinion in Virology**, v. 1, n. 4, p. 310–317, 2011.
- UDERHARDT, Stefan; KNOPF, Jasmin; HERRMANN, Martin. Neutrophil swarm control: what goes up must come down. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 416, 2021.
- URBAN, Constantin F.; ERMERT, David; SCHMID, Monika; *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, p. e1000639, 2009.

- VEGA-RÚA, Anubis; SCHMITT, Christine; BONNE, Isabelle; *et al.* Chikungunya Virus Replication in Salivary Glands of the Mosquito *Aedes albopictus*. **Viruses**, v. 7, n. 11, p. 5902–5907, 2015.
- VERAS, Flavio Protasio; PONTELLI, Marjorie Cornejo; SILVA, Camila Meirelles; *et al.* SARS-CoV-2–triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 12, p. e20201129, 2020.
- VIDAL, Emily Raquel Nunes; FRUTUOSO, Livia Carla Vinhal; DUARTE, Elisabeth Carmen; *et al.* Epidemiological burden of Chikungunya fever in Brazil, 2016 and 2017. **Tropical Medicine & International Health**, v. 27, n. 2, p. 174–184, 2022.
- VIGLIETTA, Marine; BELLONE, Rachel; BLISNICK, Adrien Albert; *et al.* Vector Specificity of Arbovirus Transmission. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 773211, 2021.
- VOROBEVA, N. V.; CHERNYAK, B. V. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. **Biochemistry (Moscow)**, v. 85, n. 10, p. 1178–1190, 2020.
- VOSS, James E.; VANEY, Marie-Christine; DUQUERROY, Stéphane; *et al.* Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 709–712, 2010.
- VU, David M.; JUNGKIND, Donald; ANGELLE DESIREE LABEAUD. Chikungunya Virus. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 37, n. 2, p. 371–382, 2017.
- WANG, Hui; ZHANG, Yiyin; WANG, Qianling; *et al.* The regulatory mechanism of neutrophil extracellular traps in cancer biological behavior. **Cell & Bioscience**, v. 11, n. 1, p. 193, 2021.
- WANG, Meiyang; ISHIKAWA, Tatsuya; LAI, Yupeng; *et al.* Diverse Roles of NETosis in the Pathogenesis of Lupus. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 895216, 2022.
- WANG, Yanming; LI, Ming; STADLER, Sonja; *et al.* Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. **Journal of Cell Biology**, v. 184, n. 2, p. 205–213, 2009.
- WARDINI, A. B.; GUIMARAES-COSTA, A. B.; NASCIMENTO, M. T. C.; *et al.* Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. **Journal of General Virology**, v. 91, n. 1, p. 259–264, 2010.
- WATSON, Hugh; TRITSCH, Sarah R.; ENCINALES, Liliana; *et al.* Stiffness, pain, and joint counts in chronic chikungunya disease: relevance to disability and quality of life. **Clinical Rheumatology**, v. 39, n. 5, p. 1679–1686, 2020.
- WAUQUIER, Nadia; BECQUART, Pierre; NKOGHE, Dieudonné; *et al.* The Acute Phase of Chikungunya Virus Infection in Humans Is Associated With Strong Innate Immunity and T CD8 Cell Activation. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 1, p. 115–123, 2011.
- WEAVER, Scott C.; CHARLIER, Caroline; VASILAKIS, Nikos; *et al.* Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annual Review of Medicine**, v. 69, n. 1, p. 395–408, 2018.
- WEAVER, Scott C.; CHEN, Rubing; DIALLO, Mawlouth. Chikungunya Virus: Role of Vectors in Emergence from Enzootic Cycles. **Annual Review of Entomology**, v. 65, n. 1, p. 313–332, 2020.
- WEAVER, Scott C.; FORRESTER, Naomi L.; LIU, Jianying; *et al.* Population bottlenecks and founder effects: implications for mosquito-borne arboviral emergence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 184–195, 2021.
- WICHIT, Sineewanlaya; DIOP, Fodé; HAMEL, Rodolphe; *et al.* *Aedes Aegypti* saliva enhances chikungunya virus replication in human skin fibroblasts via inhibition of the type I interferon signaling pathway. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 55, p. 68–70, 2017.

- WIGERBLAD, Gustaf; KAPLAN, Mariana J. Neutrophil extracellular traps in systemic autoimmune and autoinflammatory diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 23, n. 5, p. 274–288, 2023.
- WINTACHAI, Phitchayapak; WIKAN, Nitwara; KUADKITKAN, Atichat; *et al.* Identification of prohibitin as a Chikungunya virus receptor protein. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 11, p. 1757–1770, 2012.
- WINTERBOURN, Christine C.; KETTLE, Anthony J.; HAMPTON, Mark B. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, n. 1, p. 765–792, 2016.
- WONG, Siu Ling; WAGNER, Denisa D. Peptidylarginine deiminase 4: a nuclear button triggering neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases and aging. **The FASEB Journal**, v. 32, n. 12, p. 6258–6370, 2018.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2014). A global brief on vector-borne diseases. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/111008>.
- YI, Tong; DING, Wenxin; HAO, Yuanzhen; *et al.* Neutrophil extracellular traps mediate severe lung injury induced by influenza A virus H1N1 in mice coinfecting with *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 166, p. 105558, 2022.
- YIPP, Bryan G.; KUBES, Paul. NETosis: how vital is it? **Blood**, v. 122, n. 16, p. 2784–2794, 2013.
- YIPP, Bryan G; PETRI, Björn; SALINA, Davide; *et al.* Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. **Nature Medicine**, v. 18, n. 9, p. 1386–1393, 2012.
- YOUSEFI, S; MIHALACHE, C; KOZLOWSKI, E; *et al.* Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, n. 11, p. 1438–1444, 2009.
- YOUSEFI, Shida; SIMON, Dagmar; STOJKOV, Darko; *et al.* In vivo evidence for extracellular DNA trap formation. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 4, p. 300, 2020.
- ZHANG, Rong; KIM, Arthur S.; FOX, Julie M.; *et al.* Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. **Nature**, v. 557, n. 7706, p. 570–574, 2018.
- ZHU, Liuluan; LIU, Lu; ZHANG, Yue; *et al.* High Level of Neutrophil Extracellular Traps Correlates With Poor Prognosis of Severe Influenza A Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 217, n. 3, p. 428–437, 2018.