

LETÍCIA LEONARDO SANTOS

O ESTUDO DO PAPEL DAS REDES
EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILO NA INFECÇÃO
POR *Leishmania*



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

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO RIO DE
JANEIRO
FEVEREIRO / 2021

O trabalho foi realizado no Departamento de Imunologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Anderson Guimarães.

CIP - Catalogação na Publicação

LL648e Leonardo Santos, Leticia
O ESTUDO DO PAPEL DAS REDES EXTRACELULARES DE
NEUTRÓFILO NA INFECÇÃO POR Leishmania / Leticia
Leonardo Santos. -- Rio de Janeiro, 2021.
58 f.

Orientador: Anderson Guimarães.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2021.

1. Neutrófilo. 2. Redes extracelulares de
neutrófilo. 3. Leishmania. 4. Monócito. I. Guimarães,
Anderson, orient. II. 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: **Letícia Leonardo Santos**
 DRE: 116109473

BANCA EXAMINADORA: Profa. Juliana Echevarria Lima (Presidente)
 Dr. Leandro Silva da Costa
 Dra. Marina Valente Barroso
 Profa. Alessandra Filardy (Suplente)

Título da Monografia: **“O estudo do papel das redes extracelulares de neutrófilo na infecção por *Leishmania*”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/rdv-qzph-otk>

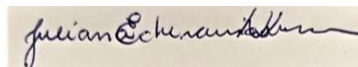
Data e hora de início: **12 de fevereiro de 2021 às 14:30h**

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 pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 12 de fevereiro de 2021.

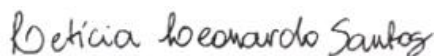
NOTA	Banca Examinadora:
<u> 10 </u>	Profa. Juliana Echevarria Lima
<u> 10 </u>	Dr. Leandro Silva da Costa
<u> 10 </u>	Dra. Marina Valente Barroso
_____	Profa. Alessandra Filardy (Suplente)

Presidente da banca:



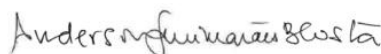
Profa. Juliana Echevarria Lima

Aluno:



Letícia Leonardo Santos

Orientador:



Prof. Anderson Guimarães

Coordenador de TCC :



Profa. Bernadete Teixeira

Ferreira Carvalho

DEDICATÓRIA

**Dedico esta monografia à minha irmã
Larissa, que esteve presente em todas as
etapas da minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelos anos de dedicação, apoio, amor e ensinamentos. A minha mãe, por todos os esforços que já fez para me ajudar e palavras de incentivo. A minha irmã, que esteve incondicionalmente ao meu lado em cada fase da vida. Obrigada pelo apoio, pelas horas de estudo, pela ajuda nos trabalhos e pelos momentos bons que você criou em meio ao caos.

Agradeço ao meu orientador Anderson, por ter me acolhido no laboratório, pelos ensinamentos, incentivos, pela paciência e dedicação que teve comigo. Agradeço por sempre estar disposto a ajudar, com o bom humor e me incentivando a pensar durante cada etapa.

Agradeço à professora Elvira, por também ter me acolhido, por sempre estar presente, apoiando e estimulando seus alunos com muita gentileza. Obrigada pelos ensinamentos e ser uma professora inspiradora.

Às amigas que formei na faculdade, Beatriz, Juliana, Larissa, Mariana, Matheus e Victor. Obrigada por cada minuto compartilhado nesses anos. Por estarem ao meu lado em cada perrengue e cada momento bom que a faculdade nos proporcionou. A graduação não teria sido a mesma sem a formação das chaperonas.

Agradeço às amigas que fiz no laboratório, Alice, Andrew, Ane, Barbara, Gean, Ingrid, Jullyanna, Natália e Thamara por todas as horas de trabalho em conjunto e por toda a ajuda. Muito obrigada pelos conselhos, pelas conversas e pela convivência.

Ao meu amigo Andrew, pelo apoio nos momentos de incerteza, por ter me apresentado o laboratório, pelas horas de estudo em dupla, por ouvir meus desabafos e pelas brincadeiras.

Aos meus amigos que caminharam ao meu lado até aqui.

Às agências de fomento: CNPq, FAPERJ e CAPES.

RESUMO

LETÍCIA LEONARDO SANTOS

O ESTUDO DO PAPEL DAS REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILO NA INFECÇÃO POR *Leishmania*

Orientador: Anderson Guimarães

Resumo da Monografia apresentado 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

Os neutrófilos são células fagocíticas e possuem diversos mecanismos efetores, como a liberação das redes extracelulares de neutrófilos (NETs). Essas células constituem a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos. As NETs são compostas pela cromatina descondensada, associada a proteínas de diversos compartimentos celulares e funcionam na contenção e morte dos microrganismos. Nosso grupo demonstrou que a liberação dessas redes pode ser induzida na infecção por *Leishmania* e que as NETs prendem e matam o parasito. Contudo, o papel das NETs em modular as respostas de outras células fagocíticas, importantes na leishmaniose, foi pouco abordado. Os monócitos são células fagocíticas recrutadas logo após a primeira onda de recrutamento de neutrófilos para a derme do hospedeiro infectado com *Leishmania* e são importantes para o estabelecimento da infecção. Nosso trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos das redes extracelulares de neutrófilos nos monócitos infectados por *Leishmania major*, e se essa interação é capaz de alterar a sobrevivência dos parasitos nos monócitos. Os neutrófilos e monócitos humanos foram isolados do sangue periférico de doadores saudáveis e usados nos experimentos reportados aqui. As NETs foram produzidas por ativação dos neutrófilos com promastigotas de *Leishmania*. As redes foram quantificadas no sobrenadante através da dosagem de DNA. Para o ensaio de sobrevivência os monócitos foram infectados com promastigotas de *Leishmania major*, tratados ou não com NETs e, após 48 horas, lisados para a contagem dos parasitos viáveis. O mesmo ensaio de sobrevivência foi realizado com monócitos infectados tratados com elastase neutrofílica. Nossos resultados mostram que as redes extracelulares de neutrófilos, ao interagirem com os monócitos infectados com *L. major*, são capazes de aumentar a sobrevivência do parasito. O bloqueio da endocitose das NETs, causado pela administração de citocalasina D, inibiu o efeito das redes, reduzindo a sobrevivência do parasito. Da mesma forma, a adição de elastase aumenta a sobrevivência de *L. major* nos monócitos. Este efeito não foi observado na infecção por *L. amazonensis*. Na tentativa de estabelecer um mecanismo que explique nossos resultados, tentamos quantificar a produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) na cultura de monócitos infectados, tratados ou não com elastase. Não observamos diferenças na produção de ROS entre os grupos. Evidenciamos aqui um aspecto interessante da interação entre os neutrófilos e monócitos na infecção por *Leishmania major* e experimentos futuros serão direcionados para entender os mecanismos envolvidos no aumento da infecção causado pelas NETs.

Palavras-chave: Neutrófilos, redes extracelulares de neutrófilo, monócito, *Leishmania*, NETs

ABSTRACT**LETÍCIA LEONARDO SANTOS****THE STUDY OF THE ROLE OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS
DURING *Leishmania* INFECTION****Orientador: Anderson Guimarães**

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

Neutrophils are phagocytic cells endowed with different effector mechanisms, such as the release of neutrophil extracellular traps (NETs). These cells constitute the first line of defense against invading pathogens. NETs are composed of decondensed chromatin, associated with proteins from different intracellular compartments. These structures function in the containment and killing of microorganisms. Our group demonstrated that the release of NETs can be triggered by *Leishmania* and that NETs ensnare and kill the parasites. However, the role of NETs in modulating the responses of other phagocytic cells, important during *Leishmania* infection, has not been fully described. Monocytes are phagocytic cells recruited soon after the first wave of neutrophils migration to the dermis of *Leishmania*-infected host and these cells are important for disease establishment. Our study aims to evaluate the effects of NETs on monocytes infected with *Leishmania major*, and whether this interaction can alter the survival of the parasites inside monocytes. Human neutrophils and monocytes were isolated from the peripheral blood of healthy donors and used in the experiments reported here. NETs were produced by the activation of neutrophils with *Leishmania* promastigotes. NETs quantity was determined by the measurement of DNA in the supernatants. To perform the survival experiment, monocytes were infected with *L. major* promastigotes, treated or not with NETs for 48h, and lysed for measuring the number of viable parasites. The same survival assay was performed with infected monocytes treated with neutrophil elastase. Our results show that neutrophil extracellular traps increase parasite survival. The blockage of NETs endocytosis by monocytes, caused by the administration of cytochalasin D, inhibited the effect of the traps, reducing parasite survival. Likewise, addition of elastase increases *L. major* survival. This effect was not observed in *L. amazonensis*-infected monocytes. To establish a mechanism and to explain our results, we tried to quantify the production of reactive oxygen species (ROS) in the culture of infected monocytes, treated or not with elastase. We did not observe differences in the production of ROS between experimental groups. Here we show an interesting aspect of the interaction between neutrophils and monocytes in *Leishmania* infection and future experiments will be directed to understand the mechanisms involved in the increase of infection caused by NETs.

Keywords: Neutrophil, neutrophil extracellular traps, monocyte, *Leishmania*, NETs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Número de casos de leishmaniose tegumentar e de leishmaniose visceral no mundo, 2019 (WHO, 2019)	3
FIGURA 2: Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	5
FIGURA 3: Vias de formação da netose	11
FIGURA 4: A presença das NETs aumenta a sobrevivência da <i>L.major</i>	27
FIGURA 5: A citocalasina reduz a sobrevivência de <i>L.major</i>	28
FIGURA 6: A elastase aumenta a sobrevivência de <i>L. major</i>	29
FIGURA 7: A elastase não altera a sobrevivência de <i>L.amazonensis</i>	30
FIGURA 8: A presença da elastase não altera a liberação de ROS	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Proteínas associadas às NETs	9
---	---

LISTA DE ABREVIATURAS:

C5a - Componente 5a do complemento
DCs – Células Dendríticas
DPI - Difenilenodônio
ETs - Redes extracelulares
GM-CSF – Fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos
Hsp72 – Proteína de choque térmico de 72 kDa
IFN- α – Interferon- α
IFN- γ - Interferon- γ
IL- Interleucina
IL-4R α – Cadeia alfa do receptor de interleucina 4
iNOS - Óxido nítrico sintase induzível
JAMs - Moléculas de adesão de junções
LES - Lúpus eritematoso sistêmico
LPS – Lipopolissacarídeo
LTB4 - Leucotrieno B4
MCETs – Redes extracelulares de mastócitos
MHC II - complexo de histocompatibilidade II
mo-DCs – Células dendríticas derivadas de monócitos
MPO – Mieloperoxidase
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NE - Elastase neutrofílica
NEI - Inibidor irreversível de elastase neutrofílica
NETs - Redes extracelulares de neutrófilos (Neutrophil Extracellular Traps)
NO – Óxido Nítrico
PAD4 – Peptidil arginina deaminase 4
PAMPs- Padrões moleculares associados a patógenos
pDC- Células dendríticas plasmocitóides
PBMCs – Células mononucleares de sangue periférico
PMA - forbol de miristato acetato
PRR- Receptores de reconhecimento de padrão
ROS – Espécies reativas de oxigênio
TGF- β - Fator de Crescimento e Transformação-beta
Th – T helper
TLR - Receptor do tipo Toll
TNF- α - Fator de necrose tumoral- α
VCAMs - Molécula de adesão celular vascular
VEGF - factor de crescimento endotelial vascular
WT - *Wild type*

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Leishmaniose	1
1.1.1 Características gerais	1
1.1.2. Epidemiologia	2
1.1.3 Ciclo de vida do parasito	4
1.2 Neutrófilos.....	6
1.2.1 Mecanismos efetores.....	7
1.2.1.1 Redes extracelulares de neutrófilos (NETs)	8
1.2.1.2. As NETs na modulação das respostas efetoras de outras células do sistema imunitário.....	13
1.2.1.3 NETs e elastase na infecção por <i>Leishmania</i>	16
1.3. Monócitos na infecção por <i>Leishmania</i>	19
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. OBJETIVOS.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Purificação de monócitos humanos.....	23
4.2 Purificação de neutrófilos e produção de NETs.....	24
4.3 Cultivo do parasito.....	24
4.4. Análise da sobrevivência do parasito.....	25
4.5. Quantificação de espécies reativas de oxigênio.....	25
4.6. Análise estatística.....	25
5. RESULTADOS.....	26

6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÃO.....	35
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose

1.1.1. Características gerais

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, transmitido por insetos vetores, os flebotomíneos. Esses protozoários pertencem à família Trypanosomatidae e realizam parte do ciclo em um hospedeiro invertebrado e outra parte em um hospedeiro vertebrado (ROSS, 1903). O parasito, durante o seu ciclo de vida, apresenta-se sob duas formas distintas: o promastigota, que possui o corpo alongado e flagelo externo e a forma amastigota, com morfologia arredondada e sem flagelo externo livre. Os promastigotas são encontrados no intestino do inseto vetor e são transmitidos ao hospedeiro vertebrado pelo repasto sanguíneo realizado pelo flebotomíneo. As formas amastigotas são intracelulares e encontradas no interior de células fagocíticas do vertebrado, principalmente, dentro dos fagolisossomas de macrófagos (ILGOUTZ & MCCONVILLE, 2001). A transmissão do parasito é realizada pelas fêmeas hematófagas do inseto vetor, o flebotomíneo, da família Psychodidae, sendo o gênero *Phlebotomus sp.* predominante na África, Ásia e Europa, e o gênero *Lutzomyia sp.* predominante nas Américas Central e do Sul. Os flebotomíneos estão distribuídos pelo mundo, em zonas tropicais e subtropicais (WHO, 2019).

Essa doença pode se apresentar sob diversas formas clínicas, sendo as mais prevalentes as formas cutânea, visceral e a mucocutânea. Na leishmaniose cutânea, acarretada pelas espécies *L. major*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana* e *L. tropica*, com o aparecimento inicial de uma pápula no local da picada, que evolui para lesões ulcerativas de bordas elevadas e fundo granuloso na pele é uma característica clássica. As lesões aumentam progressivamente de tamanho e podem aparecer uma ou múltiplas lesões. Na visceral, gerada pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum*, forma mais grave da leishmaniose, os sinais clínicos dependem do período de infecção do indivíduo, porém, normalmente, causam febre irregular, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia e uma perda de peso progressiva, e o paciente possui um risco de morte elevado. Na forma mucocutânea, causada principalmente pela *L. brasiliensis*, além dos casos gerados pelas espécies *L. panamensis* e *L. guyanensis*, é observado com frequência um comprometimento dos tecidos nasofaríngeos, gerando lesões profundas, dor e sangramento, e, dependendo da evolução da doença, pode resultar na mutilação do nariz, palato e as outras áreas afetadas. Com a perda da estrutura do nariz, há a perda da função de

umedecer e aquecer o ar, levando a uma constante sensação de secura, prurido e dor, além de aumentar a frequência de infecções bacterianas. No caso de evoluir até atingir a garganta, pode causar dor ao engolir, rouquidão e tosse (LAINSON & SHAW, 1987; DESJEUX, 2004; WHO, 2019).

1.1.2. Epidemiologia

As leishmanioses estão amplamente distribuídas mundialmente (Figura 1), com 102 países classificados como endêmicos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), foram registrados 1,3 milhões de novos casos mundiais e 20.000 a 30.000 casos de óbitos por ano. Os países que juntos apresentam cerca de 90% dos registros de leishmaniose visceral são: Brasil, Índia, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Quênia. Três quartos dos casos de leishmaniose cutânea estão concentrados em cinco países: Afeganistão, Brasil, Iraque, Irã e Síria (WHO, 2017). Assim, o Brasil está no grupo dos países que mais reportam casos das diferentes formas clínicas da leishmaniose.

A Organização Pan Americana da Saúde (OPAS), em 2019, registrou em 17 países endêmicos, cerca de 40 mil casos de leishmaniose cutânea e mucosa e o maior número de casos ocorreu no Brasil (15.484 casos), Colômbia (5.907) e Peru (5.934). Já a leishmaniose visceral foi reportada como endêmica em 76 países, sendo 12 países das Américas. No período de 2001 a 2019, houve o registro de 65.934 casos, com uma média de 3.470 casos por ano. Em 2019 o Brasil foi responsável por 97% desses casos (2.529), ficando na frente dos outros países sul-americanos. Nos períodos de 2012 a 2019, a leishmaniose levou cerca de 2 mil pessoas a óbito (OPAS, 2020).

Sendo uma zoonose que acomete grande parte dos países americanos e por apresentar uma alta taxa de incidência, existe certa dificuldade na vigilância e monitoramento. Além disso, torna-se complexa a obtenção do real quantitativo de casos e também há uma limitação das ações que poderiam impactar na diminuição na taxa de incidência e na de mortalidade. A doença é observada, principalmente, em populações que vivem em condições sanitárias precárias, desnutrição, sistema imunológico debilitado e escassez de recursos financeiros (OPAS/OMS, 2019).

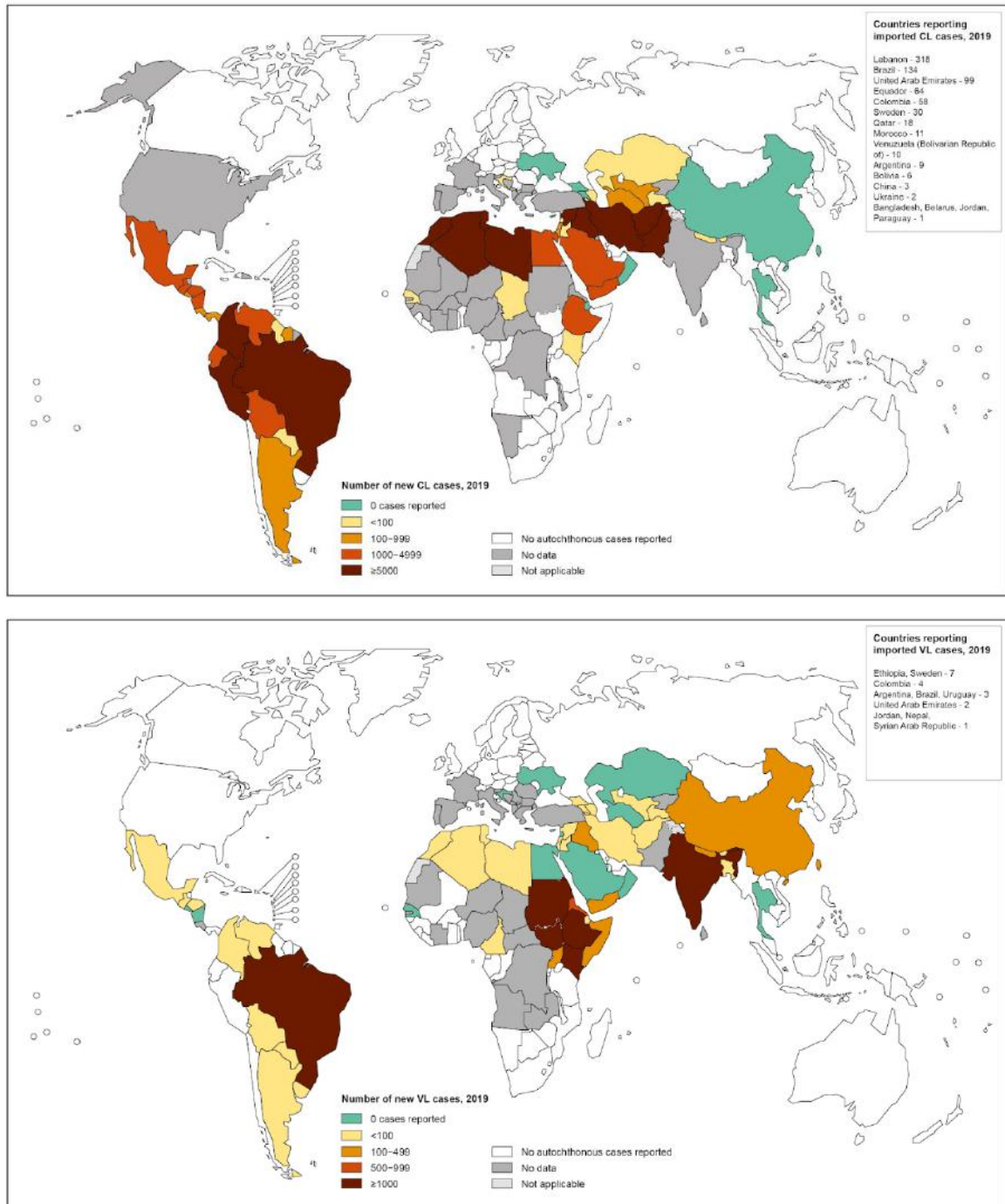
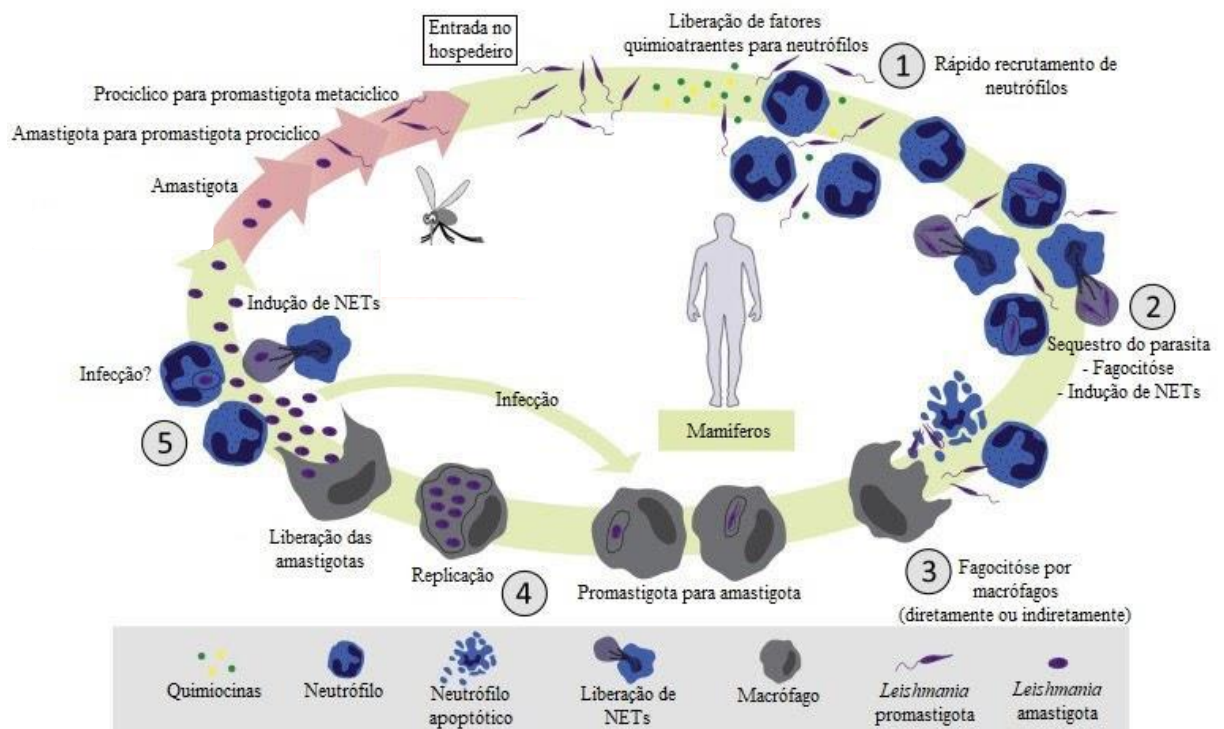


Figura 1: Número de casos de leishmaniose cutânea (primeiro mapa) e de leishmaniose visceral (segundo mapa) no mundo, 2019 (WHO, 2019).

1.1.3. Ciclo de vida do parasito

O ciclo de vida da *Leishmania* (figura 2) pode se iniciar através da alimentação sanguínea realizada pela fêmea do flebotomíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, quando o inseto acaba ingerindo macrófagos infectados com os amastigotas. No intestino médio do vetor, os macrófagos se rompem, liberando os amastigotas, que se diferenciam em promastigotas procíclicos, capazes de se aderirem ao epitélio intestinal. Em seguida, os promastigotas se multiplicam e diferenciam-se em promastigotas metacíclicos, deixando de interagir com células do intestino e migram para a parte anterior do trato digestivo, onde, no momento do repasto sanguíneo, são inoculados nos hospedeiros vertebrados (BATES, 2007). Durante o processo de alimentação, o vetor dilacera vasos sanguíneos na pele do hospedeiro e inocula junto com sua saliva uma quantidade variável de promastigotas metacíclicos na poça de sangue formada no tecido (KIMBLIN et al., 2008). Diversos estudos já demonstraram a presença de mediadores na saliva dos flebotomíneos, tais como moléculas com atividades farmacológicas que subvertem os mecanismos hemostáticos do hospedeiro vertebrado, como moléculas anticoagulantes (VENEZUELA et al., 2004), assim como fatores capazes de aumentar a infectividade da *Leishmania* (TITUS & RIBEIRO et al., 1988) e de modular a resposta imune do hospedeiro vertebrado.

A inoculação dos promastigotas induz um rápido e robusto recrutamento dos neutrófilos, que são os leucócitos mais abundantes na circulação sanguínea. Esse fenômeno foi demonstrado utilizando ensaios experimentais de microscopia intravital e citometria de fluxo. Após o recrutamento inicial de neutrófilos, outras células também chegam no sítio de infecção, como monócitos e macrófagos (LASKAY, ZANDBERGEN & SOLBACH, 2003; PETERS et al., 2008). Neste estudo foi observado que os neutrófilos fagocitam os promastigotas e os parasitos são liberados para o meio extracelular ainda viáveis e então são rapidamente fagocitados pelos monócitos/macrófagos, células hospedeiras da *Leishmania* (PETERS et al., 2008). Dentro dos macrófagos, nos vacúolos fagocíticos, os promastigotas se diferenciam em amastigotas, resistentes às enzimas e ao pH ácido, sobrevivem e se multiplicam, até romperem a membrana destas células. Desta forma, os amastigotas são liberados e podem, assim, infectar outros macrófagos. Quando um outro flebotomíneo se alimenta desse hospedeiro infectado com *Leishmania* ingere macrófagos infectados com amastigotas, dando continuidade ao ciclo (BATES, 2007).



Trends in Parasitology

Figura 2: Ciclo de vida do parasito. (1) O flebotomíneo injeta os promastigotas metacíclicos e os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o local da infecção. (2) Os neutrófilos fagocitam o parasito ou liberam as redes extracelulares de neutrófilos. (3) Os neutrófilos infectados liberam os parasitos que são rapidamente endocitados por macrófagos. (4) Dentro dos fagolisossomas dos macrófagos, os promastigotas diferenciam-se em amastigotas. (5) A multiplicação das amastigotas ocorre até o rompimento dos macrófagos, podendo assim infectar outros macrófagos e outras células, perpetuando a infecção. Quando outro flebotomíneo se alimenta do sangue de um hospedeiro infectado, ele ingere macrófagos infectados com os amastigotas. Esses macrófagos rompem dentro do inseto e os amastigotas são liberados e diferenciam-se em promastigotas, que se multiplicam e migram para a probóscide do vetor durante o processo de metaciclogênese. O ciclo reinicia quando este inseto ao realizar o repasto sanguíneo inocula os promastigotas metacíclicos em um novo hospedeiro vertebrado. (Modificado de HURREL et al., 2016.)

1.2. Neutrófilos

Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares, por possuírem o núcleo em forma de lóbulos, e são granulócitos, pois possuem citoplasma abundante em grânulos, os quais contêm diferentes enzimas e peptídeos antimicrobianos. Essas células são geradas a partir de progenitores mielóides na medula óssea e chegam à corrente sanguínea já maduros. Os neutrófilos são importantes componentes da imunidade inata na defesa contra microrganismos e constituem a primeira linha de defesa celular do hospedeiro (NAUSEEF & BORREGAARD, 2014). Quando ocorre uma lesão ou infecção no tecido há um rápido recrutamento dessas células e os mecanismos de defesa empregados pelos neutrófilos podem ocorrer nos meios extracelular ou intracelular, como (i) a fagocitose, (ii) a liberação do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos, (iii) a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e (iv) a liberação de redes extracelulares (NETs) (SOEHNLEIN, 2009; KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013; NAUSEEF & BORREGAARD, 2014). Além disso, sua capacidade de comunicação com outras células do sistema imunitário dos tecidos em que se encontram pode ocorrer por meio da liberação de citocinas, quimiocinas, proteínas dos grânulos e as NETs, levando ao recrutamento, ativação e imunomodulação de macrófagos, células dendríticas, linfócitos, células endoteliais etc. (SOEHNLEIN, ZERNECKE & WEBER, 2009; SOEHNLEIN, 2009; KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013; NAUSEEF & BORREGAARD, 2014).

Durante um processo inflamatório, estéril ou infeccioso, neutrófilos são de uma forma geral as primeiras células recrutadas para o tecido afetado. Durante este evento, uma série de moléculas que promovem o recrutamento celular, as quimiocinas, como a interleucina 8 (IL 8), o componente 5a do complemento (C5a) e o leucotrieno B4 (LTB₄), são produzidas localmente, recrutando os neutrófilos e sinalizando via receptores acoplados à proteína G (MCDERMOTT & MURPHY, 2000; SADIK, KIN & LUSTER, 2011; WILLIAMS et. al, 2011; KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013; NAUSEEF & BORREGAARD, 2014). O recrutamento dos neutrófilos envolve a interação destas células com células do endotélio e posterior passagem dos neutrófilos para o sítio inflamado. A interação entre neutrófilos e o endotélio é mediada por uma série de moléculas que têm sua expressão aumentada durante a resposta inflamatória, tais como: selectinas, integrinas, caderinas e moléculas da superfamília das imunoglobulinas (LEY et al., 2007; KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013). Em um primeiro momento, há um aumento da

expressão de selectinas nas células endoteliais que, dessa forma, vão interagir com os neutrófilos, permitindo o rolamento desses leucócitos sobre o endotélio. Após, há a interação das integrinas com seus ligantes, permitindo uma adesão forte entre neutrófilos e endotélio. Com isto, diversas outras proteínas, como VCAMs (Molécula de adesão celular vascular), JAMs (Moléculas de adesão de junções), caderinas, entre outras moléculas, participam também na adesão e transmigração das células do vaso sanguíneo para o tecido. Após, os neutrófilos realizam a diapedese, que pode ser paracelular, através de junções intracelulares ou transcelular, através do corpo da célula endotelial (SADIK, KIM & LUSTER 2011; WILLIAMS, 2012). No sítio inflamatório, os neutrófilos realizam seus mecanismos efetores para o desenvolvimento da resposta contra o patógeno, também liberando citocinas e quimiocinas que tem a capacidade de moldar a resposta imunológica nesse microambiente.

1.2.1. Mecanismos efetores

Entre os mecanismos de ação desempenhados pelos neutrófilos, a fagocitose é um dos principais mecanismos de morte de patógenos. Os neutrófilos são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), por meio dos seus receptores de reconhecimento de padrão (PRR), e assim, capturar microrganismos a partir de projeções de membrana, fazendo sua internalização. Nesse processo, há a formação de uma vesícula, denominada fagossoma, que se funde aos grânulos citoplasmáticos que contém peptídeos antimicrobianos. Ao realizar a fagocitose, o neutrófilo é ativado a gerar as espécies reativas de oxigênio (ROS), que é dependente da ativação do complexo multiprotéico, denominado NADPH oxidase. A ativação resulta na transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, gerando ânions de superóxidos. Os superóxidos são capazes de atuar diretamente sobre os microrganismos nos fagossomas ou podem ser liberados para o meio extracelular (RADA & LETO, 2008; NAUSEEF & BORREGAARD, 2014). Esses compostos são tóxicos para os microrganismos, ocasionando a degradação rápida de DNA, lipídeos e proteínas (SU et al., 2019).

Outro mecanismo efetor é a degranulação, ou seja, a liberação do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos e de vesículas para o meio extracelular com propriedades antimicrobianas. Esses grânulos são compostos por serino proteases, metaloproteases, lisozima e proteínas relacionadas ao estresse oxidativo. Esse mecanismo ocorre de forma direcionada, evitando a propagação de danos ao tecido em que houve a infecção (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003).

1.2.1.1 Redes extracelulares de neutrófilos (NETs)

A liberação das redes extracelulares de neutrófilos (do inglês *Neutrophil Extracellular Traps* – NETs) constitui uma estratégia extracelular utilizada pelos neutrófilos para imobilizar e eliminar microrganismos. Após ativação, os neutrófilos liberam para o meio extracelular sua cromatina descondensada, em forma de rede, associada a diversas proteínas citoplasmáticas e dos seus grânulos, como ilustrado na tabela 1. Em análise proteômica, descobriu-se que as NETs são compostas por proteínas de diferentes compartimentos celulares, sendo as histonas e a elastase as proteínas mais abundantes desta estrutura. Além destas proteínas, as NETs podem conter citocinas, como a IL-17 (LIN et al., 2011).

Tabela 1. Proteínas associadas às NETs	
Localização celular	Proteína
Grânulos	Elastase
	Lactotransferrina
	Azurocidina
	Catepsina G
	Mieloperoxidase
	Proteinase 3
	Lisozima C
Núcleo	Defensinas 1 e 3
	Histona H2A
	Histona H2B, Histona H2B-like
	Histona H3
Citoplasma	Histona H4
	S100 Proteína ligadora de Cálcio A8
	S100 Proteína ligadora de Cálcio A9
	S100 Proteína ligadora de Cálcio A12
Citoesqueleto	Actina
	Miosina-9
	Alfa-actinina
	Plastina
	Citoqueratina-10
Peroxisomas	Catalase
Enzimas glicolíticas	Alfa-enolase
	Transquetolase

Tabela 1: Proteínas de diferentes compartimentos celulares que estão associadas às NETs (Adaptado de URBAN et al., 2009).

A netose pode ser induzida por bactérias, fungos, vírus e protozoários e por meio de diferentes moléculas fisiológicas, sintéticas ou associadas a microrganismos, (PAPAYANNOPOULOS, 2018). Além disso, outras células do sistema imunológico liberam redes de DNA em forma de rede. Mastócitos, eosinófilos, monócitos, macrófagos e linfócitos já foram relatados como células capazes de liberar ETs (*extracellular traps*) após ativação com diferentes estímulos (SCHORN et al., 2012; MOLLERHERM, KOCKRITZ-BLICKWEDE & BRANITZKI, 2016; DOSTER et al., 2018; KOH et al., 2020). Como foi demonstrado por Webster e colaboradores (2010), monócitos quando expostos a bactérias também apresentavam a capacidade de liberar redes extracelulares. Outra célula com essa capacidade é o eosinófilo, que dependendo do estímulo, pode liberar ETs compostas por DNA mitocondrial. Tal ativação pode acontecer após o estímulo por IFN- γ e IL-5, e nesse caso, não acarretando na morte do eosinófilo (YOUSEFI et al, 2008). Além disso, os macrófagos também produzem ETs (BARTNECK et al, 2010).

Fuchs et al (2007) observaram que o processo de liberação das NETs, chamado de NETose, consistia em um tipo de morte celular diferente da apoptose e necrose. Diferentemente da apoptose, na netose não há a fragmentação do DNA, como observado pelo método de TUNEL e não há exposição de fosfatidilserina antes da morte do neutrófilo. Além disso, a ativação de caspases é fundamental na ativação da apoptose, mas não da netose. No caso da necrose, a diferença reside principalmente nas alterações morfológicas da membrana nuclear. Durante a netose, a membrana nuclear se fragmenta em vesículas, permitindo que o conteúdo nuclear se misture ao conteúdo dos grânulos presentes no citoplasma da célula, ao contrário da necrose, onde a membrana nuclear permanece intacta (FUCHS et al., 2007).

Hoje sabemos que o processo de liberação das NETs (Figura 3) pode ocorrer de duas formas: pela netose clássica ou pela netose rápida. Na netose clássica, a membrana nuclear se desintegra, enquanto a cromatina é descondensada, acarretando na sua mistura com os componentes citosólicos e granulares. Há a ruptura da membrana plasmática, gerando a liberação das NETs entre 1 a 8 horas após a ativação dos neutrófilos. A netose clássica é dependente da formação de ROS pela NADPH oxidase. Já a netose rápida, ou não lítica, é independente da produção de ROS e é também chamada de netose vital, pois o neutrófilo ainda permanece viável após a liberação das NETs (PAPAYANNOPOULOS, 2017; ROCHAEL et al., 2015). A bactéria *Staphylococcus aureus*, por exemplo, ativa a via rápida

de produção de NETs, sem depender de espécies reativas de oxigênio e sem envolver a morte do neutrófilo. Após 5 minutos de interação com esta bactéria, neutrófilos liberam as redes. Nesse mecanismo, vesículas contendo DNA brotam da membrana nuclear e são liberadas no meio extracelular, onde se rompem e liberam as estruturas em forma de rede que prendem e matam *S. aureus* (PILSCZEK et al., 2010).

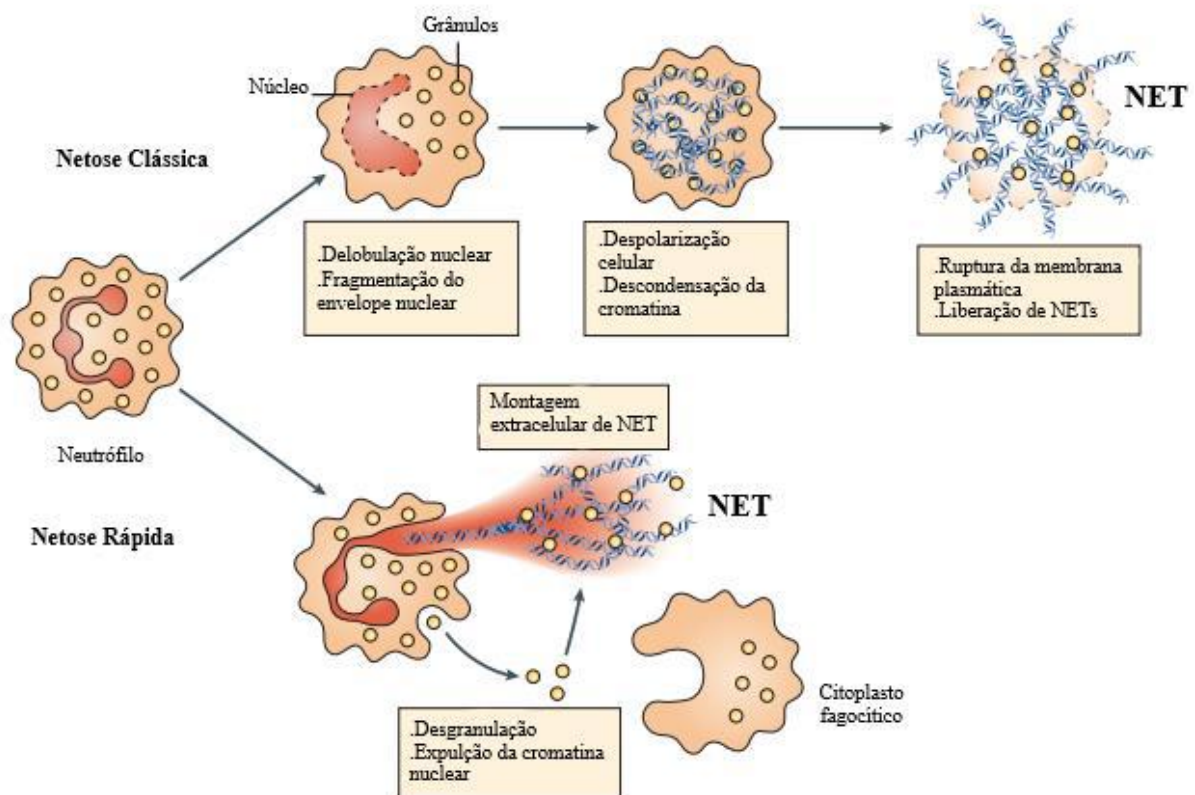


Figura 3: Vias de formação da netose. A netose clássica ocorre com a fragmentação do envelope nuclear, descondensação da cromatina e ruptura da membrana plasmática. A netose rápida ou não lítica ocorre pela liberação da cromatina em vesículas provenientes da membrana nuclear, que se associam às proteínas granulares liberadas por degranulação no meio extracelular (PAPAYANNOPOULOS, 2018).

A descondensação da cromatina é um estágio importante no decorrer da netose. Ela é realizada a partir da deaminação de resíduos de arginina nas histonas, reação catalisada pela enzima peptidil arginina deaminase (PAD4). Em neutrófilos tratados com staurosporina ou camptotecina, ou seja, neutrófilos induzidos a morrerem por apoptose, histonas hipercitrulinadas não são observadas. Além disso, camundongos nocaute para PAD4 são ineficientes no controle de infecções por bactérias por não serem capazes de produzir NETs (WANG et al., 2009). Outro mecanismo reportado para a descondensação da cromatina tem a elastase e mieloperoxidase como protagonistas. Após ativação de neutrófilos, a elastase migra dos grânulos citoplasmáticos para o núcleo da célula, promovendo a descondensação da cromatina, por meio da degradação parcial de histonas. Posteriormente, a mieloperoxidase também migra para o núcleo e, participa auxiliando na descondensação da cromatina por um mecanismo ainda desconhecido. Neutrófilos que foram tratados com inibidor específico para a elastase não liberam NETs. Além disso, a importância da elastase foi confirmada com o uso de animais nocautes para o gene que codifica a elastase. Durante a infecção por *Klebsiella pneumoniae*, neutrófilos de camundongos nocautes para elastase não produzem NETs em comparação aos camundongos selvagens (PAPAYANNOPOULOS et al., 2010).

A elastase neutrofílica é uma serina protease, armazenada em grânulos azurófilos no citoplasma de neutrófilos. Essas proteases podem ser externalizadas no decorrer da ativação dos neutrófilos no ambiente inflamatório, auxiliando na regulação de respostas inflamatórias e na participação da degradação de patógenos pelas NETs, ou podem atuar no meio intracelular, degradando microrganismos nos fagossomas, associada com peptídeos microbicidas e o sistema NADPH oxidase (SEGAL, 2007; KORKMAZ et al., 2010). Diversos estudos demonstraram a participação da elastase na morte de microrganismos, como sua participação na degradação de proteína A da membrana de *E. coli*, acarretando na morte da bactéria (BELAAOUAJ, KIM & SHAPIRO, 2000), bem como relatam a participação da elastase na clivagem de fatores de virulência de enterobactérias (WEINRAUCH et al., 2002). Além disso, podem estar associadas também em doenças inflamatórias não infecciosas, como artrite inflamatória (ADKINSON et al., 2002) e a síndrome do desconforto respiratório agudo (MORAES et al., 2003). Essas serinas proteases ao serem liberadas para o meio extracelular, podem desempenhar uma função moduladora da resposta inflamatória, modificando quimiocinas e citocinas, e ativando receptores de superfície (PHAM, 2008). Há, ainda, mutações no gene da elastase neutrofílica que acarretam doenças hereditárias, como a

neutropenia cíclica, em que os pacientes apresentam níveis de neutrófilos circulantes extremamente baixos, ocasionando episódios de infecções recorrentes (APRIKYAN & DALE, 2001).

A função primordial das NETs é de conter e eliminar os microrganismos. As NETs são capazes de aprisionar os patógenos, impedindo sua disseminação no organismo e, por conterem diferentes componentes antimicrobianos, estas redes concentram esses compostos tóxicos que podem levar os microrganismos à morte. (BRINKMANN et al., 2004). Porém, além das ações benéficas que auxiliam a resposta contra patógenos, as redes extracelulares podem apresentar também consequências prejudiciais ao organismo. As histonas presentes nas NETs induzem a morte de células epiteliais e endoteliais (SAFFARZADEH et al 2012; VILLANUEVA et al. 2011) e causam danos ao epitélio pulmonar durante infecção por fungo (BRANZK et al 2014). Entretanto, na presença de DNase a estrutura das NETs é desfeita e o efeito danoso é eliminado (SAFFARZADEH et al, 2012). Na sepse causada por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, estas estruturas podem causar danos ao fígado. Esse efeito deletério não é observado em camundongos deficientes para a PAD4 e elastase (KOLACZKOWSKA et al., 2015). Essas redes também podem causar a oclusão da vasculatura e, desta forma, as NETs promovem trombose. O tratamento de camundongos com DNase ou inibidores de PAD4 bloqueiam a trombose de veia profunda (BRILL et al. 2011).

1.2.1.2 As NETs na modulação das respostas efectoras de outras células do sistema imunitário

Além do seu papel microbicida, as redes extracelulares de neutrófilos também possuem um papel imunomodulador. As NETs são capazes de ativar a produção de IFN- α por células dendríticas plasmocitóides (pDCs), constituindo os maiores indutores da produção de IFN do tipo I em pacientes com Lúpus eritematoso sistêmico (LES) (LANDE et al., 2007, 2011; GARCIA-ROMO et al., 2011). As pDCs reconhecem o DNA pelos receptores TLR9, como revelado com a utilização do oligonucleotídeo TTAGGG, um agonista sintético de TLR9, capaz de inibi-lo especificamente, bloqueando a indução de IFN- α das DCs (LANDE et al., 2007). A presença de MCETs (*mast cells extracellular traps*) foi observada em biópsias de pacientes com psoríase, contendo de IL-17 e IL-23, presentes no momento de liberação

das armadilhas extracelulares. Essas citocinas são importantes na indução de resposta Th17, que está relacionada ao desenvolvimento dessa doença. Além dos mastócitos, o grupo observou que neutrófilos liberam IL-17 junto com as NETs. (LIN et al., 2011). Durante a psoríase, neutrófilos de baixa densidade (LDNs, do inglês *low density neutrophils*) são liberados na circulação e migram para o tecido inflamado. Estes neutrófilos liberam NETs de forma mais proeminente (LIN et al., 2011). Tillack e colaboradores (2012) avaliaram também o efeito das NETs em pDCs, cujos marcadores de ativação e maturação CD40, CD80, CD83 e CD86 tiveram sua expressão aumentada após o tratamento com as NETs. Além disso, quando pDCs foram co-cultivadas com linfócitos T, e ambos tratados com NETs, foi observada a proliferação e liberação de IFN- γ , diferentemente das co-culturas em que as células T não foram tratadas, sugerindo que a sua ativação não foi realizada pelas pDCs (TILLACK et al., 2012).

Alguns estudos relataram a capacidade das NETs em ativar linfócitos B e T (PUGA et al., 2012; TILLACK et al., 2012). Estas redes foram capazes de realizar o estímulo para a ativação das células T, aumentando suas respostas contra antígenos específicos, inclusive os estímulos realizados abaixo do ideal, o que normalmente não acarretaria a resposta de células T. Essa ativação ocorre a partir do contato direto das células com as NETs estimulando a expressão de CD25 e CD69, assim como a fosforilação da tirosina quinase ZAP70 associada ao TCR. Os linfócitos estimulados pelas NETs em contato com as células dendríticas foram capazes de ativar linfócitos TCD4, como demonstrado pela proliferação linfocitária e liberação de IFN- γ , até na ausência de um antígeno específico (TILLACK et al., 2012).

Em 2012, foi demonstrado que neutrófilos, após migrarem para o baço, colonizam a região da zona marginal interagindo com células B. Os neutrófilos, então, liberam as redes extracelulares que, através de um mecanismo dependente de proteínas regulatórias de células B, interagem e ativam essas células. Esse mecanismo usa APRIL, um ligante que induz a proliferação, BAFF, um fator de ativação de célula B, e IL-21. As NETs estimulam linfócitos B na zona marginal a realizarem a troca de classes de imunoglobulinas, hipermutação somática e a produzirem anticorpos (PUGA et al., 2012).

O efeito das NETs em macrófagos tem resultados conflitantes descritos na literatura. Alguns estudos mostram que as NETs são inflamatórias, outros que são anti

inflamatórias ou até mesmo não tem efeito modulador nestas células. Na infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, as NETs possuem a capacidade de modular as células adjacentes através das proteínas presentes nas redes, como foi observado na interação de macrófagos com NETs derivadas da ativação de neutrófilos com a bactéria. As proteínas de choque térmico Hsp 72, presentes nas NETs, induzem a liberação de IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-10 pelos macrófagos cultivados na presença de neutrófilos ativados pela bactéria. Tal fato não foi observado quando os macrófagos foram incubados com neutrófilos ativados por forbol de miristato acetado (PMA), ou seja, o efeito provocado pelas NETs pode variar de acordo com o estímulo utilizado experimentalmente (BRAIAN, HOGEA & STENDAHL, 2013). Mais recentemente, foi demonstrado que as NETs carregam micro-RNAs, que induzem a produção de TNF-alfa por macrófagos primários (LINHARES-LACERDA et al., 2020) e, portanto, as NETs assumem um potencial inflamatório.

Lazzaretto e Fadeel (2019) observaram alterações morfológicas em células dendríticas derivadas de monócitos e macrófagos derivados de monócitos que foram incubados na presença das NETs. Os macrófagos tratados com NET apresentam vacúolos citosólicos, provenientes da captação das redes. O grupo observou que as células dendríticas não tratadas com NETs apresentavam dendritos curtos e não aderentes ao plástico, diferentemente das células tratadas com as redes, que estavam fortemente aderidas e com longos dendritos. Macrófagos e DCs tratados com NETs e LPS produziram maiores quantidades de IL-1 β , IL 8 e IFN- γ e menores quantidades de IL-10, IL-12 e VEGF comparados aos macrófagos ou DCs ativados apenas por LPS. Contudo, o tratamento com NETs, na ausência de LPS, não resultou em uma resposta inflamatória, ou seja, não houve alteração na produção de citocinas inflamatórias. Os marcadores de superfície de ativação e maturação também foram avaliados, e o grupo observou que o tratamento das DCs com as NETs diminuiu a expressão das moléculas CD80, CD83 e CD86. Estas moléculas são importantes coestimuladoras e primordiais para a correta ativação dos linfócitos T. Desta forma, as NETs podem afetar o tipo de resposta adaptativa gerada (LAZZARETTO & FADEEL, 2019). O estudo ainda mostrou que DCs e macrófagos eliminam estas estruturas após endocitarem as NETs, mas também no meio extracelular (LAZZARETTO & FADEEL, 2019). Os monócitos também podem participar na eliminação destas redes extracelulares, mas a interação com as histonas e elastase das NETs induz os próprios monócitos a liberarem redes extracelulares (HARITHA et al., 2019).

1.2.1.3 NETs e elastase na infecção por *Leishmania*

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na corrente sanguínea e uma das primeiras células a estabelecer contato com o parasito inoculado na poça de sangue formada durante o repasto sanguíneo do vetor. Rapidamente neutrófilos são recrutados para o local da picada via produção de quimiocinas locais, como a IL-8, ou pelo dano causado pela picada (LASKAY et al., 2003; PETERS et al., 2008). Nosso grupo demonstrou que o parasito *Leishmania* induz a liberação de redes extracelulares de neutrófilos humanos (GUIMARÃES COSTA et al., 2009). Promastigotas de *Leishmania* ativam os dois tipos de netose em neutrófilos humanos: a clássica e a rápida (ROCHAEL et al., 2015). Estes parasitos ficam imobilizados e são mortos pela ação tóxica das histonas presentes nas NETs (GUIMARÃES COSTA et al., 2009). Para confirmar a presença das NETs *in vivo*, biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea foram analisadas, e NETs foram observadas tanto em áreas de cicatrização como em áreas de infiltrado inflamatório (GUIMARÃES-COSTA et al., 2009, MORGADO et al., 2015). Mais recentemente, foi demonstrado que neutrófilos de pacientes com leishmaniose visceral produzem menos NETs que controles saudáveis. Além disso, esses neutrófilos apresentaram uma menor capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio quando foram incubados com *L. donovani* (YIZENGAW, 2016). Em 2010, Gabriel e colaboradores confirmaram os dados do nosso grupo ao mostrarem que promastigotas de *L. donovani* ativam a produção de NETs e são presas por estas estruturas. Contudo, o grupo relatou que os parasitos resistem à morte mediada pela NET. Essa resistência pode ser devida a diferenças no lipofosfoglicano, glicoconjugado majoritário presente em toda a superfície do parasito. Além disso, a inibição da produção de ROS por difenilenodônio (DPI) não inibiu a formação das redes, evidenciando mecanismo de indução de NETs desencadeado pelo parasito independente da geração de ROS (GABRIEL et al., 2010).

Chagas e colaboradores (2014) demonstraram que a saliva dos insetos vetores da *Leishmania* possui uma endonuclease, chamada Lundep, que cliva as redes extracelulares de neutrófilos induzidas por *L. major*. Em um modelo de infecção *in vivo*, o grupo demonstrou que a inoculação de parasitos com a Lundep aumenta a infecção, sugerindo que as NETs possuem um papel microbicida importante *in vivo* (CHAGAS et al., 2014). O parasito *Leishmania* expressa em sua membrana a enzima 3'nucleotidase/nuclease, que, como o nome sugere, possui atividade nuclease e quebra DNA. Nosso grupo demonstrou que a 3'nucleotidase/nuclease quebra as NETs induzidas por neutrófilos humanos ativados

com *Leishmania*, permitindo que o parasito escape das redes e sobreviva aos efeitos tóxicos das NETs (GUIMARAES-COSTA et al., 2014).

As NETs também podem ter efeito deletério na infecção por *Leishmania*. Nosso grupo demonstrou que as NETs interferem na diferenciação dos monócitos em células dendríticas. Os monócitos, na presença de IL-4 e GM-CSF, diferenciam-se em células dendríticas (DCs). Demonstramos que o tratamento de monócitos com as NETs diminui a expressão da cadeia alfa do receptor para a IL-4 (IL4Ra), impedindo a diferenciação destas células em DCs. As NETs, e principalmente a elastase presente nas NETs, diminuem a expressão de RNA mensageiro para IL4Ra, bem como digerem o receptor na superfície do monócito. Desta forma, demonstramos que as NETs podem alterar a expressão de receptores na superfície de outras células. Os monócitos tratados com as NETs diferenciam-se em macrófagos com perfil anti-inflamatório: alta produção de TGF- β e IL-10 e baixa produção de IL-12 e TNF- α , após estímulo por LPS, permitindo a maior sobrevivência do parasito *Leishmania* (GUIMARÃES-COSTA et al., 2017)

A elastase parece ter papel importante durante a infecção por *Leishmania*. Dias e colaboradores (2019) demonstraram que macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados com *L. donovani* apresentavam uma maior sobrevivência do parasito em 24 horas, comparados com macrófagos tratados com um inibidor irreversível de NE (NEI), ou com macrófagos NE nocaute (*ela2* $-/-$), sugerindo que a presença da elastase é necessária para a sobrevivência do parasito. Em seguida, a adição de elastase exógena nos macrófagos *ela2* $-/-$ restaurou a quantidade de parasitas intracelulares para níveis semelhantes aos macrófagos WT, após uma infecção por 72 horas. Esse aumento da carga parasitária favorecida pela elastase também foi vista no baço e no fígado dos camundongos (DIAS et al., 2019). Além disso, o grupo relatou que os TLR2 e TLR4 são necessários para o desenvolvimento do parasito, dependente de NE. Isso foi observado em macrófagos nocautes para estes dois TLRs, que internalizaram um número de parasitas semelhantes aos WT nas primeiras 3 horas. Entretanto, após 72 horas, os macrófagos nocautes apresentaram um número de *L. donovani* menor em comparação ao WT. Isso foi restaurado com a adição de NE exógeno em macrófagos não tratados com anticorpo neutralizante para TLR4, enquanto os tratados mantiveram o número baixo (DIAS et al, 2019)

O efeito da elastase nos macrófagos pode variar de acordo com a espécie de *Leishmania* estudada. Ribeiro-Gomes e colaboradores (2007) demonstraram que a elastase neutrofílica ao interagir com macrófagos infectados com *L. major* foi capaz de induzir a morte do parasito. Isso foi observado em camundongos C57BL/6 mutante pallid, em que os neutrófilos liberam quantidades reduzidas de NE, comparados a camundongos WT. Nesse estudo os neutrófilos pallid aumentaram a replicação do parasito em macrófagos, enquanto os neutrófilos WT reduziram a sobrevivência da *L. major*, sugerindo que a elastase apresenta uma atividade leishmanicida. A seguir, avaliaram que atividade leishmanicida da elastase depende da produção de TNF- α e da ativação de TLR4. A quantidade de TNF- α em sobrenadante de macrófagos infectados foi maior quando tratados com elastase. Já quando adicionado um anticorpo neutralizante para TNF- α , os macrófagos previamente tratados com NE aumentaram a sobrevivência do parasito. Em experimentos *in vivo* com camundongos C3H/HeJ, que apresentam uma mutação gerando perda de função do TLR4, carga parasitária nos linfonodos drenantes foi a mesma na presença ou ausência da NE, diferentemente do que ocorreu com os camundongos C3H/HeN, que após serem tratados com NE tiveram uma redução na carga parasitária dos linfonodos drenantes (Ribeiro-Gomes et al., 2007) Os efeitos da elastase podem variar de acordo com o modelo experimental utilizado, bem como com a espécie avaliada. Durante a infecção por *Leishmania*, o efeito da elastase conjugada nas NETs foi pouco avaliado. Contudo, em 2017, nosso grupo demonstrou que monócitos, infectados com *L. amazonensis*, tratados com NETs eliminam menos eficientemente os parasitos e o tratamento das NETs com inibidor de elastase reverte este efeito (GUIMARAES-COSTA et al., 2017).

1.3 Monócitos na infecção por *Leishmania*

Os monócitos são leucócitos mononucleares, derivados de precursores da medula óssea, que entram na circulação sanguínea, e migram para os tecidos. Em humanos, essas células correspondem a 10% das células nucleadas na circulação sanguínea (GINHOUX & JUNG, 2014). Além disso, são divididos em subpopulações que apresentam diferentes tamanhos, expressão de receptores e capacidade de diferenciação celular após a estimulação por citocinas e moléculas microbianas. São células fagocíticas e podem adquirir funções pró ou anti-inflamatórias, já que podem ser moduladas dependendo do microambiente em que se encontram. Os monócitos circulantes patrulham a parede dos vasos sanguíneos, migrando

para o tecido na presença de sinais quimiotáticos. No tecido inflamado, essas células atuam reconhecendo e eliminando microrganismos patogênicos e células apoptóticas (AUFFRAY, 2007; STRAUSS-AYALI D, CONRAD SM & MOSSER, 2007; AUFFRAY, SIEWEKE & GEISSMAN, 2009; GINHOUX & JUNG, 2014). São células versáteis e apresentam a capacidade de se diferenciarem em macrófagos, células dendríticas (DC) ou osteoclastos, dependendo das citocinas pelas quais são estimulados (GEISSMAN, JUNG & LITTMAN, 2003). Essa diferenciação pode alterar o rumo da infecção, no caso da *Leishmania*, pois ao se diferenciarem em macrófagos podem auxiliar no progresso da infecção, já que o macrófago é a célula hospedeira deste parasito (KAYE & SCOTT, 2011).

Os monócitos humanos são divididos em 3 subpopulações, que se diferenciam pela expressão das moléculas CD14 e CD16. Os monócitos clássicos apresentam altos níveis de CD14, mas não expressam CD16 (CD14⁺⁺CD16⁻). Os intermediários expressam as duas moléculas (CD14⁺CD16⁺). Já o não clássico, baixos níveis de CD14 e altos de CD16 (CD14^{low}CD16^{high}) (PASSOS et al., 2015). Cada subpopulação apresenta características funcionais distintas determinadas por análises de microarray, citometria de fluxo e produção de citocinas (WONG et al., 2011). Os monócitos clássicos expressam genes envolvidos na angiogênese e cicatrização, sendo importantes no reparo tecidual, mas também possuem expressão de genes pró inflamatórios. Já os monócitos intermediários expressam altas quantidades de MHC de classe II, indicando que são importantes na apresentação de antígeno. E os monócitos não clássicos expressam genes envolvidos no rearranjo do citoesqueleto, que pode ser responsável pelas características de patrulhamento, bem como citocinas inflamatórias, CD294 e Siglec 10 (WONG et al., 2011).

Na leishmaniose, o rumo da infecção é dependente da espécie de *Leishmania* e do sistema imunitário do hospedeiro vertebrado. É bem estabelecido que uma resposta imune protetora requer a geração de linfócitos TCD4 Th1 produtores de IFN-gama, citocina que ativa a produção de óxido nítrico (pela expressão da enzima óxido nítrico sintase – iNOS) e espécies reativas de oxigênio para a eliminação do parasito (CARNEIRO et al., 2020). Os monócitos e as células derivadas de monócitos são importantes para o estabelecimento de uma resposta Th1 protetora (LEON, LOPEZ-BRAVO & ARDAVIN, 2007; CARNEIRO et al., 2020). Podemos pensar que a modulação das respostas dos monócitos poderia alterar o curso da infecção. Por exemplo, um estudo realizado comparando as respostas imunes relacionadas com as espécies de *Leishmania mexicana* e *Leishmania major*, observou que as respostas

dependem da espécie do parasito. A *L. mexicana* apresenta uma deficiência no desenvolvimento de uma resposta Th1, feita pelas células dendríticas (DCs) derivadas de monócitos (mo-DCs), quando comparada com a *L. major*. Na infecção por *L. mexicana*, o recrutamento de monócitos foi menor e, após sua diferenciação em DCs, a expressão de iNOS e a migração para os linfonodos foram realizadas com menos eficiência (PETRITUS et al, 2012). As DCs derivadas de monócitos recrutados para a derme de camundongos infectados com *L. major* são essenciais para o controle da infecção. Da mesma forma, os monócitos também migram para o linfonodo drenante e se diferenciam em dendríticas no linfonodo e esta população é também importante para o controle da infecção (LEÓN, LOPEZ-BRAVO & ARDAVÍN, 2007). Nós demonstramos que as NETs e a elastase impactam negativamente a diferenciação dos monócitos em DCs (GUIMARAES-COSTA et al., 2017) e o impacto da interação entre monócitos e NETs *in vivo* ainda precisa ser investigado. Contudo, sabemos que durante a infecção de camundongos com *L. mexicana*, o recrutamento de neutrófilos para a pele está associado a menor geração de células dendríticas derivadas de monócitos (HURREL et al., 2015). Talvez a liberação de NETs-elastase e/ou a degranulação da elastase sejam responsáveis por esta diminuição na geração de mo-DCs.

O estudo de Carneiro e colaboradores (2016) demonstrou que monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea, após serem infectados com *L. braziliensis*, induzem uma maior explosão oxidativa comparada a pacientes saudáveis. Além disso, quando os monócitos infectados são tratados com um inibidor de ROS, há uma maior quantidade de parasitos viáveis, já que a molécula está vinculada com o controle do parasita. Entretanto, ainda há uma grande quantidade de monócitos que permanecem infectados. Esses autores correlacionaram ainda a produção de NO com o aumento da formação de lesões através da análise de biópsias. Quanto maior a produção de NO, maior a área da lesão (CARNEIRO et al., 2016). Ou seja, parece que na infecção de monócitos por *L. braziliensis*, a produção de ROS é essencial para a eliminação do parasito e a produção de NO pode estar associada à destruição do tecido.

As diferentes subpopulações de monócitos podem ter papéis distintos durante a infecção. Novais e colaboradores (2014) avaliaram a interação das diferentes subpopulações de monócitos humanos com *Leishmania brasiliensis* e a produção de ROS para o controle de parasitos. Com isso, observaram que tanto promastigotas, quanto amastigotas induziram a

explosão oxidativa e que, conseqüentemente, o ROS impediu o crescimento do parasito. A seguir, avaliaram que cada subpopulação de monócitos apresenta uma expressão de ROS diferenciada, sendo os clássicos que geram mais ROS, seguido pelo intermediário e o não clássico, mesmo que a interação entre monócitos e *Leishmania* tenha sido semelhante. Já os monócitos ativados por IFN- γ também foram capazes de controlar a quantidade de amastigotas presentes pela produção de ROS, porém isso não ocorreu com a produção de NO (NOVAIS et. al, 2014). Os monócitos intermediários parecem ter um papel deletério durante a infecção e contribuem para as respostas imunopatológicas, pelo menos durante a infecção por *L. braziliensis* (PASSOS et al., 2014). O grupo observou que em pacientes infectados com *L. braziliensis*, os monócitos intermediários expressavam altas quantidades de CCR2 e que as lesões desses pacientes expressavam também altos níveis da quimiocina CCL2, indicando que essa subpopulação seria mais recrutada para a pele. Esses monócitos intermediários contribuem para as respostas imunopatológicas através da excessiva produção de TNF (fator de necrose tumoral) -alfa (PASSOS et al., 2014). Os intermediários também contribuem para a piora da infecção pela ativação do inflamassoma e conseqüente liberação de IL-1beta. A quantidade de IL-1beta produzida por monócitos intermediários de pacientes infectados com *L. braziliensis* se correlaciona com o tamanho da área de necrose do tecido (SANTOS et al., 2018).

2. JUSTIFICATIVA

As doenças transmitidas por insetos vetores constituem um grande problema de saúde pública mundial e são responsáveis por mais de 1 bilhão de novas infecções e mais de 1 milhão de mortes por ano (WHO, 2014). As leishmanioses, transmitidas pela picada do inseto vetor flebotomíneo, são zoonoses causadas por parasitos do gênero *Leishmania* e podem se manifestar clinicamente de diferentes formas. O Brasil é área endêmica para os três tipos de leishmaniose. A leishmaniose possui uma alta taxa de incidência mundial, com 1,3 milhões de novos casos registrados. Com 15.484 novos casos em 2019, o Brasil apresentou os maiores índices de casos tanto de leishmaniose cutânea, quanto de leishmaniose visceral. Apesar destes dados alarmantes, as leishmanioses ainda são consideradas como doenças negligenciadas, não existem vacinas disponíveis no mercado e pouco se sabe sobre os eventos iniciais da infecção.

Diante desse cenário, para conhecer melhor a infecção, é necessário estudar os eventos imunológicos envolvidos no estabelecimento da infecção. Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o sítio de infecção da *Leishmania* e são ativados para liberarem as NETs. Os monócitos, também recrutados para o local, podem interferir no desenvolvimento e na resolução da infecção, podendo ser influenciados pela espécie de *Leishmania* e pelo microambiente do tecido, gerando respostas pró ou anti-inflamatórias, que são moduladas dependendo do microambiente. Diversos estudos mostram que as NETs possuem a capacidade de modular a resposta de células do sistema imunológico, gerando a hipótese de que podem alterar a forma que os monócitos auxiliam no papel microbicida. Dessa forma, devido à presença dessas duas células na infecção, este trabalho visa estudar o impacto das NETs na resposta do monócito contra o parasito.

3. OBJETIVOS

Avaliar o efeito das redes extracelulares de neutrófilos nos monócitos infectados por *Leishmania*. Este estudo teve por objetivo avaliar especificamente:

- i. O efeito das NETs na sobrevivência dos parasitos dentro dos monócitos;
- ii. O papel da elastase neutrofílica na influência na sobrevivência dos parasitos;
- iii. Se o efeito das NETs é dependente da endocitose das redes pelos monócitos;
- iv. O papel das espécies reativas de oxigênio na sobrevivência do parasito.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Purificação de monócitos humanos

O sangue periférico foi coletado de doadores saudáveis por punção venosa em tubos tratados com heparina. Os monócitos foram isolados a partir do sangue, através de um gradiente de densidade, utilizando o reagente Ficoll-Histopaque (Sigma). Para a separação, dois volumes de sangue foram pipetados por cima de um volume de Ficoll e o tubo foi centrifugado por 30 min, na velocidade 400g, temperatura ambiente, sem freio. O anel contendo os PBMCs (do inglês, células mononucleares de sangue periférico) foi coletado e lavado com PBS estéril por três vezes em velocidade de 250g por 10 minutos. Ao fim da lavagem, os PBMCs foram ressuspensos em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute)- 1640 (LGC), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, LGC) e antibióticos (1x de penicilina e estreptomicina - Sigma). Os PBMCs foram incubados em placas de 96 poços (Jetbiofil), na densidade de $1 \times 10^6 / 200 \mu\text{l}$ por 2 horas, a 35°C, em atmosfera com 5% de CO₂. As células não aderentes foram descartadas por lavagem em PBS estéril, pré-aquecido a 35°C e os monócitos aderidos foram incubados em meio 200 microlitros de RPMI com SFB 10% até o momento de uso. Os experimentos realizados neste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho. O número de registro do projeto é 42615015.4.0000.5257.

4.2. Purificação de neutrófilos e produção de NETs

A purificação de neutrófilos foi realizada a partir do sangue de doadores saudáveis, utilizando ficoll-histopaque para separação por gradiente de densidade como descrito acima. A camada contendo os neutrófilos foi coletada e incubada com uma solução para lise hipotônica de hemácias (ACK, Ammonium-Chloride-Potassium) por 5 minutos. Este processo de lise foi repetido duas vezes para máxima lise das hemácias. O tampão de lise ACK é composto por NH₄Cl (150 mM), KHCO₃ (10 mM) e Na₂EDTA (0,1 mM). Em seguida, os neutrófilos foram lavados em PBS estéril e ressuspensos em meio RPMI sem soro.

Para produção dos sobrenadantes ricos em NETs, os neutrófilos (5×10^5) foram incubados por 4 horas, a 35°C /5% CO₂, com promastigotas de *Leishmania major*, em uma proporção de 10 neutrófilos para 1 parasito. O sobrenadante rico em NETs foi coletado e a dosagem de DNA foi realizada pelo método do reagente PicoGreen (Invitrogen) para a detecção de dsDNA, conforme as instruções do fabricante. Para quantificação das amostras, 25 ul do sobrenadante foram adicionados a 25 ul de tampão EDTA (TE) e 50 ul do corante PicoGreen, previamente diluído 200x em TE. A leitura foi realizada pelo fluorímetro SpectraMax (Molecular Devices) com a excitação de 485 nm e emissão de 535 nm. O cálculo da concentração de DNA presente nos sobrenadantes é feito a partir da curva padrão de DNA.

4.3. Cultivo do parasito

Os promastigotas de *Leishmania major* (cepa Friedlin) ou *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa) foram mantidos em meio Schneider's Insect Medium (LGC), suplementado com soro fetal bovino (10%). No quinto dia de cultivo, os promastigotas foram lavados com PBS por meio de centrifugação a 4000 RPM por 10 minutos. Esse processo foi repetido duas vezes e o parasito foi ressuspensado em RPMI, contado em Câmara de Neubauer e utilizado nos ensaios.

4.4. Análise da sobrevivência do parasito

Na placa contendo os monócitos aderidos, adicionamos os promastigotas de *L. major* ou *L. amazonensis* (2x) e a cocultura foi incubada em estufa de 35°C com 5% de CO₂ por 18

horas. Em seguida, os poços foram lavados com PBS estéril para a retirada dos parasitos livres. Com as placas contendo os monócitos infectados foram realizados 3 ensaios de sobrevivência. No primeiro, os monócitos infectados com *L.major* foram tratados ou não com NET (50 ng/ml, 100 ng/ml ou 250 ng/ml) em meio RPMI sem soro por 4 horas a 35°C, 5% de CO₂. Após 4h, meio RPMI com soro foi adicionado e a cocultura foi incubada por 48 horas, a 35°C em 5% de CO₂. No segundo ensaio, os monócitos infectados com *L.major* foram tratados com citocalasina D (Sigma, 1 ug/mL) por 30 minutos antes da adição das NETs. No terceiro ensaio, realizado com monócitos infectados com *L.major* ou *L. amazonensis*, adicionamos aos poços 200 ul de meio RPMI completo com ou sem elastase neutrofílica (200 ng/ml ou 400 ng/ml, Calbiochem). Os monócitos foram então incubados por 48 horas a 35°C, 5% de CO₂. Após os 2 dias de incubação, os monócitos de cada ensaio foram lisados em solução de RPMI com SDS 0,01% (50 µl) por 1 minuto. Logo em seguida, 230 ul de meio Schneider completo (SFB 10%) foi adicionado para o crescimento dos parasitos viáveis liberados após a lise dos monócitos. A placa foi então incubada por 48 horas a 26° C e os parasitas vivos e móveis foram contados em Câmara de Neubauer.

4.5. Quantificação de espécies reativas de oxigênio

Os monócitos foram infectados como descrito acima. Em seguida, foram lavados com PBS estéril para a retirada dos parasitos livres. Os monócitos infectados foram tratados com elastase (200 ng/ml ou 400 ng/ml), por 30 minutos, a 37°C/ 5% de CO₂. Após o tratamento, a sonda DHR 123 (1,2 uM, Sigma-Aldrich) foi adicionada à cultura e a produção das espécies reativas de oxigênio foi avaliada pelo fluorímetro SpectraMax (Molecular Devices) com a excitação de 507 nm e emissão de 529 nm. A produção de ROS foi acompanhada por 2 horas, com uma leitura a cada 10 minutos. Os dados foram reportados como *area under the curve* (AUC), calculada pelo programa GraphPad Prism 7.

4.6. Análise estatística

Os dados aqui reportados foram analisados pelo teste ANOVA e pós-teste Fishers LSD para comparar os diferentes grupos. As análises foram feitas no programa GraphPad Prism versão 8. Valores de p menores que 0,05 foram considerados como estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. As redes extracelulares de neutrófilos aumentam a sobrevivência de *L. major*

Primeiramente, avaliamos se a presença das NETs em uma cultura de monócitos infectados por *Leishmania major* poderia interferir na sobrevivência do parasito. Observamos que a presença das redes gerou um aumento significativo da sobrevivência da *Leishmania*. A concentração de 100 ng/ml de NET foi mais eficiente em promover essa sobrevivência (Fig 4A). Essa interação do monócito com as redes fez com que a sobrevivência fosse cerca de 5 vezes maior comparado ao controle não tratado (Fig 4B).

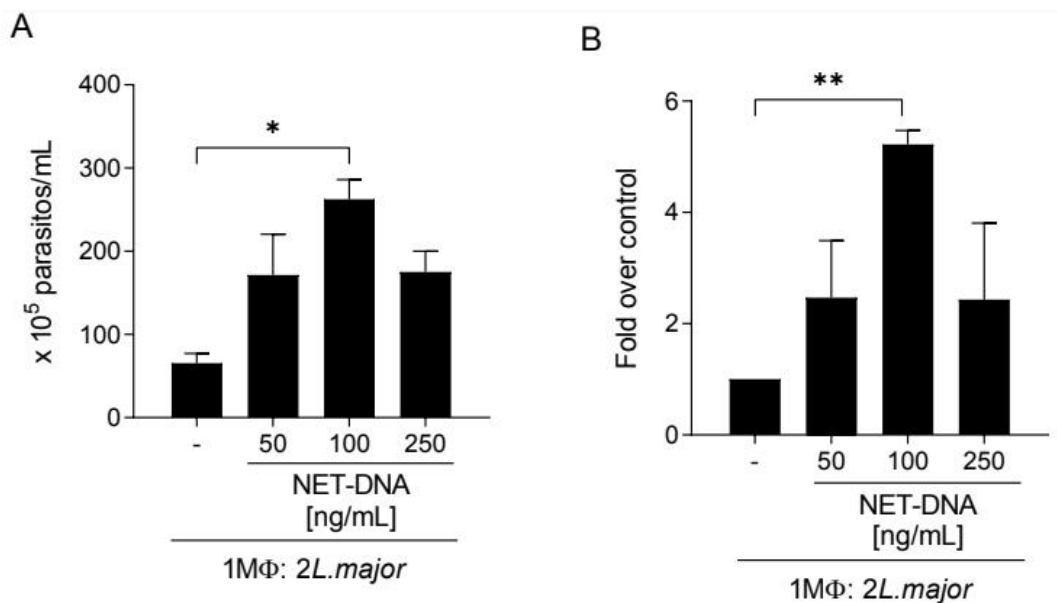


Figura 4: A presença das NETs aumenta a sobrevivência da *L.major*. Monócitos purificados de doadores saudáveis foram infectados por *L. major* em uma proporção de 1 monócito:2 parasitos, incubados por 18 horas a 35°C e 5% de CO₂. Os monócitos foram tratados com sobrenadantes ricos em NET nas concentrações indicadas e incubados por 48 horas a 35°C e 5% de CO₂. Os monócitos foram lisados com SDS 0,01%, em meio Schneider completo foi adicionado para o crescimento do parasito. Após 48 horas, os parasitas viáveis foram contados na câmara de Neubauer. Os resultados estão mostrados como média +/- SEM. n=5 doadores; *p<0,05 e **p<0,01. Os experimentos foram realizados em duplicatas. (A) número de parasitos por mililitro e (B) quantidade de parasitos em relação ao controle (primeira coluna).

5.2. O bloqueio da endocitose das NETs parece inibir o efeito das redes sobre os monócitos a sobrevivência de *L.major*

A citocalasina (citD) é uma substância capaz de inibir a polimerização de actina, impedindo a célula de realizar a fagocitose das redes. Com isso, os monócitos tratados com citocalasina antes da adição das NETs apresentaram uma eficiência maior em matar os parasitos. Nosso resultado preliminar mostra que na ausência da citocalasina houve um grande aumento na sobrevivência da *L.major* (Fig 5A). Essa interação com a citD fez com que a sobrevivência reduzisse cerca de 2,5 vezes comparado à cultura sem citD.

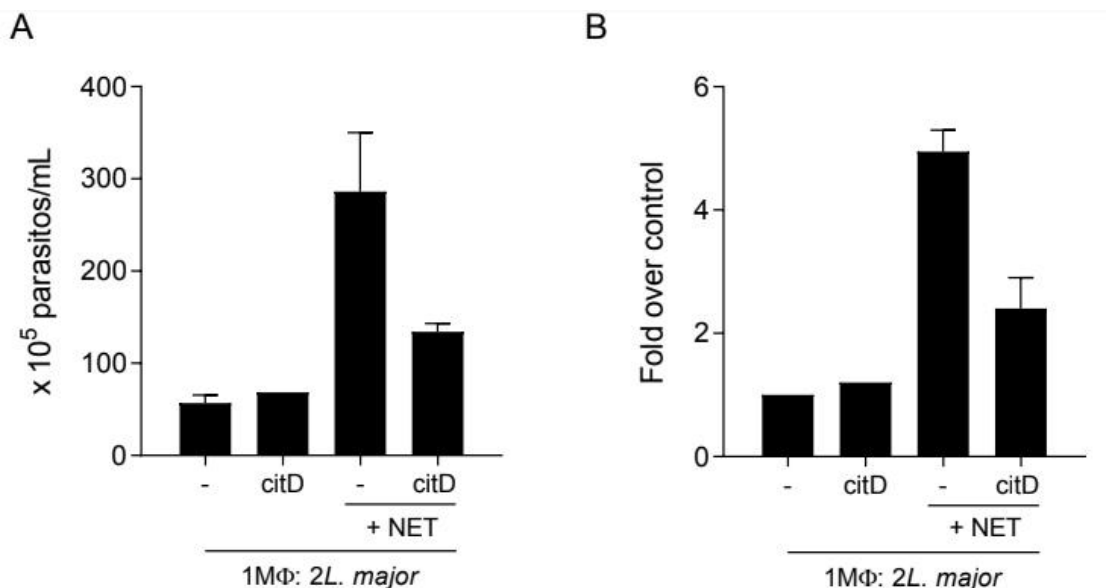


Figura 5: A citocalasina reduz a sobrevivência de *L.major* Os monócitos infectados por *L.major* foram tratados ou não com citocalasina D(1 g/ml) por 30 minutos a 35°C em 5% CO₂. As NETs (100 ng/ml) foram adicionadas nos grupos correspondentes e cultura foi incubada por 4 horas a 35°C em 5% CO₂. Em seguida, foi adicionado meio RPMI completo. Após 48 horas de incubação, os monócitos foram lisados com SDS 0,01%, e meio Schneider completo foi adicionado para o crescimento do parasito. Após 48 horas, os parasitas viáveis foram contados na câmara de Neubauer. Os resultados estão mostrados como média +/- SEM. n=3 doadores; os experimentos foram realizados em duplicatas. (A) número de parasitos por mililitro e (B) quantidade de parasitos em relação ao controle (primeira coluna)

5.3. A elastase aumenta a sobrevivência da *Leishmania major*

Posteriormente, avaliamos se a elastase, um componente presente na liberação das NETs, poderia intervir na sobrevivência da *L. major*. Observamos que a administração da elastase, nas concentrações de 200 ng/ml e 400 ng/ml, foram capazes de aumentar a sobrevivência do parasito (Fig 6A). Entretanto, a concentração de 200 ng/ml de elastase foi capaz de manter a sobrevivência cerca de 2 vezes mais em relação ao controle não tratado, enquanto a concentração de 400 ng/ml foi de 1,5 vezes maior que o controle (Fig 6B).

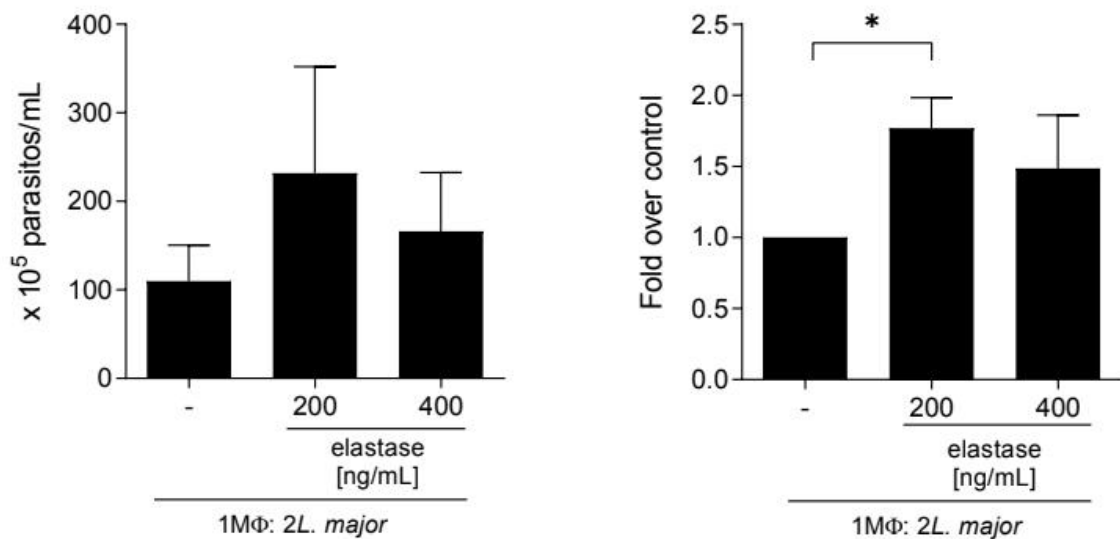


Figura 6: A elastase aumenta a sobrevivência de *L. major*. Os monócitos infectados por *L. major* foram tratados ou não com elastase nas concentrações indicadas e incubados por 48 horas a 35°C e 5% deCO₂. Após 48 horas de incubação, os monócitos foram lisados com SDS 0,01%, e meio Schneider completo foi adicionado. Após 48 horas, os parasitas viáveis foram contados na câmara de Neubauer. Os resultados estão mostrados como média +/- SEM. n=5 doadores; *p<0,05. Os experimentos foram realizados em duplicatas. (A) número de parasitos por ml e (B) quantidade de parasitos em relação ao controle (primeira coluna).

5.4. A elastase não altera a sobrevivência de *L. amazonensis*

Em seguida, avaliamos se esse aumento da sobrevivência também ocorreria com outra espécie de *Leishmania*, a *L. amazonensis*. Nossos resultados demonstraram que, diferentemente do que ocorreu com a *L. major*, a presença de elastase não alterou a sobrevivência intracelular da *L. amazonensis* (Fig 7A, B).

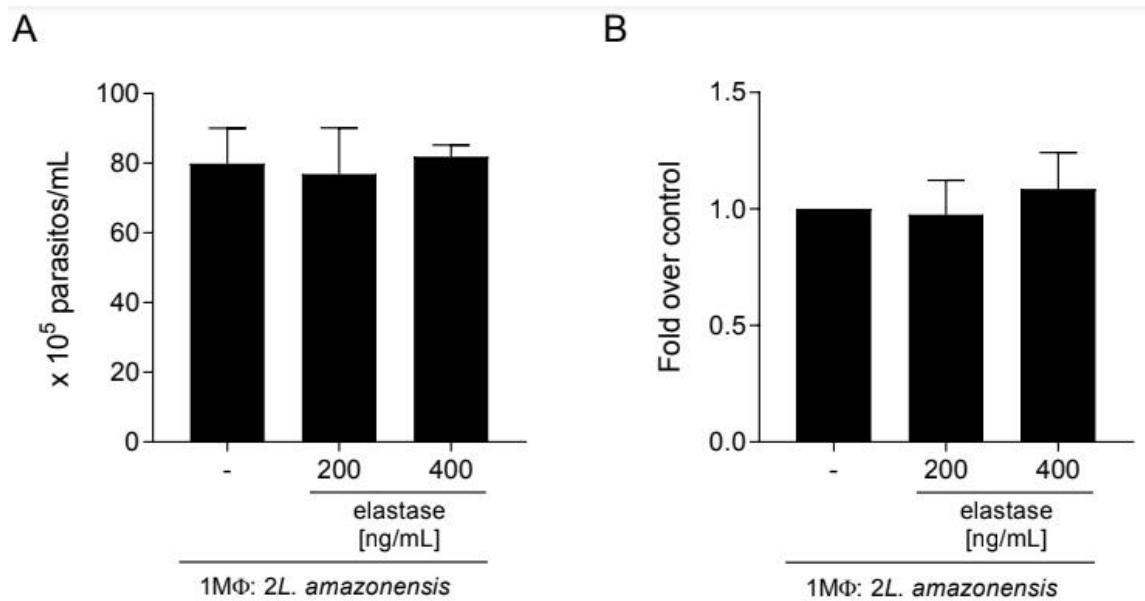


Figura 7: A elastase não altera a sobrevivência de *L. amazonensis*. Os monócitos infectados por *L. amazonensis* foram tratados ou não com elastase nas concentrações indicadas e incubadas por 48 horas a 35°C e 5% de CO₂. Após 48 horas de incubação, os monócitos foram lisados com SDS 0,01%, e meio Schneider completo foi adicionado. Após 48 horas, os parasitas viáveis foram contados na câmara de Neubauer. Os resultados estão mostrados como média +/- SEM. n=5 doadores; os experimentos foram realizados em duplicatas. (A) número de parasitos por ml e (B) quantidade de parasitos em relação ao controle (primeira coluna).

5.5. A elastase não afeta a produção de ROS

Avaliamos se a presença da elastase alteraria a produção de ROS pelos monócitos infectados com *L. major* (Fig 8A) e *L. amazonensis* (Fig 8B). Observamos que os infectados pelas duas espécies de *Leishmania* não apresentaram diferenças na produção de ROS quando tratados com as duas concentrações de elastase. Também não houve um aumento significativo na liberação de ROS do controle sem elastase comparados com o grupo não infectado.

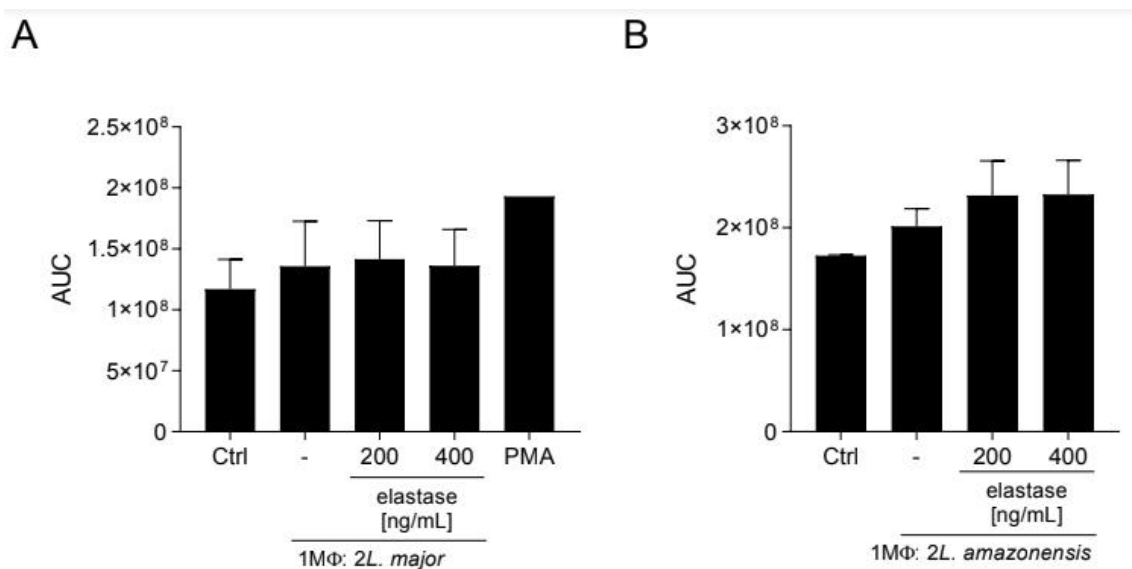


Figura 8: A presença da elastase não altera a liberação de ROS. Os monócitos infectados por (A) *L. major* ou (B) *L. amazonensis* foram tratados ou não com elastase nas concentrações indicadas e incubadas por 30 minutos. Em seguida a sonda DHR 123 (1,2 μ M) foi adicionada e a análise da produção das espécies reativas de oxigênio foi realizada por fluorimetria. Os resultados estão sendo mostrados como média da área da curva +/- SEM. n=5 doadores. Os experimentos foram realizados em duplicatas.

6. DISCUSSÃO

Durante a infecção por *Leishmania*, o parasito inoculado na derme do hospedeiro vertebrado entra em contato com os neutrófilos e outras células do sistema imunológico, que são recrutados para o local (PETERS et al., 2008). Nesse microambiente, os neutrófilos fagocitam o parasito na tentativa de eliminá-los ou realizam outros mecanismos efetores para a mesma finalidade, como a degranulação e a liberação de NETs. Nosso grupo, ao longo dos anos, vem estudando diferentes aspectos do papel das NETs produzidas por neutrófilos humanos na infecção por *Leishmania*, mas o papel imunomodulador das NETs durante a infecção ainda foi pouco abordado.

No presente estudo, avaliamos o impacto gerado pela presença das NETs na resposta dos monócitos contra *L. major*. As NETs, induzidas por promastigotas de *L. major*, quando adicionadas em uma cultura de monócitos infectados por *L. major*, geraram um aumento significativo na sobrevivência do parasito. Em 2017, nosso grupo já havia reportado que as NETs interagem com os monócitos *in vitro*, interferindo na diferenciação dos monócitos em células dendríticas. Entretanto, quando a atividade da elastase neutrofilica é inibida, os monócitos obtiveram sucesso na diferenciação para DC. Além disso, a presença das NETs induziu a diferenciação dos monócitos em macrófagos com perfil anti-inflamatório, produzindo interleucina-10 (IL-10) e fator transformador de crescimento- β (TGF- β), favorecendo a sobrevivência de *L. amazonensis*. Comparado ao que demonstramos para *L. amazonensis*, o efeito das NETs na infecção por *L. major* parece ser mais proeminente. Os parasitos sobreviveram 5x mais na presença de NETs, ao passo que os dados com *L. amazonensis* mostram que esta espécie sobrevive por volta de 1,5x mais em relação ao controle não tratado com NETs (GUIMARAES-COSTA et al., 2017). Algumas diferenças podem talvez explicar estes dados. Em nosso trabalho anterior, os monócitos infectados com *L. amazonensis* foram tratados com 1 μ g/ml de NETs, concentração 10x maior do que a que estamos utilizando no presente estudo. Além disso, os monócitos infectados com *L. amazonensis* haviam sido tratados com IL-4 e GM-CSF para induzir a diferenciação em DC (GUIMARAES-COSTA et al., 2017). Embora ambos os parasitos sejam agentes causadores de leishmaniose cutânea, as diferenças entre as espécies podem explicar os resultados obtidos nos dois estudos. Estas variações experimentais tornam a comparação mais

difícil de ser feita. Mais estudos realizados em paralelo poderão esclarecer o comportamento das diferentes espécies de *Leishmania* durante o tratamento com as NETs.

O aumento da sobrevivência de *L. major* em monócitos também foi avaliado após o tratamento com elastase, uma proteína associada às NETs. A adição de elastase à cultura de monócitos infectados por *L. major* aumentou a sobrevivência desses parasitos. Entretanto, quando avaliamos a sobrevivência da *L. amazonensis*, não observamos diferença entre os grupos tratados e não tratados com elastase. Em contraste com o nosso trabalho, outros autores mostraram que a elastase pode apresentar uma atividade protetora contra o parasito. Ribeiro Gomes e colaboradores demonstraram que, em modelo murino, a elastase neutrofílica é capaz de ativar macrófagos, por meio do receptor Toll-like 4 (TLR4) e consequente produção de TNF-alfa, induzindo a morte do parasito (RIBEIRO-GOMES et al., 2007). Contudo, na infecção por *L. donovani*, espécie causadora de leishmaniose visceral, a elastase exacerba a infecção de macrófagos via ativação da produção de IFN-beta (DIAS et al., 2019). Em nossos ensaios, a elastase piora a infecção, mas nós trabalhamos com monócitos humanos e esta diferença experimental pode explicar os resultados conflitantes com o trabalho de Ribeiro e colaboradores. De toda forma, seria interessante quantificar essas citocinas no sobrenadante dos nossos experimentos, bem como avaliar a participação de TLR4 no efeito exacerbador das NETs. Além disso, não descartamos a participação de outros componentes presentes nas NETs na modulação das respostas dos monócitos infectados.

Os monócitos recrutados durante o repasto sanguíneo dos flebotomíneos também fagocitam os parasitos. As células derivadas de monócitos são necessárias para diversas funções imunológicas, porém também podem atuar como células permissivas e auxiliar na propagação do parasito (ROMANO et al., 2017; MOSSER e EDWARDS, 2008) Carneiro e colaboradores (2020) mostraram que, no início da infecção, ocorre um recrutamento de monócitos permissivos para a orelha de camundongos infectados com *L. major*. Logo no início da infecção na pele, essas células adquirem um fenótipo anti inflamatório, com alta expressão de MHCII, PDL2 e Arginase e são as responsáveis pelo estabelecimento da infecção (CARNEIRO et al., 2020). Interessante que tal evento ocorre logo no início da infecção, quando os neutrófilos e monócitos são as células mais abundantes no sítio infeccioso. É plausível que estas duas células interajam e que as NETs possam ter algum papel na infecção *in vivo*. Nós não fenotipamos os monócitos infectados tratados com NETs,

mas pretendemos avaliar se as NETs e a elastase podem aumentar a expressão de PDL2 e arginase nos monócitos. De fato, a resposta imune protetora durante a infecção por *Leishmania* requer a participação de IFN-gama e produção de óxido nítrico. Ao passo que uma resposta Th2, com produção de IL-4, torna o indivíduo mais suscetível à infecção por inativar os mecanismos microbicidas dos macrófagos, induzindo a expressão de arginase nestas células (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018). O mecanismo envolvido no aumento da sobrevivência dos parasitos induzido pelas NETs pode ser via um desbalanço na expressão da enzima produtora de óxido nítrico e a arginase.

A interação dos monócitos com as NETs envolve a endocitose das redes. Apesar de ser um dado preliminar, observamos que o tratamento com citocalasina D bloqueou completamente o aumento da sobrevivência do parasito, restaurando a capacidade dos monócitos em eliminar a infecção. Em alguns outros modelos, como na psoríase e lúpus, foram observados que as NETs endocitadas ativam TLR9 em endossomos iniciais levando a produção de IFN- (LANDE et al., 2007; 2011). Neste caso, a endocitose das NETs depende da estrutura das redes e é também dependente da associação com a LL-37, uma das proteínas que compõem as NETs (LANDE et al., 2007; 2011). Outro grupo já demonstrou que os monócitos fagocitam as redes (HARITHA et al., 2019). De forma interessante, este grupo observou que as NETs induzem os monócitos a produzirem ETs (HARITHA et al., 2019). Estes aspectos da interação das redes com os monócitos humanos não foram investigados ainda por nosso grupo. Porém, pretendemos avaliar se o efeito observado nos monócitos se deve à ativação de TLR9 em experimentos futuros.

A produção de ROS pode estar associada à diminuição da sobrevivência dos parasitos, como foi observado no trabalho de Novais e colaboradores (2014). A produção de ROS induzida por amastigotas é capaz de controlar a infecção por *L. brasiliensis* (NOVAIS et al., 2014). Tendo em vista que a presença de elastase nas culturas de monócitos infectados aumentaram a sobrevivência da *L. major*, queríamos avaliar se a elastase era capaz de alterar a produção de ROS. Entretanto, não houve diferença na liberação de ROS entre os grupos, sugerindo que a elastase não induz a sobrevivência do parasito via inibição da produção de ROS. Os autores também demonstram que a produção de ROS pode ser diferenciada dependendo da subpopulação de monócitos estudados. Em seu estudo, esse grupo observou que os monócitos clássicos apresentaram uma produção de ROS superior ao dos

monócitos intermediários e não clássicos. Além disso, os monócitos clássicos foram capazes de controlar o número de parasitos dependente de ROS, diferentemente dos monócitos não clássicos e intermediários, no qual a inibição do ROS não alterou significativamente o número de células infectadas (NOVAIS et al., 2014). Nosso trabalho analisou os efeitos das NETs na população total de monócitos de sangue periférico de doadores saudáveis e levou em consideração as diferentes subpopulações. Este é um aspecto interessante e importante a ser considerado em futuros estudos por nosso grupo.

7. CONCLUSÃO

- As redes extracelulares de neutrófilos aumentam a sobrevivência do parasito *L. major* em monócitos humanos.
- O bloqueio da endocitose das NETs inibe o efeito exacerbador das redes.
- A elastase neutrofílica aumenta a sobrevivência de *L. major* em monócitos.
- A elastase neutrofílica não afetou a sobrevivência de *L. amazonensis* em monócitos.
- A elastase não alterou a produção de ROS pelos monócitos infectados por *L. major*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADKISON AM, RAPTIS SZ, KELLEY DG, PHAM CT (2002). Dipeptidyl peptidase activates neutrophil-derived serine proteases and regulates the development of acute experimental arthritis. *J Clin Invest* 109:363-371

APRIKYAN, A. A., & DALE, D. C (2001). Mutations in the neutrophil elastase gene in cyclic and congenital neutropenia. *Current Opinion in Immunology*, *Current Opinion in Immunology*, 13(5), 535–538.

AUFFRAY C, SIEWEKE MH, GEISSMANN F (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*.

AUFFRAY C., FOGG, D., GARFA M., ELAIN, G., JOIN-LAMBERT, O., KAYAL, S., GEISSMANN, F. (2007). Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science*, 317(5838), 666–670.

BARTNECK M, KEUL HA, GABRIELE ZK & GROLL J (2010). Phagocytosis independent extracellular nanoparticle clearance by human immune. *Nano Letters*, 10(1), 59- 64.

BATES PA (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.*, 37(10):1097-106.

BEITER K, WARTHA F, ALBIGER B, NORMARK S, ZYCHLINSKY A & HENRIQUES NORMARK B (2006). An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol.*, 16:401-7.

BENNETT CL, MISSLITZ A, COLLEDGE L, AEBISCHER T, CLARE BC (2001). Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *leishmania mexicana* amastigotes. *Eur J Immunol.*, 31:876–83.

BELAAOUAJ A, KIM KS, SHAPIRO SD (2000). Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science*. 289(5482):1185-8.

BRAIAN C, HOGEA V & STENDAHL O (2013). *Mycobacterium tuberculosis* induced neutrophil extracellular traps activate human macrophages. *J Innate Immun.*, 5(6):591-602.

BRANZK N, LUBOJEMSKA A, HARDISON SE, WANG Q, GUTIERREZ M, BROWN GD, PAPAYANNOPOULOS V (2014). Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol.*,15(11):1017-25.

BRINKMANN V, REICHARD U, GOOSMANN C, FAULER B, UHLEMANN Y, WEISS DS, WEINRAUCH Y & ZYCHLINSKY A (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303:1532-5.

CARNEIRO MB, LOPES ME, HOHMAN LS, ROMANO A, DAVID BA, KRATOFIL R, KUBES P, WORKENTINE ML, CAMPOS AC, VIEIRA LQ, PETERS NC (2020). Th1- Th2 Cross-Regulation Controls Early Leishmania Infection in the Skin by Modulating the Size of the Permissive Monocytic Host Cell Reservoir. *Cell Host & Microbe*.

CARNEIRO, P. P., CONCEIÇÃO, J., MACEDO, M., MAGALHÃES, V., CARVALHO, E. M., & BACELLAR, O. (2016). The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *PLOS ONE*, 11(2), e0148084.

CHAGAS AC, OLIVEIRA F, DEBRABANT A, VALENZUELA J, RIBEIRO JMC & CALVO E (2014). Lundep, a Sand Fly Salivary Endonuclease Increases *Leishmania* Parasite Survival in Neutrophils and Inhibits XIIa Contact Activation in Human Plasma. *PLoS Pathog.* 10(2): e1003923.

DIAS BT, DIAS-TEIXEIRA KL, GODINHO JP, FARIA MS, CALEGARI-SILVA T, MUKHTAR MM, LOPES U, MOTTRAM JC, LIMA APCA (2019). Neutrophil elastase promotes *Leishmania donovani* infection via interferon- β . *FASEB J.* 33(10):10794-10807.

DE TREZ C, MAGEZ S, AKIRA S, RYFFEL B, CARLIER Y, MURAILLE E (2009). iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania* major infection phase of C57BL/6 resistant mice. *PLoS Pathog.* 5(6): e1000494.10.1371/journal.ppat.1000494

DOSTER, RS, ROGERS, LM, GADDY, JA, & ARONOFF, DM (2018). Macrophage Extracellular Traps: A Scoping Review. *J Innate Immun. Journal of innate immunity*, 10 (1), 3-13.

FAURSCHOU M & BORREGAARD N (2003). Neutrophil granules and vesicles in inflammation. *Microb Infec.*, 5:1317-1327.7.

FIGUEIREDO AB, SERAFIM TD, MARQUES-DA-SILVA EA, MEYER FERNANDES JR, AFONSO LC (2012). *Leishmania amazonensis* impairs DC function by inhibiting CD40 expression via A2B adenosine receptor activation. *Eur J Immunol.* 42(5):1203-15.

FIOCRUZ (2019) Fundação Oswaldo Cruz. Reforço para o enfrentamento das leishmanioses nas Américas. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/reforco-para-o-enfrentamento-das-leishmanioses-nas-americas>. Acesso em: 15/02/2019

FUCHS, TA et al (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, 176(2), 231-41.

GABRIEL C, MCMASTER WR, GIRARD D & DESCOTEAUX A (2010). *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *J Immunol.*, 185(7), 4319-27.

GARCIA-ROMO GS, CAIELLI S, VEGA B, CONNOLLY J, ALLANTAZ F, XU Z, PUNARO M, BAISCH J, GUIDUCCI C, COFFMAN RL, BARRAT FJ, BANCHEREAU J & PASCUAL V (2011). Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.*, 3(73), 73ra20.

GEISSMANN F, JUNG S, LITTMAN DR (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* Jul;19(1):71-82.

GINHOUX FLORENT & JUNG STEFFEN (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology* volume 14, pages392–404.

GUIMARÃES-COSTA AB, DE SOUZA TS, PALETTA-SILVA R, FREITAS MESQUITA AL, MEYER-FERNANDES JR, SARAIVA EM (2014). 3'-nucleotidase/nuclease activity allows *Leishmania* parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps. *Infect Immun*, 82(4): 1732–1740.

GUIMARÃES-COSTA AB, NASCIMENTO MT, FROMENT GS, SOARES RP, MORGADO FN, CONCEIÇÃO-SILVA F & SARAIVA EM (2009). *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 6748-53 (106).

GUIMARÃES-COSTA SB, ROCHAEL NC, OLIVEIRA F, ECHEVARRIA-LIMA J, SARAIVA EM (2017). Neutrophil Extracellular Traps Reprogram IL-4/GM-CSF-Induced Monocyte Differentiation to Anti-inflammatory Macrophages. *Front Immunol.* 8: 523.

HARITHA, V. H., SEENA, P., SHAJI, B. V., NITHIN, T. U., HAZEENA, V. N., & ANIE, Y. (2019). Monocyte clearance of apoptotic neutrophils is unhindered in the presence of NETosis, but proteins of NET trigger ETosis in monocytes. *Immunology Letters*, 207:36- 45.

HURREL BP, SCHUSTER S, GRÜN E, COUTAZ M, WILLIAMS RA, HELD W, et al. (2015) Rapid Sequestration of *Leishmania mexicana* by Neutrophils Contributes to the Development of Chronic Lesion. *PLoS Pathog* 11(5): e1004929

HURRELL, B. P., REGLI, I. B., & TACCHINI-COTTIER, F. (2016). Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions. *Trends in parasitology*, 32(5), 392–401.

ILGOUTZ SC & MCCONVILLE MJ (2001). Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Inter. J. Parasitol.*, 31:899-908.

JAKUBZICK CV, RANDOLPH GJ, HENSON PM (2017). Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature Reviews Immunology*. 349–362.

KAYE, P., SCOTT, P (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* 9, 604–615.

KIMBLIN N, PETERS N, DEBRABANT A, SECUNDINO N, EGEN J, LAWYER P, FAY MP, KAMHAWI S, SACKS D (2008). Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(29):10125-30.

KOH, C. C., WARDINI, A. B., VIEIRA, M., PASSOS, L., MARTINELLI, P. M., NEVES, E., ANTONELLI, L., BARBOSA, D. F., VELIKKAKAM, T., GUTSEIT, E., MENEZES, G. B., GIUNCHETTI, R. C., MACHADO, P., CARVALHO, E. M., GOLLOB, K. J., & DUTRA, W. O. (2020). Human CD8+ T Cells Release Extracellular Traps Co-Localized With Cytotoxic Vesicles That Are Associated With Lesion Progression and Severity in Human Leishmaniasis. *Frontiers in immunology*, 11, 594581.

KORKMAZ B, HORWITZ MS, JENNE DE, GAUTHIER F (2010). Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol Rev.*;62(4):726-759.

KOLACZKOWSKA, E & KUBES, P (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology* V13, pages 159–175.

KOLACZKOWSKA E, JENNE CN, SUREWAARD BGJ, THANABALASURIAS A, LEE WY, SANZ MJ, MOWEN K, OPDENAKKER G & KUBES P (2015). Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nature Communications*. 6673.

LAINSON R & SHAW JJ (1987). Evolution, classification, and geographical distribution. *Leishmaniasis in Biology and Medicine*, eds Peters W, Killick-Kendrick R (Academic, London), Vol 2, pp 1–120.

LANDE R, GREGORIO J, FACCHINETTI V, CHATTERJEE B, WANG YH, HOMEY B, CAO W, WANG YH, SU B, NESTLE FO, ZAL T, MELLMAN I, SCHRÖDER JM, LIU YJ & GILLIET M (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nat.*, 449(7162), 564-9.

LAM GY, HUANG J, BRUMELL JH (2010). The many roles of NOX2 NADPH oxidase- derived ROS in immunity. *Semin Immunopathol.* 32:415-30.

LASKAY T, ZANDBERGEN GV & SOLBACH W (2003). Neutrophil granulocytes Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.*, 11: 210.

LAZZARETTO B, FADEEL B (2019). Intra- and Extracellular Degradation of Neutrophil Extracellular Traps by Macrophages and Dendritic Cells. *J Immunol.*, 203(8): 2276–2290.

LEY K, LAUDANNA C, CYBULSKY MI & NOURSHARGH S (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.*, 7(9):678- 89.

LEON B, LOPEZ-BRAVO M, ARDAVIN C (2007) Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 26: 519–531.

LIN AM, RUBIN CJ, KHANDPUR R, WANG JY, RIBLETT M, YALAVARTHI S, VILLANUEVA EC, SHAH P, KAPLAN MJ & BRUCE AT (2011). Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol.* 187(1), 490-500.

LINHARES-LACERDA L, TEMEROZO JR, RIBEIRO-ALVES M, AZEVEDO EP, MOJOLI A, NASCIMENTO MTC, SILVA-OLIVEIRA G, SAVINO W, FOGUEL D, BOU-HABIB DC, SARAIVA EM (2020). Neutrophil extracellular trap-enriched supernatants carry microRNAs able to modulate TNF- α production by macrophages. *Sci Rep.* 10(1):2715.

LOEMS ZIEGLER-HEITBROCK, PETRONELA ANCUTA, SUZANNE CROWE, MARC DALOD, VERONIKA GRAU, DEREK N. HART, PIETER J. M. LEENEN, YONG JUN LIU, GORDON MACPHERSON, GWENDALYN J. RANDOLPH, JUERGEN SCHERBERICH, JUERGEN SCHMITZ, KEN SHORTMAN, SILVANO SOZZANI, HERBERT STROBL, MAREK ZEMBALA, JONATHAN M. AUSTYN, MANFRED B. LUTZ (2010); Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*; 116 (16): e74–e80.

MCDERMOTT DH & MURPHY PM (2000). Chemokines and their receptors in infectious disease. *Springer Semin Immunopathol.*, 22 (4):393-415.

MÖLLERHERM, H., VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M., & BRANITZKI-HEINEMANN, K. (2016). Antimicrobial Activity of Mast Cells: Role and Relevance of Extracellular DNA Traps. *Frontiers in immunology*, 7, 265.

MOSSER, D., EDWARDS, J (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958–969.

MORAES TJ, CHOW CW, DOWNEY GP (2003). Proteases and lung injury. *Crit Care Med* 31:S189–S194.

MORGADO FN, NASCIMENTO MT, SARAIVA EM, DE OLIVEIRA-RIBEIRO C, MADEIRA MDE F, DA COSTA-SANTOS M, et al (2015). Are neutrophil extracellular traps playing a role in the parasite control in active American tegumentary leishmaniasis lesions. *PLoS One* 10(7):e0133063.

NAUSEEF, W & BORREGAARD, N (2014). Neutrophils at work. *Nature Immunology* volume 15, pages602–611

NOVAIS FO, CARVALHO LP, GRAFF JW, et al (2013). Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLoS Pathog.*

NOVAIS FO, NGUYEN BT, BEITING DP, et al (2014). Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. *J Infect Dis.*

OPAS/OMS (2019) Organização Pan-Americana da Saúde/Organização mundial da saúde. Manual de Procedimentos para Vigilância e Controle das Leishmanioses nas Américas. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/reforco-para-o-enfrentamento-das-leishmanioses-nas-americas>. Acesso em: 15/02/2019

PAPAYANNOPOULOS V, METZLER KD, HAKKIM A & ZYCHLINSKY A (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.*,191,677–691.

PAPAYANNOPOULOS V (2018). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 18(2):134-147.

PASSOS S, CARVALHO LP, COSTA RS, CAMPOS TM, NOVAIS FO, MAGALHÃES A, MACHADO PR, BEITING D, MOSSER D, CARVALHO EM SCOTT P (2015). Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in *Leishmania braziliensis* infections. *J Infect Dis.* 211(2):274-82.

PETERS NC, EGEN JG, SECUNDINO N, DEBRABANT A, KIMBLIN N, KAMHAWI S, LAWYER P, FAY MP, GERMAIN RN & SACKS D (2008). In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.*, 321: 970-4.

PETRITUS PM, MANZONI-DE-ALMEIDA D, GIMBLET C, GONZALEZ LOMBANA C & SCOTT P (2012). *Leishmania mexicana* induces limited recruitment and activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells early during infection. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(10): e1858.

PHAM CT (2008). Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1317–1333.

PILSCZEK FH, SALINA D, POON KK, FAHEY C, YIPP BG, SIBLEY CD, ROBBINS SM, GREEN FH, SURETTE MG, SUGAI M, BOWDEN MG, HUSSAIN M, ZHANG K & KUBES P (2010). A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.*, 185(12), 7413–7425.

PUGA IRENE et al (2011). B-helper neutrophils stimulate immunoglobulin diversification and production in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol.*, 13(2): 170– 180.

RADA B & LETO TL (2008). Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contrib Microbiol.*15:164-187.

RIBEIRO CV, ROCHA BFB, OLIVEIRA E, et al (2020). *Leishmania infantum* induces high phagocytic capacity and intracellular nitric oxide production by human proinflammatory monocyte. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2020;115:e190408. Published 2020 Apr 17.

RIBEIRO-GOMES FL, PETERS NC, DEBRABANT A & SACKS DL (2012). Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti Leishmania response. *PLoS Pathog.*, 8(2):e1002536.

RIBEIRO-GOMES FL, MONIZ-DE-SOUZA MC, ALEXANDRE-MOREIRA MS, DIAS WB, LOPES MF, NUNES MP, LUNGARELLA G, Dos REIS GA (2007). Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *J Immunol.*;179(6):3988-94.

ROCHAEL NC, GUIMARÃES-COSTA AB, NASCIMENTO MTC, DE SOUZA VIEIRA TS, OLIVEIRA MP, SOUZA LFG, OIVEIRA MF & SARAIVA EM (2015). Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by *Leishmania* parasites. *Sci Rep.* 5: 18302.

ROMANO, A., CARNEIRO, M. B. H., DORIA, N. A., ROMA, E. H., RIBEIRO GOMES, F. L., INBAR, E., PETERS, N. C. (2017). Divergent roles for Ly6C+CCR2+CX3CR1+ inflammatory monocytes during primary or secondary infection of the skin with the intra-phagosomal pathogen *Leishmania major*. *PLOS Pathogens*, 13(6), e1006479.

ROSS R (1903). Further Notes on *Leishmania*'s bodies. *Brit Med J.*, 11:1401.

SADIK CD, KIM ND & LUSTER A (2011). Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* 32(10): 452–460.

SAFFARZADEH M, JUENEMANN C, QUEISSER MA, LOCHNIT G, BARRETO G, GALUSKA SP, LOHMEYER J, PREISSNER KT (2012). Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One.* 7(2): e32366.

SANTOS D, CAMPOS TM, SALDANHA M, OLIVEIRA SC, NASCIMENTO M, ZAMBONI DS, MACHADO PR, ARRUDA S, SCOTT P, CARVALHO EM, CARVALHO LP (2018). IL-1 β Production by Intermediate Monocytes Is Associated with Immunopathology in Cutaneous Leishmaniasis. *J Invest Dermatol.* 138(5):1107-1115.

SCHORN, C., JANKO, C., LATZKO, M., CHAURIO, R., SCHETT, G., & HERRMANN, M. (2012). Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Frontiers in immunology*, 3, 277.

SEGAL A. W (2005). How Neutrophils Kill Microbes. *Annual Review of Immunology*, 23(1), 197–223, 2005.

SOEHNLEIN O (2009). Direct and alternative antimicrobial mechanisms of neutrophil derived granule proteins. *J Mol Med (Berl)*. 87(12):1157-64.

SOEHNLEIN O, ZERNECKE A & WEBER C (2009). Neutrophils launch monocyte extravasation by release of granule proteins. *Thrombosis and Haemostasis*, 102 (02), 198-205.

STRAUSS-AYALI D, CONRAD SM & MOSSER D (2007). Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *JLB*, v82(2), 244-252.

SU LIAN-JIU, ZHANG JIA-HAO, GOMEZ HERNANDO, MURUGAN RAGHAVAN, HONG XING, XU DONGXUE, JIANG FAN, PENG ZHI-YONG (2019). Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev*. Oct 13; 2019:5080843.

TIBÚRCIO R, NUNES S, NUNES I, AMPUERO MR, SILVA IB, LIMA R, TAVARES NM & BRODSKY C (2019). Molecular Aspects of Dendritic Cell Activation in Leishmaniasis: An Immunobiological View. *Front Immunol.*; 10: 227.

TILLACK K, BREIDEN P, MARTIN R & SOSPEDRA M (2012). T Lymphocyte Priming by Neutrophil Extracellular Traps Links Innate and Adaptive Immune Responses. *J Immunol*, 188 (7) 3150-3159.

TITUS RG & RIBEIRO JMC (1988). Salivary gland lysates from the sand fly *L. longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science*, 239: 1306.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F., BORTOLETI, B. T. DA S., ASSOLINI, J. P., GONÇALVES, M. D., CARLOTO, A. C. M., MIRANDA-SAPLA, M. M, PAVANELLI, W. R. (2018). Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons *Frontiers in Immunology*, 9:2529.

URBAN CF, ERMERT D, SCHMID M, ABU-ABED U, GOOSMANN C, NACKEN W, et al (2009). Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 5(10): e1000639.

VILLANUEVA E, YALAVARTHI S, BERTHIER CC, HODGIN JB, KHANDPUR R, LIN AM, RUBIN CJ, ZHAO W, OLSEN SH, KLINKER M, SHEALY D, DENNY MF, PLUMAS J, CHAPEROT L, KRETZLER M, BRUCE AT, KAPLAN MJ (2011). Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*.

VALENZUELA JG, GARFIELD M, ROWTON ED & PHAM VM (2004). Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. *J Exp Biol.*, 207(21):3717.

WANG Y, LI M, STADLER S, CORRELL S, LI P, WANG D, HAYAMA R, LEONELLI L, HAN H, GRIGORYEV SA, ALLIS CD & COONROD SA (2009). Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol.*, 184:205–213.

WEBSTER SJ, DAIGNEAULT M, BEWLEY MA, PRESTON JA, MARRIOTT HM, WALMSLEY SR, READ RC, WHYTE MK & DOCKRELL DH (2010). Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease. *J Immunol.*, 185(5), 2968-2979.

WEINRAUCH Y, DRUJAN D, SHAPIRO SD, WEISS J, ZYCHLINSKY A. (2002) Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature.* 417(6884):91-4.

WONG KL, TAI JJ, WONG WC, HAN H, SEM X, YEAP WH, KOURILSKY P, WONG SC (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood Aug 4;118(5): e16-31.*

WILLIAMS M, AZCUTIA V, NEWTON G, ALCAIDE P & LUSCINSKA FW (2011). Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends Immunol.* 32(10): 461–469.

WIKTOR-JEDRZEJCZAK W, GORDON S. (1996) Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse. *Physiol Rev.* 76(4):927-47.

YIZENGAE E, GETAHUN M, TAJEBE F, CRUZ CERVERA E, ADEM E, MESFIN G, HAILU A, VAN DER AUWERA G, YARDLEY V, LEMMA M, et al (2016). Visceral leishmaniasis patients display altered composition and maturity of neutrophils as well as impaired neutrophil effector functions. *Front Immunol.* 7:517.

YOUSEFI S, GOLD JA, ANDINA N, LEE JJ, KELLY AM, KOZLOWSKI E, SCHMID I, STRAUMANN A, REICHENBACH J, GLEICH GJ & SIMON HU (2008). Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med.*, 14(9):949-53.

ZERNECKE A, WEBER C & SOEHNLEIN O (2009). Neutrófilos lançam extravasamento de monócitos pela liberação de proteínas granulares. *Thrombosis and Haemostasis*, 102 (08), 198-205.

ZIEGLER-HEITBROCK L, ANCUTA P, CROWE S, DALOD M, GRAU V, HART DN, LEENEN PJ, LIU YJ, MACPHERSON G, RANDOLPH GJ, SCHERBERICH J, SCHMITZ J, SHORTMAN K, SOZZANI S, STROBL H, ZEMBALA M, AUSTYN JM, LUTZ MB (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. Oct 21;116(16): e74-80.