

CAROLINA CATTONI KOH

**REDES EXTRACELULARES DE DNA DE LINFÓCITOS T:
SUA POSSÍVEL IMPORTÂNCIA NAS INTERAÇÕES
PARASITO-HOSPEDEIRO E NA PATOGÊNESE DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Março/2020

CAROLINA CATTONI KOH

**REDES EXTRACELULARES DE DNA DE LINFÓCITOS T:
SUA POSSÍVEL IMPORTÂNCIA NAS INTERAÇÕES PARASITO-HOSPEDEIRO E NA
PATOGENESE DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Biologia Celular

Orientador(a): Dra. Walderez Ornelas Dutra

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Março/2020

043 Koh, Carolina Cattoni.
Redes extracelulares de DNA de linfócitos t: sua possível importância nas interações parasito-hospedeiro e na patogênese da Leishmaniose Tegumentar Americana [manuscrito] / Carolina Cattoni Koh. - 2020.
94 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador(a) Dra: Walderez Ornelas Dutra.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Linfócitos T CD8-Positivos. 3. Morte Celular. 4. Leishmaniose Cutânea. I. Dutra, Walderez Ornelas. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE

CAROLINA CATTONI KOH

211/2019
entrada
2º/2015
2015710048

Às treze horas do dia 23 de julho de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "REDES EXTRACELULARES DE DNA DE LINFÓCITOS T: SUA POSSÍVEL IMPORTÂNCIA NAS INTERAÇÕES PARASITO-HOSPEDEIRO E NA PATOGÊNESE DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA", requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Walderez Ornelas Dutra**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Walderez Ornelas Dutra	UFMG	Aprovada
Dra. Luciana Andrade	UFMG	Aprovada
Dra. Jane Lima dos Santos	UESC	Aprovada
Dra. Andrea Teixeira de Carvalho	CPqRR	Aprovada
Dr. Thiago Castro Gomes	UFMG	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 23 de julho de 2019.**

Dr.^a Walderez Ornelas Dutra (Orientadora) [Assinatura]

Dr.^a Luciana Andrade [Assinatura]

Dr.^a Jane Lima dos Santos [Assinatura]

Dr.^a Andrea Teixeira de Carvalho [Assinatura]

Dr. Thiago Castro Gomes [Assinatura]

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Erika Cristina Jorge
Coordenadora do Programa de Pós Graduação
em Biologia Celular ICB/UFMG

[Assinatura]

Agradecimentos

Aos meus pais, Carlos e Lúcia e às minhas irmãs, Lorena e Fernanda, pelo apoio incondicional, por acreditarem sempre em mim e me mostrarem que com amor sempre vale a pena seguir em frente.

Aos amigos que me apoiaram nessa jornada, me ajudaram e trouxeram leveza.

À Eula, por toda ajuda, companhia, pelas conversas, risadas, disponibilidade e amizade.

Ao centro de aquisição e processamento de imagens – ICB/UFMG, e ao centro de microscopia da UFMG.

Aos demais amigos do LBIC pelos ótimos momentos, muitas risadas e apoio.

À pós-graduação em Biologia Celular do ICB/UFMG pela oportunidade e excelência no curso.

À Wal, por toda confiança, pelas conversas e ensinamentos, pelo carinho, por todas as orientações e conselhos e por me fazer crescer como pessoa e como cientista. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos difíceis.

LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA TESE

Laboratório de Biologia das Interações Celulares – LABIC – ICB - UFMG
CAPI – Centro de aquisição e processamento de imagens – ICB – UFMG
Centro de microscopia eletrônica da UFMG

ORIENTAÇÃO

Orientadora: Dr^a Walderez Ornelas Dutra

COLABORADORES

Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais.

Laboratório de Biologia das Interações Celulares:

- Dra. Daniela Faria (ex-membro do laboratório)
- Dra. Amanda Wardini (ex-membro do laboratório)
- Millene Vieira (ex-membro do laboratório)
- Eula Graciele Amorim Neves
- Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti

Laboratório Professora Conceição Machado:

- Dra. Patrícia Massara Martinelli

Laboratório de Imunobiofotônica:

- Dr. Gustavo Batista de Menezes

Laboratório de Patologia das Leishmanioses:

- Dr. Ricardo Gonçalves

Instituto Internacional de Pesquisa em Câncer, Hospital AC Camargo, São Paulo, São Paulo

- Dr. Kenneth J. Gollob

Serviço de Imunologia Hospital Universitário Prof. Edgar Santos (HUPES), Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA:

- Dr. Edgar Carvalho
- Dr. Paulo Roberto Lima Machado
- Dr. Luiz Henrique Guimarães

Centro de Pesquisas René Rachou – CPqRR:

- Dra. Lis Ribeiro do Vale Antonelli

Brigham and Women's Hospital (Aikawa-Aikawa Laboratories - Harvard Medical School)

- Lívia Silva Araújo Passos

Todos os procedimentos adotados durante a realização deste estudo estão aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (ETIC 027/98 aprovado em 17/06/98).

AGÊNCIAS FINANCIADORAS

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior
CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais – INCT-DT

“Se no peito ecoa sua canção favorita. Apresse o passo. Siga seus instintos. Felicidade é para quem não teme vivê-la; doa a quem doer. A felicidade é para quem não teme um não. Para quem sabe arriscar. Para quem não desiste de um sorriso. Se a vida lhe chamou para dançar. Apresse o passo. Siga o ritmo da sua intuição.” Diego Vinicius

Resumo

A morte celular é fundamental para uma variedade de funções fisiológicas, incluindo a imunidade protetora ou patogênica. Os mecanismos de morte celular mais estudados são apoptose e necrose. A apoptose possui características bem distintas e claras, como a ativação da via das caspases e a formação de corpos apoptóticos. Já a necrose é caracterizada pela ruptura celular. A etose é um mecanismo de morte celular, descrito em 2004, caracterizado pela liberação de armadilhas extracelulares (ETs) compostas principalmente por DNA e histonas. As ETs são capazes de desencadear ou amplificar respostas inflamatórias e exercer diretamente atividade microbicida. Células da resposta imune inatas como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos podem liberar ETs, e tem sido sugerido que os linfócitos B e T também podem ser capazes de fazê-las. Aqui demonstramos, através do uso de várias técnicas, como microscopias confocal, eletrônica e de varredura, citometria de fluxo, dentre outras, que as células T CD4+ e CD8+ humanas são realmente capazes de liberar ETs. Além disso, ETs derivadas de células T CD4+ e CD8+, que denominamos LETs (*Lymphocyte-derived extracellular traps*), são morfológica e funcionalmente distintas. De particular interesse é o fato de que as LETs derivadas de CD8 conectam células distantes e colocalizam com CD107a, um marcador de vesículas contendo grânulos citotóxicos. Nossos resultados sugerem que essas estruturas podem emergir como uma nova estratégia de entrega de vesículas citotóxicas para células-alvo distantes, fornecendo novos insights sobre mecanismos de morte celular mediada por células CD8+. Além disso, nesse estudo, demonstramos que lesões de pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa também apresentam LETs, associadas às células CD8+, onde são encontradas vesículas CD107+. Estes dados mostram que células CD8+ liberam LETs *in vivo*. Esse achado traz novas perspectivas de pesquisas para compreender melhor o papel das LETs na patogênese da leishmaniose tegumentar americana.

Palavras chaves: Linfócitos T CD8+, Etose, Leishmaniose

Abstract

Cell death is critical to a variety of physiological functions, including protective or pathogenic immunity. The most studied mechanisms of cell death are apoptosis and necrosis. Apoptosis has well-defined and clear characteristics such as activation of the pathways of the caspases and the formation of apoptotic bodies. Necrosis is characterized by complete cell rupture. Etose is a mechanism of cell death, described in 2004, characterized by the release of extracellular traps (ETs), which are composed mainly of DNA and histones. ETs are able to trigger or amplify inflammatory responses and directly exert microbicidal activity. Cells of the innate immune response such as neutrophils, eosinophils and macrophages may release ETs, and it has been suggested that B and T lymphocytes may also be able to do so. Here we demonstrate, through the use of various techniques such as confocal, electron and scanning microscopies, flow cytometry, among others, that human CD4 + and CD8 + T cells are actually capable of releasing ETs. In addition, CD4 and CD8-derived ETs (which we have called LETs – “lymphocyte extracellular traps”) are morphologically and functionally distinct. Of particular interest are the facts that CD8-derived ETs connect distant cells, and co-localize with CD107a, a marker of vesicles containing cytotoxic granules. In addition, in this study, we have also demonstrated that lesions from patients with cutaneous and mucosal leishmaniasis also present ETs. These ETs are derived from CD8+ cells and co-localize with CD107+ vesicles, showing that CD8+ T cells release LETs *in vivo*. Our results suggest that LETs may emerge as a new strategy for the delivery of cytotoxic vesicles to distant target cells, providing new insights into mechanisms of CD8-mediated cell death and the pathogenesis of American tegumentary leishmaniasis.

Key words: T CD8 Lymphocytes, Etosis, Leishmaniasis

Lista de Figuras

Figura 1: Desenho esquemático dos componentes presentes nas redes extracelulares de DNA em neutrófilos	17
Figura 2: Representação esquemática da via da Netose	19
Figura 3: Desenho experimental	28
Figura 4: Estratégia de análise para avaliar a frequência das populações de CD14+, CD19+, CD4+ e CD8+ após a marcação com anticorpos anti-marcadores de sub-populações celulares e a aquisição por citometria de fluxo	38
Figura 5: Análise por citometria de fluxo da composição celular da cultura de enriquecida em linfócitos	39
Figura 6: Avaliação da porcentagem de morte celular por citometria de fluxo	40
Figura 7: Avaliação, em culturas enriquecidas em linfócitos, por microscopia confocal, da ocorrência de DNA extracelular	42
Figura 8: Quantificação da ocorrência de etose nas culturas enriquecidas em linfócitos	43
Figura 9 Avaliação de características bioquímicas no sobrenadante das culturas enriquecidas em linfócitos	44
Figura 10: Redes extracelulares coradas por DAPI e anti-histona	46
Figura 11: Redes extracelulares coradas por DAPI não apresentam actina	47
Figura 12 Avaliação por microscopia eletrônica de varredura da presença de redes extracelulares em culturas enriquecidas em linfócitos	50
Figura 13 Avaliação por microscopia eletrônica de transmissão da morfologia interna dos linfócitos	51
Figura 14: Redes extracelulares de linfócitos T CD4+ e CD8+ em microscopia confocal	51
Figura 15: Avaliação por MEV de linfócitos T CD4+ e CD8+	52
Figura 16: Avaliação da porcentagem de morte celular por citometria de fluxo de linfócitos T CD4+ e CD8+)	54
Figura 17: Avaliação da ativação celular e produção de TNF-alfa+	55
Figura 18 Avaliação por citometria de fluxo da frequência de células CD107+	56
Figura 19: Imunofluorescência de células CD8+, LETs e CD107	57
Figura 20: MET de cultura purificada de Linfócitos T CD8+ após 48h de estímulo	58
Figura 21: Avaliação da composição celular de lesões de pacientes por meio de análise histopatológica por coloração de hematoxilina/eosina	59
Figura 22: Avaliação da composição celular de lesões de pacientes com LTA	60
Figura 23 : Avaliação por microscopia confocal de ETs em lesões de pacientes da forma cutânea da LTA	61
Figura 24: Curva de crescimento da Leishmania amazonensis	64
Figura 25: Dosagem de DNA nos sobrenadantes das culturas expostas a Leishmania braziliensis e ao Trypanosoma cruzi	65

Sumário

1. Introdução:	14
1.1. Mecanismos de morte celular	14
1.2. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....	22
2. Objetivos	26
2.1. Objetivo geral	26
2.2. Objetivos específicos	26
3. Materiais e Métodos	27
3.1. Desenho experimental e população de estudo.	27
3.2. Separação, plaqueamento e cultura de CMSP (Células mononucleares do sangue periférico)......	29
3.3. Separação de Linfócitos T CD8+ e T CD4+ por citometria de fluxo (sorting): ---	29
3.4. Marcação com CFSE (ou CFDA-SE - carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester).....	30
3.5. Reações de imunofluorescência em cultura de linfócitos T aderidas às lamínulas.....	30
3.6. Microscopia eletrônica de varredura.....	32
3.7. Microscopia eletrônica de transmissão	32
3.8. Quantificação de DNA e tratamento com DNase I.....	33
3.9. LDH.....	33
3.10. Citometria de CMSP (células mononucleares do sangue periférico).....	34
3.11. Reações de imunofluorescência em lesões de pacientes com LTA.	35
3.12. Ação leishmanicida	36
3.13. Cocultura de linfócitos e parasitos	36
3.14. Análise estatística.....	37
4. Resultados	38
4.1. Redes extracelulares de DNA liberadas em culturas enriquecidas em linfócitos	38
4.2. Redes extracelulares de DNA liberadas por linfócitos T CD4+ e TCD8+	48
4.3. Redes extracelulares de DNA e Leishmaniose tegumentar americana (LTA)----	58
5. Discussão	66
6. Conclusões	83
7. Referências	84

As redes extracelulares de DNA (ETs) foram descritas em 2004 sugerindo um novo mecanismo de eliminação de microrganismos e de morte celular através da liberação do DNA em forma de rede para o meio extracelular. Esse evento celular foi descrito em células da resposta imune inata, como neutrófilos, mastócitos e monócitos. Esse trabalho demonstrou que linfócitos T, células da resposta imune adquirida, são capazes de liberar redes extracelulares de DNA (LETs) e, além disso, avaliamos a relação entre as LETs e a leishmaniose tegumentar americana.

1. Introdução:

1.1. Mecanismos de morte celular

Necrose, apoptose e etose são mecanismos de morte celular que têm sido extensivamente estudados em diversas situações fisiológicas e patológicas. A necrose é caracterizada por um aumento de volume do citoplasma, resultando na ruptura da membrana plasmática (MAJNO; LA GATTUTA; THOMPSON, 1960). Além disso, ocorre a desintegração das organelas e a liberação do conteúdo celular de forma desordenada. A necrose ocorre em decorrência de situações de *stress* extremo como, por exemplo, exposição ao calor, choque osmótico, congelamento/descongelamentos seguidos, e pode também ser induzida por TNF, IFN- γ , RNA de fita dupla (dsRNA), e depleção de ATP (KRYSKO et al., 2008; MORGAN; KIM; LIU, 2008).

A apoptose caracteriza-se por alterações morfológicas definidas que incluem a condensação da cromatina e sua marginalização para a membrana nuclear, fragmentação do núcleo e formação de corpos apoptóticos (WYLLIE, 1980). Além disso,

observa-se a exposição da fosfatidilserina na membrana externa da célula (FADOK et al., 2010), alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial (KROEMER; REED, 2000), e ativação da via das caspases (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998). A ocorrência da apoptose envolve o balanço entre fatores pró-apoptóticos e anti-apoptóticos e a participação de proteínas. Dentre elas, podemos destacar as proteases caspases 3 e 9, que são ativadas exclusivamente em células em apoptose (COHEN, 1997; MINKO; KOPEČKOVÁ; KOPEČEK, 2001). A ativação dessas proteases acarreta no aparecimento das alterações celulares características de células em apoptose e funcionam na forma de cascata (HENGARTNER, 2000; THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998). Esse evento de morte celular pode ter origem intrínseca (mitocondrial) ou extrínseca, que é quando o estímulo (BETTS; KOUP, 2004; MITTENDORF et al., 2005) e sinalização para que a célula entre em apoptose são provenientes de fatores externos, como perforinas/granzimas e citocinas (MARTÍNEZ-LOSTAO; ANEL; PARDO, 2015).

A etose, nome dado à produção de redes extracelulares, foi descrita como um mecanismo de morte celular diferente de apoptose e necrose. Inicialmente demonstrou-se que neutrófilos liberavam tais estruturas, daí o nome “neutrophil extracellular trap”: NET (BRINKMANN et al., 2004). Estes autores descreveram que essas células estimuladas com acetato de forbol miristato (PMA), interleucina 8 (IL-8), lipopolissacarídeos (LPS) ou por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas eram capazes de liberar material nuclear para o meio extracelular. Por microscopia eletrônica de varredura, foi evidenciado que as redes eram formadas por fios finos de 15-17nm de diâmetro e por domínios globulares de cerca de 25nm e que se agregavam em segmentos maiores de até 50nm. Através da microscopia eletrônica de transmissão, foi

constatado que não havia a presença de membrana celular nessas redes. Utilizando-se a técnica de imunofluorescência, foi descrita a presença de algumas proteínas que compunham a rede como as histonas H1, H2A, H2B, H3 e H4 de localização nuclear, enquanto outras proteínas como α -tubulina e f-actina não faziam parte da rede.

Comprovou-se que o DNA é o principal componente das redes extracelulares através da marcação positiva pelo DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride*) e pelo fato de que o uso de DNase resultou na ausência da formação e/ou destruição das redes em neutrófilos (BRINKMANN et al., 2004). Sendo assim, essas redes são estruturas complexas formadas por cromatina descondensada sendo o DNA o componente mais abundante seguido das histonas (figura 1). Proteínas citoplasmáticas, granulares e de citoesqueleto, enzimas glicolíticas e de peroxissomas também estão presentes na composição dessa estrutura conforme demonstrado por experimentos de proteômica (figura 1) (URBAN et al., 2009). Na etose, não ocorre a fragmentação do DNA, nem a exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana celular e não ocorre ativação das caspases (FUCHS et al., 2007a), como ocorre na apoptose (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998).

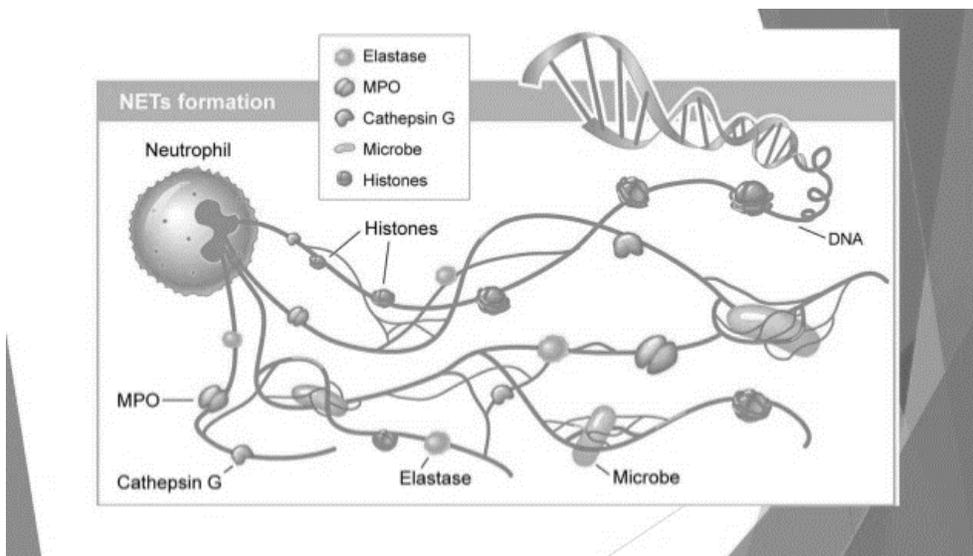


Figura 1: Desenho esquemático dos componentes presentes nas redes extracelulares de DNA em neutrófilos (MIYATA; FAN, 2012)

Um fato interessante é que as redes participam da eliminação de microrganismos e controle de infecções, de tal forma que são capazes de conter fisicamente e eliminar patógenos (BARTNECK et al., 2010; URBAN et al., 2009). Alguns microrganismos apresentam mecanismos de defesa contra as NETs, como a presença de uma cápsula de carga elétrica semelhante à do DNA, impedindo assim a sua fixação à rede (WARTHA et al., 2007). Além disso, algumas bactérias como *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae* (BUCHANAN et al., 2006), e *Staphylococcus aureus* (BERENDS et al., 2010) codificam, em sua superfície, endonucleases capazes de clivar as redes de DNA (WARTHA et al., 2007).

A atividade microbicida ou microbiostática das ETs ocorre também em função de algumas proteínas que constituem a rede como enzimas (proteases, lisozima), peptídeos

antimicrobianos, íons quelantes (calgranulina), e histonas. A concentração aumentada de alguns componentes na rede e/ou a combinação destes fornece à rede sua característica microbicida. Entretanto, alguns componentes são capazes de atuar sozinhos, como a catepsina G e proteinase 3, que estão intimamente relacionados com NETs e podem clivar fatores de virulência de patógenos (AVERHOFF et al., 2008). De forma similar, foi descrito por Parker e colaboradores, em 2012, a importância das mieloperoxidases (MPO) na eliminação de *S. aureus*. Ainda nesse contexto, através da utilização de anticorpos neutralizantes contra histonas, verificou-se que a ação microbicida das NETs era reduzida, o que demonstra a importância dessas proteínas na morte de microrganismos (GUIMARAES-COSTA et al., 2009). A ação antifúngica das redes já foi descrita, uma vez que a calgranulina é capaz de quelar o zinco, um cátion indispensável para o crescimento dos fungos (BIANCHI et al., 2011; URBAN et al., 2009).

Muito já se tem descrito sobre como as redes extracelulares (ETs) são formadas. No entanto, muitos aspectos ainda permanecem obscuros. O evento de liberação da rede extracelular (também conhecido como Netose) se dá, geralmente, com a célula sendo estimulada, seguida da desorganização nuclear e descondensação da cromatina. Dessa forma, as características morfológicas normais do núcleo desaparecem e a membrana nuclear expande-se, fragmentando-se em vesículas. Ao mesmo tempo, a ruptura das membranas facilita a mistura do conteúdo citoplasmático granular com a cromatina.

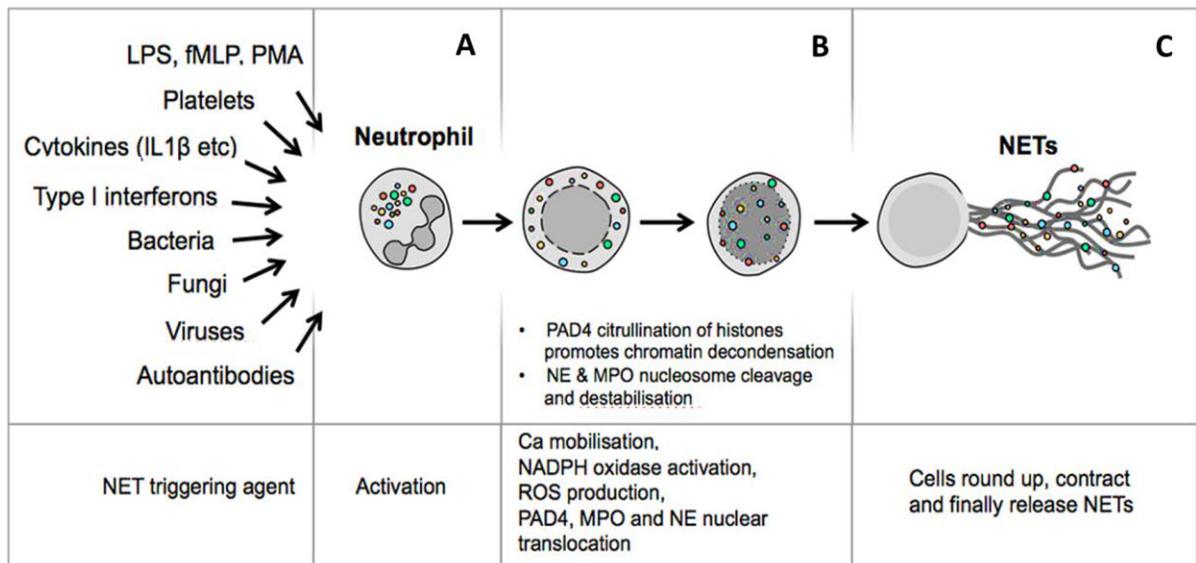


Figura 2: Representação esquemática da via da Netose. (A) Após a estimulação dos receptores, os neutrófilos aderem ao substrato (B) e mobilizam grânulos contendo proteínas como, por exemplo, mieloperoxidase. A membrana nuclear é desestabilizada e o conteúdo nuclear se mistura com o citoplasmático, a membrana celular é rompida (C). O conteúdo celular é extravasado em forma de rede (MASUDA *et al.*, 2016)

Finalmente, ocorre a permeabilização da membrana da célula e o DNA misturado com o conteúdo citoplasmático é liberado no meio extracelular (FUCHS *et al.*, 2007b). Este processo está resumidamente apresentado na figura 2.

A via de sinalização celular Raf-MEK-ERK está envolvida no processo da Netose, através da ativação da proteína cinase C (PKC). Sabe-se que substâncias análogas ao Diacilglicerol (DAG), como PMA, são capazes de ativar essa via. Um fator crítico na formação das redes, mas não exclusivo, é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que, em neutrófilos, são produzidas pela NADPH oxidase. As espécies reativas de oxigênio inativam as caspases e, com isso, ocorre o bloqueio da via de morte por apoptose (FADEEL; ORRENIUS, 2005; METZLER et al., 2011). Neutrófilos de pacientes que sofrem de doença granulomatosa crônica, que possuem NADPH oxidase defeituosa, são incapazes de formar ETs (BIANCHI et al., 2009; FUCHS et al., 2007b). Além disso, a citrulinização (substituição da arginina por citrulina) da histona é um processo fundamental na produção das redes extracelulares de DNA de neutrófilos, uma vez que está associada à descondensação da cromatina (NEELI et al., 2008; WANG et al., 2009). A enzima nuclear peptilarginina deaminase 4 (PAD4), é uma das enzimas responsáveis por catalisar a citrulinização da histona, sendo dependente dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} . Também tem sido relatado que os microrganismos, como *Staphylococcus aureus* e *Leishmania donovani* (GABRIEL et al., 2010) são capazes de induzir a liberação das redes por um processo molecular que é independente de ROS. Isso demonstra o quão complexa é a regulação da liberação das redes extracelulares (etose) e o quanto esse evento, ao nível molecular, ainda é um enigma, principalmente em outras células que fazem etose.

O papel dos mecanismos de morte celular em eventos patológicos tem sido alvo de diversos estudos, sobretudo naqueles quadros que envolvem doenças inflamatórias

e/ou infecciosas. Sabe-se que a necrose está associada ao desenvolvimento e amplificação de reação inflamatória local, por causa da liberação de conteúdo intracelular (BOLÍVAR; VOGEL; BOUCHIER-HAYES, 2019). Já a apoptose tem sido associada a diversas alterações fisiológicas como na eliminação de populações celulares específicas, por exemplo, no desenvolvimento embrionário (FADEEL; ORRENIUS, 2005), ou em processos patológicos interferindo na homeostase celular e na patogênese de várias doenças (YOKOYAMA; THOMPSON; EHRHARDT, 2012), incluindo doenças parasitárias (BIENVENU; GONZALEZ-REY; PICOT, 2010). Já o papel da etose permanece ainda bastante obscuro, uma vez que ela foi apenas recentemente descrita. Embora as NETs desempenhem uma função microbicida e possam controlar infecções, a persistência dessas estruturas no organismo podem levar a danos teciduais como ocorre na sepse e na vasculite dos pequenos vasos sem contribuir para o controle ou resolução da infecção (CLARK et al., 2007). No modelo murino de pneumonia pelo vírus da Influenza, as NETs contribuíram para a injúria pulmonar aumentando o dano microvascular do órgão (NARASARAJU et al., 2011).

Ao contrário da necrose e apoptose que podem ocorrer em todos os tipos de células, até o momento, o fenômeno de etose foi descrito em neutrófilos (BRINKMANN et al., 2004), mastócitos (KO et al., 2008), eosinófilos (MUNIZ et al., 2018; YOUSEFI et al., 2008) e monócitos/ macrófagos (CHOW et al., 2010). Recentemente, sugeriu-se que linfócitos também podem liberar essas estruturas, embora os experimentos não tenham sido definitivos (ROCHA ARRIETA et al., 2017).

A etose é um evento que não está restrito às células humanas. Já foi descrito em outros animais como camundongos (MARTINOD et al., 2017), peixes (BROGDEN et al.,

2014), gatos (ABI ABDALLAH; DENKERS, 2012), galinhas (CHUAMMITRI et al., 2009) e invertebrados como insetos (ALTINCICEK et al., 2014).

A capacidade de produzir redes extracelulares compostas por DNA e histona também já foi descrita em plantas, onde parecem desempenhar um papel importante na defesa contra infecções fúngicas na ponta da raiz estabelecendo uma resposta microbicida. Experimentos utilizando DNase I em raízes inoculadas com esporos de *Necteria haematococca* demonstrou a evolução da necrose na raiz, uma vez que a planta não é capaz de controlar o crescimento fúngico (WEN et al., 2009).

Já é conhecida a participação das redes extracelulares em diversos contextos de doenças causadas por agentes infecciosos como bactérias (BRINKMANN et al., 2004; VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE et al., 2009), fungos (MCCORMICK et al., 2010; URBAN et al., 2009), vírus (FITZPATRICK; WILSON, 2003) e protozoários, dentre eles, a *Leishmania* (GUIMARAES-COSTA et al., 2009).

1.2. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A infecção humana com parasitos do gênero *Leishmania* causa a leishmaniose, doença que afeta milhões de pessoas no mundo. No Brasil, as formas mais comuns de leishmaniose são as formas tegumentares, principalmente as formas cutânea e mucosa (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A caracterização da leishmaniose cutânea (LC) se dá pela formação inicial de uma pápula ou nódulo no local da infecção, que progride para uma lesão ulcerada. Essa manifestação cutânea pode ser única ou múltipla e pode gerar consequências

esteticamente desfigurantes. Em alguns casos, as úlceras podem, após algumas semanas ou meses, cicatrizar de forma espontânea. As espécies relacionadas a essa manifestação clínica no Novo Mundo são, principalmente: *Leishmania tropica*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* (DE OLIVEIRA-NETO et al., 2000), sendo essa última espécie a principal causadora da forma cutânea no Brasil.

A leishmaniose mucosa (LM), causada no Brasil principalmente por *Leishmania braziliensis*, é caracterizada por lesões desfigurantes da mucosa, com a ausência de lesões cutâneas concomitantes e é resultado da migração hematogênica ou linfática de amastigotas para a mucosa da orofaringe e/ou da laringe, nasal e oral (CASTES; AGNELLI; RONDON, 1984; HERWALDT, 1999; LESSA et al., 2001). Acredita-se que a patogênese da LM seja diretamente dependente da resposta imune mediada por células, uma vez que a presença dos parasitos nas lesões mucosas é escassa, evidenciando a importância da resposta imune inclusive na eliminação do parasito. Diferentemente da LC, a LM geralmente não apresenta cicatrização espontânea, sendo considerada uma doença progressiva e destrutiva (LESSA et al., 2001).

O tratamento da leishmaniose apresenta distintas orientações terapêuticas em diferentes países e regiões do mundo, o que demonstra a complexidade da abordagem terapêutica na leishmaniose. Fatores como diferentes espécies de *Leishmania*, suscetibilidade ou não às drogas, manifestações da doença, bem como a variação da resposta imune do hospedeiro ou a propriedade farmacocinética das drogas são importantes e influenciam na eficácia e na escolha da terapia (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Muitos aspectos sobre a imunopatologia na lesão das LC e LM ainda permanecem obscuros, mas sabe-se que a presença da *Leishmania* é rara (LESSA et al., 2001), e que o infiltrado mononuclear nas lesões é rico em linfócitos (FARIA et al., 2009). Não se sabe o mecanismo exato pelo qual o parasito é eliminado da lesão, mas sabe-se da participação fundamental de células do sistema imune. Estudos *in vitro* mostraram que a produção de espécies reativas de oxigênio é importante na eliminação do parasito (Assche et al., 2011; Peters e Sacks, 2006), além da participação de linfócitos TCD4+ na produção de citocinas, que impedem a multiplicação da *Leishmania* e a progressão de lesões cutâneas (Carvalho et al., 1992). Mais recentemente, mecanismos de citotoxicidade por linfócitos TCD8+ têm sido também relacionados à morte de *Leishmania* (NOVAIS et al., 2013).

Os linfócitos TCD8+, quando ativados, atuam como células citotóxicas que após o reconhecimento do antígeno, são capazes de liberar grânulos líticos na superfície da célula alvo (BETTS et al., 2003; BETTS; KOUP, 2004) . Esses grânulos contêm proteínas efetoras chamadas de perforinas (criam poros na célula) e granzimas (clivam substratos críticos dentro da célula) levando a célula alvo à apoptose (FAN; ZHANG, 2005). Esses grânulos líticos então contidos em vesículas que possuem proteínas de membrana associada ao lisossoma (lysosomal-associated membrane proteins - LAMP) dentre eles, podemos destacar o LAMP-1 (CD107a) (PETERS, 1991). Os mecanismos de liberação de grânulos citotóxicos descritos até o momento envolvem uma íntima proximidade entre a célula citotóxica e seu alvo (DE LA ROCHE; ASANO; GRIFFITHS, 2016; FLESCHE et al., 2012; GERTNER-DARDENNE et al., 2007).

Na leishmaniose, mecanismos de citotoxicidade podem estar associados à eliminação do parasita (NOVAIS et al., 2013), mas alguns estudos demonstram também a participação de linfócitos T CD8+ na patogênese da doença e agravamento da lesão. Já foi demonstrado que a maioria das células T CD8+ da lesão expressaram marcadores citolíticos CD107a e granzima B, associado ao fato da expressão da granzima B em lesões de LC ter sido correlacionada positivamente com o tamanho da lesão (SANTOS et al., 2013). Além disso, a avaliação *in situ* demonstrou que células CD8+ expressando granzima A estão associadas à progressão da lesão de pacientes com a forma cutânea da leishmaniose (FARIA et al., 2009). Esses dados também sugerem que os linfócitos T CD8+ são capazes de causar danos teciduais (DA SILVA SANTOS; BRODSKYN, 2014).

Em 2009, Guimarães-Costa e colaboradores (GUIMARAES-COSTA et al., 2009) observaram redes extracelulares de neutrófilos em biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea causada por *Leishmania amazonensis*. Eles postularam que as redes poderiam ser responsáveis pelo controle da carga parasitária, e possivelmente modular a resposta imune local. Em 2014, o mesmo grupo demonstrou a importância da enzima 3' nucleotidase/nuclease (3'NT/NU) expressa pela *Leishmania infantum* no escape do parasita das redes (GUIMARÃES-COSTA et al., 2014). Os estudos de Guimarães-Costa mostram que diferentes espécies de *Leishmania* podem interferir diferentemente com a produção de redes. Considerando-se a importância da *L. braziliensis* como principal causadora da LTA, é de grande interesse avaliar os efeitos dessa espécie na indução de redes e, de forma importante, se há alguma associação com a patogênese da doença.

Estudos preliminares do nosso grupo (Koh, 2015) mostraram a presença de DNA extracelular em lesões cutâneas e mucosas de pacientes infectados com *L. braziliensis*. De forma interessante, a presença de neutrófilos nessas lesões é extremamente baixa, sendo, de fato formadas por aproximadamente 60% de linfócitos T. Este achado formou a base da hipótese que norteou este estudo: linfócitos T humanos podem fazer redes extracelulares.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Demonstrar que linfócitos T são capazes de liberar redes extracelulares de DNA e avaliar a associação dessas estruturas na imunopatologia das formas cutânea e mucosa da leishmaniose tegumentar americana.

2.2. Objetivos específicos

- a) Caracterizar a formação de redes extracelulares em linfócitos totais, linfócitos TCD4+ e TCD8+ humanos provenientes de indivíduos não infectados, *in vitro*;
- b) Avaliar as diferenças morfológicas e características bioquímicas entre necrose, e etose em linfócitos provenientes de indivíduos não infectados submetidos a diferentes condições para indução dos mecanismos de morte *in vitro*;
- c) Verificar o papel leishmanicida dos produtos de necrose e etose de linfócitos humanos provenientes de indivíduos não infectados;
- d) Identificar a ocorrência de etose em lesões de pacientes com as formas mucosa e cutânea da leishmaniose tegumentar americana;

- e) Verificar o papel da *Leishmania braziliensis* na liberação de redes extracelulares de DNA provenientes de linfócitos T;

3. Materiais e Métodos

3.1. Desenho experimental e população de estudo.

O esquema apresentado na figura mostra o desenho experimental que foi utilizado para a execução dos objetivos específicos. Para executar os experimentos, sangue de indivíduos não infectados foi coletado, assim como biopsias de pacientes com LTA. As biopsias de 14 pacientes voluntários com leishmaniose tegumentar americana (cutânea e mucosa) são provenientes da região endêmica de Corte de Pedra na Bahia. O diagnóstico, cuidados clínicos e tratamento dos pacientes foram de responsabilidade do Dr. Edgar Carvalho, do Hospital Edgar Santos (UFBA, Salvador, BA). O tratamento é oferecido a todos os pacientes, independentemente de sua participação no projeto. Os critérios de seleção dos pacientes foram baseados em exames clínicos, reação de Montenegro e parasitológicos. Biopsias de pele foram obtidas das bordas das lesões ativas com *punch* de 4mm, após a aplicação do anestésico local, processadas e armazenadas como previamente feito por nós (FARIA et al., 2005). Quinze voluntários saudáveis foram incluídos neste estudo para os vários experimentos de ativação de células T para detectar etose, apoptose, ativação celular, bem como expressão de moléculas citotóxicas e citocinas e avaliação com coculturas de parasitos e células T.

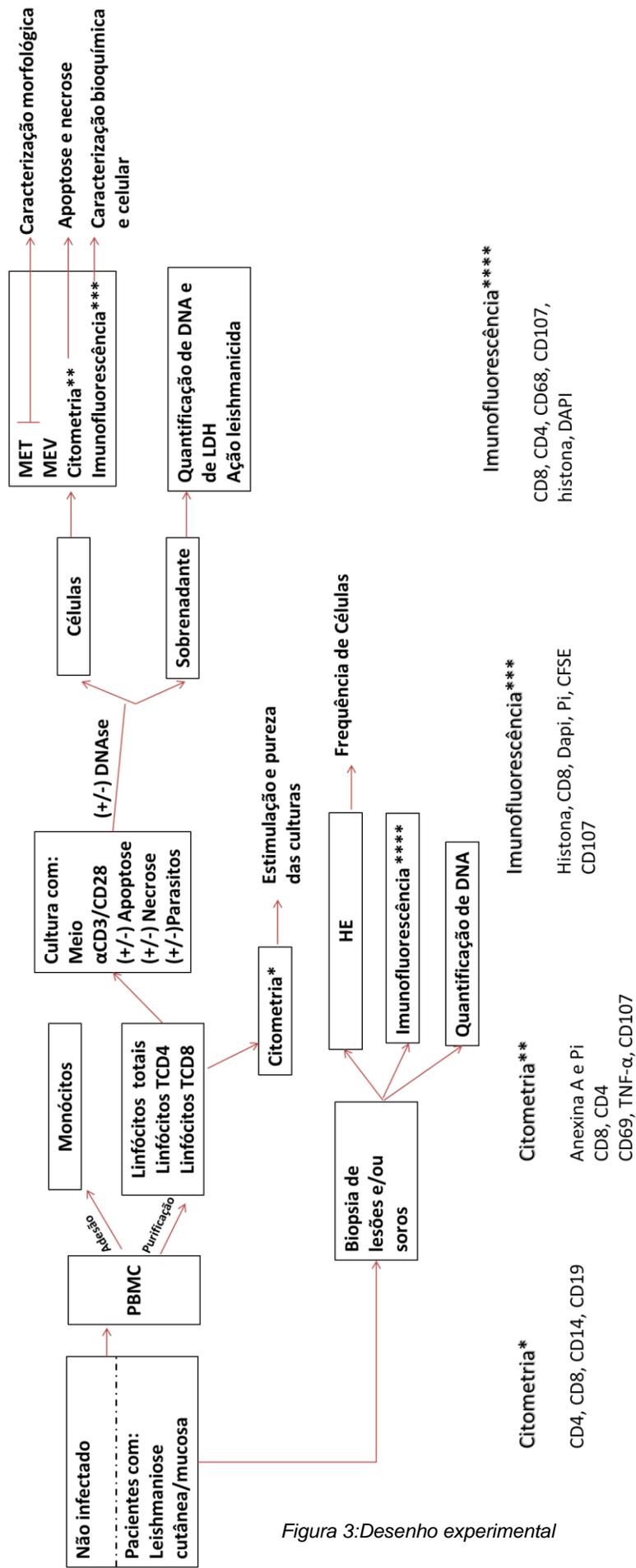


Figura 3: Desenho experimental

Os comitês de ética das Universidades Federais da Bahia e de Minas Gerais aprovaram todos os procedimentos envolvidos neste estudo e todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2. Separação, plaqueamento e cultura de CMSP (Células mononucleares do sangue periférico).

Para realizar a separação das CMSP, o sangue de doadores saudáveis foi coletado em tubos com heparina e aplicado cuidadosamente sobre o mesmo volume de *Ficoll-Paque* (*GE Healthcare* - Chicago, Illinois, EUA) separando-se as células mononucleares por gradiente de densidade, por centrifugação a 500g. As células mononucleares foram coletadas, colocadas em placas de 6 poços para que os monócitos aderissem (37°C, 5% CO₂ por uma hora) e o sobrenadante enriquecido em linfócitos foi recolhido. As células foram colocadas em lamínulas circulares 13mm, de vidro, pré-tratadas com poli-L-lisina (0,01%), no total de 5x10⁵ células por lamínula para microscopia eletrônica e, para as lamínulas preparadas para fluorescência, foram utilizadas 1x10⁵ células para cada lamínula. Os grupos de estudo foram: células cultivadas apenas em meio de cultura (denominado meio/controle), células estimuladas com anti-CD3/anti-CD28 (2µg e 1µg/mL, respectivamente – *Biolegend*- San Diego, Califórnia, EUA). Além desses grupos, células foram tratadas com estaurosporina, que é uma droga indutora de apoptose ou então, induziu-se a necrose (incubação a 56°C uma hora) – sendo estes controles positivos nos experimentos.

3.3. Separação de Linfócitos T CD8+ e T CD4+ por citometria de fluxo (sorting):

Os linfócitos foram purificados por gradiente de densidade e plaqueados para a adesão de monócitos a 37°C, 5% CO₂ por uma hora. O sobrenadante recolhido foi

marcado com anticorpos antimarcadores de superfície (anti-CD8-PeCy7 e anti-CD4-PeCy5, *Biolegend* - San Diego, Califórnia, EUA), já diluídos, conforme titulação padronizada no nosso laboratório. As células foram lavadas com PBS 1x por centrifugação e ressuspensas em RPMI onde permaneceram a 4°C até o momento da separação por citometria de fluxo (FACSAria 3, *Becton Dickinson*, Centro de Pesquisas René Rachou, sob a supervisão da Dra. Lis Antonelli e consultoria do Dr. Ken Gollob).

3.4. Marcação com CFSE (ou CFDA-SE - carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)

Para marcar os linfócitos com CFSE (*Sigma Aldrich* - San Luis, Missouri, EUA), foi ajustada a concentração de 5×10^6 linfócitos por mL e a eles foi acrescido CFSE a 5mM na proporção de 1 μ L para 1000 μ L de células ressuspensas em PBS 1x (*Sigma Aldrich* - San Luis, Missouri, EUA), sem soro. As células foram incubadas por 15 minutos na estufa, 37°C e 5% de CO₂, e a cada 5 minutos os tubos foram levemente agitados. Após a incubação, as células foram lavadas 3x com PBS 1x, a 500g por 10 minutos e, por fim, ressuspensas em DMEM (*Sigma Aldrich* - San Luis, Missouri, EUA) no volume desejado para serem plaqueadas com 1×10^5 células por lamínulas.

3.5. Reações de imunofluorescência em cultura de linfócitos T aderidas às lamínulas.

Para a avaliação por imunofluorescência, 1×10^5 células foram plaqueadas em lamínulas pré-tratadas com poli-L-lisina. Posteriormente foi adicionado o estímulo e as células foram cultivadas por 24 horas, 37°C a 5% de CO₂. Para a marcação de imunofluorescência, as lamínulas com as células foram fixadas com paraformaldeído 2% (*Sigma Aldrich* - San Luis, Missouri, EUA) por 15 minutos e lavadas 5 vezes com PBS 1X por três minutos cada. As células foram permeabilizadas usando Triton x-100 (*Sigma*

Aldrich - San Luis, Missouri, EUA) a 0,01% por 5 minutos, seguido de lavagens com PBS 1x. Para reduzir as marcações inespecíficas, as lamínulas foram incubadas em uma solução de bloqueio (PBS/BSA 1 + tween 20 a 0,1%) durante 60 minutos. Em seguida, foi adicionado anticorpo monoclonal anti-histona (*EMD Millipore*- Burlington, Massachusetts, EUA) em PBS/BSA 1% (1:10) e as preparações foram incubadas *overnight* (~15 horas) a 4°C. Posteriormente, foram realizadas sequências de cinco banhos com duração de três minutos cada, em PBS 1x. Então, as lâminas foram incubadas por uma hora, à temperatura ambiente, com anticorpo secundário *Donkey anti-mouse* IgG (H + L) conjugado com Alexa fluor 488, diluído em PBS/BSA 1% (1:500). Para a marcação com o anti-CD107a, foi acrescido o anticorpo diluído em PBS/BSA 1% (1:5), *overnight*. Após esse processo, as lamínulas foram lavadas, com PBS, em uma sequência de cinco banhos com duração de três minutos cada, e por fim, foram secados.

Para a marcação de linfócitos T CD8+, foi acrescido o anticorpo anti-CD8 (1:5 em PBS/BSA 1%), por uma hora em temperatura ambiente, seguido de cinco lavagens com PBS 1x por três minutos cada. Para realizar a marcação com faloidina, que se liga aos filamentos de actina do citoesqueleto, as células nas lamínulas foram fixadas, permeabilizadas, e coradas com uma solução de faloidina (1:40, em PBS 1x) por 20 min. Uma nova etapa de cinco banhos com duração de três minutos cada em PBS. Adicionou-se, então, DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride* – *Sigma Aldrich* - San Luis, Missouri, EUA) diluído em PBS/BSA 1% (1:500) durante 15 minutos e/ou o Iodeto de propídeo (Pi- 1:100). As lâminas foram montadas com *Vectashield*® e permaneceram a 4°C, protegidas da luz até o momento da aquisição no microscópio confocal a laser (*Zeiss 880* – *software*: ZEN 2009 – CAPI, UFMG). Em uma lâmina de cada doador e

condição, foi feito controle de anticorpo secundário e/ou isotipo para descartar a ligação inespecífica. As imagens foram processadas utilizando o programa Zeiss LSM Image Browser.

3.6. Microscopia eletrônica de varredura

Após a separação de CMSP e o enriquecimento de linfócitos, as células foram plaqueadas em lamínulas pré-tratadas com poli-L-lisina na proporção de 5×10^5 células por lamínula. Posteriormente as células foram incubadas na presença ou ausência de estímulos por 24 horas. Para a digestão do DNA, foi acrescida DNase I (Ambion™ DNase I RNase-free, *Invitrogen*, Carlsbad, Califórnia, EUA - 2U/ μ L) nas últimas 6 horas de incubação. As amostras foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1M por 2h. As lamínulas foram processadas e as imagens adquiridas no CAPI - ICB/UFMG ou no Centro de microscopia da UFMG. A pós-fixação foi feita em OsO₄ 1% em tampão 0,1M e posteriormente foram imersas em ácido tânico a 1%. As lamínulas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool até 100%. Após o ponto crítico (desidratação do material), as lamínulas foram fixadas e metalizadas, com uma camada de ouro de 3nm, e posteriormente as imagens foram adquiridas pelo microscópio eletrônico de varredura FEG - Quanta 200 FEI no Centro de Microscopia da UFMG.

3.7. Microscopia eletrônica de transmissão

Em preparo semelhante àquele realizado para microscopia eletrônica de varredura, as células provenientes da cultura enriquecida em linfócitos foram plaqueadas em lamínula Thermanox®, pré-tratadas com poli-L-lisina, na proporção de 5×10^5 células por lamínula. Após cultura de 24 horas, na presença ou ausência de estímulos, as células foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1M por 2h. As

células foram pós-fixadas em OsO₄ a 2% (*Sigma Aldrich* - San Luis, Missouri, EUA) em tampão 0,1 M e depois foram contrastadas com acetato de uranila (2% aquoso). A desidratação foi realizada em concentrações crescentes de etanol seguida de acetona. As monocamadas de células na lamínula foram transferidas para a resina Epon pela técnica de *flat embedded* (MILLER, 2004). Secções ultrafinas foram feitas e coradas com citrato de chumbo. As imagens foram feitas usando o microscópio de transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI - 120 k- no Centro de microscopia da UFMG.

3.8. Quantificação de DNA e tratamento com DNase I

As células provenientes da cultura enriquecida em linfócitos foram incubadas na presença ou ausência de diferentes estímulos. Passado o tempo de incubação, as células foram centrifugadas a 500g por 10 minutos para retirada das células, e o sobrenadante foi coletado e congelado a -20°C. O mesmo procedimento de centrifugação e congelamento foi feito para o soro dos pacientes. O DNA no sobrenadante das culturas e do soro foi quantificado pelo kit *Picogreen dsDNA* (*Invitrogen* - Carlsbad, Califórnia, EUA) de acordo com as informações do fabricante. Para a digestão do DNA pela DNase, foi utilizada uma solução de DNase I (*Invitrogen* - Carlsbad, Califórnia, EUA) a 100u/mL na proporção de 1:1 com as amostras. A digestão ocorreu a 37°C por um período de 6 horas e posteriormente foi feita a quantificação do DNA.

3.9. LDH

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima citosólica estável que é liberada no sobrenadante da cultura após a lise celular. A quantificação foi realizada com o kit LDH UV gentilmente cedidos pela *Bioclin* (Belo Horizonte, MG, Brasil) e as orientações do fabricante foram seguidas.

3.10. Citometria de CMSP (células mononucleares do sangue periférico)

Para as marcações, foram adicionadas 20µL de meio com 2×10^5 de células em cada poço da placa de 96 poços fundo côncavo. Em seguida, foram adicionados os anticorpos anti-marcadores de superfície, já diluídos, conforme titulação padronizada no nosso laboratório, em um volume final de 40µL. Após adição dos anticorpos, a placa foi incubada a 4°C por 15 minutos ao abrigo da luz. Terminado o período de incubação, foi realizada a lavagem das células adicionando-se 150µL de PBS gelado em cada poço. A placa foi então, centrifugada a 500g durante 10 minutos a 4°C. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi vertido e, em seguida, a placa foi agitada a fim de suspender as células. De posse das células já suspensas, foram adicionados, 100µL de PBS e 100µL de solução de formaldeído 4%, por 15 minutos à temperatura ambiente. Para a marcação intracelular, as células foram lavadas 2x com PBS 1x seguido da permeabilização com solução de saponina a 0,5%. Os anticorpos intracelulares foram diluídos na solução permeabilizante e permaneceram 30min, em temperatura ambiente, em contato com as células. Foram feitas lavagens para remoção dos anticorpos que não se ligaram, e as células foram ressuspensas em PBS 1x.

Para a marcação com anexina V e iodeto de propídio (Pi), apenas a marcação de superfície foi feita e as células não foram fixadas, sendo lidas frescas. Foram adicionados 2µL de anexina V diluída na solução própria fornecida pelo fabricante às células marcadas com anti-marcadores de superfície. Próximo ao momento de leitura foi adicionado 1µL de Pi por amostra. A leitura foi feita no *FacsCanto II* e a análise foi feita no *FlowJo V10*.

3.11. **Reações de imunofluorescência em lesões de pacientes com LTA.**

As biopsias de lesões utilizadas em nosso estudo foram previamente coletadas de pacientes infectados na área endêmica de Corte de Pedra, parte da coleção de lesões do projeto de pesquisa *Tropical Medicine Research Center*, do qual nosso grupo faz parte. Brevemente, as biopsias coletadas foram embebidas, por 30 minutos, em solução de sacarose 30% a 4°C. Logo após, as amostras foram transferidas para o meio de inclusão *Tissue-Tek (Sakura)* e imediatamente colocadas em gelo seco. Após aproximadamente 08 horas, as amostras foram transferidas para o freezer -80°C, onde permaneceram até o processamento. Para a marcação das lesões, os cortes de 5-7µm de espessura coletados em lâminas siliconadas da marca *Micro Slides (VWR Scientific - Seattle, WA, EUA)* e fixados em acetona a -20°C por 10 minutos ou em paraformaldeído 4% à temperatura ambiente. As lâminas foram submetidas a uma sequência de cinco banhos de PBS 1x gelado com duração de três minutos cada. Para reduzir as marcações inespecíficas, os cortes foram incubados em uma solução de bloqueio (PBS/BSA 1% + tween 20 a 0,1% + Triton X-100 a 0,1%) durante 60 minutos. Em seguida, foi adicionado anti-histona (*EMD Millipore - Burlington, Massachusetts, EUA*) em PBS/BSA 1% (1:10). Os cortes foram incubados *overnight* (~15 horas) a 4°C. Posteriormente, foram realizadas sequências de cinco banhos com duração de três minutos cada, em PBS 1x. Então, os cortes foram incubados por uma hora, à temperatura ambiente, com anticorpo secundário *Donkey anti-mouse IgG (H + L)* conjugado com Alexa Fluor 488 por uma hora, diluído em PBS/BSA 2% (1:500). Após esse processo, os cortes foram lavados com PBS, em uma sequência de cinco banhos com duração de três minutos cada, e por fim, foram secados. Adicionou-se, então, DAPI diluído em PBS/BSA 2% (1:500) durante 15 minutos e uma

nova etapa de cinco banhos com duração de três minutos cada em PBS. Para avaliar a frequência das subpopulações de células mononucleares, marcadores anti-moléculas de superfícies foram utilizados (anti-CD4, anti-CD8, anti-CD68 – *Biologend*- San Diego, Califórnia, EUA) e incubados por 1h, seguido de cinco lavagens com PBS 1x por 3min. Posteriormente foi feita a coloração com DAPI (1:500). As lâminas foram montadas com *Vectashield*® e permaneceram a 4°C, protegidas da luz, até o momento da aquisição no microscópio confocal a laser (Zeiss 880 – *software*: ZEN 2009 – CAPI, UFMG). Em uma lâmina de cada paciente, foi feito controle de anticorpo secundário e/ou isotipos para descartar a ligação inespecífica. As imagens foram processadas utilizando o programa Zeiss LSM Image Browser. Para determinar a frequência das subpopulações de células mononucleares, foi contado o número total de células marcadas em 3 campos por lâmina e feita a média da contagem.

3.12. Ação leishmanicida

Os sobrenadantes (50µL) das culturas estimuladas ou não (1×10^6 células), foram adicionados à cultura de *Leishmania amazonensis* (1×10^7 parasitos) durante 30 minutos (34°C). Posteriormente foi acrescido meio Schneider/10% SFB (*Gibco* - Waltham, Massachusetts, EUA), e a cultura transferida para a estufa a 24°C. Foi feita a contagem, na câmara de Neubauer, dos parasitos presentes na cultura durante 11 dias para avaliar a curva de sobrevivência dos parasitos.

3.13. Cocultura de linfócitos e parasitos

Para a realização desse experimento, foram colocadas 1×10^6 células no tubo de 5mL de cultura. Posteriormente foi adicionado o estímulo anti-CD3/CD28 e acrescido *L.*

braziliensis na proporção de 1:1, ou seja, 1×10^6 parasitos. Assim, os nossos grupos de estudo consistiram em: controle, controle + parasito, estimulado com anti-CD3/CD28, estimulado + parasito. Após 24 horas de cultura, o sobrenadante foi recolhido após centrifugação e armazenado a -20°C para posterior quantificação do DNA no sobrenadante das culturas conforme descrito na seção materiais e métodos.

3.14. Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando o software *GraphPadPrism 7*. Optou-se por realizar o teste T pareado sempre que se tratava de amostras iguais em diferentes condições ou não pareado quando se tratava de amostras diferentes. A avaliação da normalidade nos grupos foi realizada. Quando o grupo tinha a distribuição normal, foi utilizado testes T paramétricos, quando não, fizemos os testes não paramétricos. Caso as amostras fossem não pareadas e não paramétricas optou-se pelo pós-teste Mann-Whitney.

4. Resultados

4.1. Redes extracelulares de DNA liberadas em culturas enriquecidas em linfócitos

Avaliação da pureza dos linfócitos utilizados nos ensaios para análise da produção de redes extracelulares.

As redes extracelulares de DNA já foram descritas em diversos tipos celulares como neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (BRINKMANN et al., 2004; KO et al., 2008; MUNIZ et al., 2018). Com o objetivo de verificar se linfócitos T são células capazes de liberar redes extracelulares de DNA, coletou-se sangue de doadores saudáveis, separaram-se as células mononucleares de sangue periféricos (CMSP) por gradiente de densidade, realizou-se a adesão de células (monócitos) e por fim coletou-se o sobrenadante enriquecido em células não aderentes: os linfócitos. Para verificar a pureza dessa cultura, uma alíquota foi recolhida e realizada a marcações com anti-CD19 (linfócitos B), anti-CD14 (monócitos e granulócitos), anti-CD4 e CD8 (subpopulações de linfócitos T - LT). Citometria de fluxo foi utilizada para obter as frequências de cada população celular. Na figura 4 está demonstrada a estratégia de análise utilizada para verificar a frequência dos diversos fenótipos celulares. Na figura 5 é possível observar que a frequência de células marcadas com CD14 e CD19 é baixa (1,5% e 4,86%

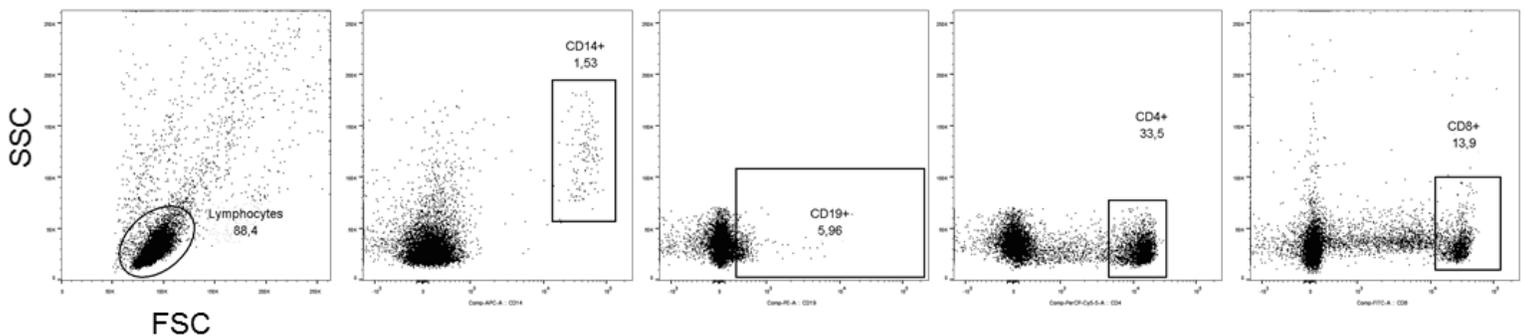


Figura 4: Estratégia de análise para avaliar a frequência das populações de CD14+, CD19+, CD4+ e CD8+ após a marcação com anticorpos anti-marcaadores de subpopulações celulares e a aquisição por citometria de fluxo.

respectivamente), enquanto há um predomínio de linfócitos T sendo que aproximadamente 11,46% da subpopulação de linfócitos T era composta de células T CD8+ e 46,56% de linfócitos T CD4, caracterizando assim uma cultura enriquecida em linfócitos T.

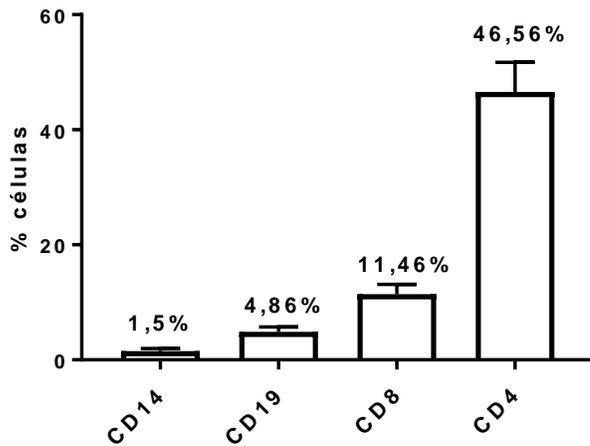


Figura 5: **Análise por citometria de fluxo da composição celular da cultura de enriquecida em linfócitos.** Os resultados foram obtidos após a separação de CMSPs e a adesão de monócitos. Foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD14, anti-CD19, anti-CD4 e anti-CD8. Barras representam média e desvio padrão. As porcentagens acima das barras correspondem aos valores percentuais médios.

Com o objetivo de verificar as diferenças bioquímicas relacionadas à morte celular decidiu-se avaliar, por citometria de fluxo, a ocorrência de apoptose e necrose nos grupos estudados. Para isso, após fazer a separação de CMSPs e coletar a cultura enriquecida em linfócitos, as amostras foram cultivadas por 24 horas, a 37°C em estufa úmida a 5% de CO₂, em meio de cultura, estimuladas com anti-CD3/CD28 (específico para linfócitos T), induzidas à necrose (56°C por 1h) ou tratadas com estaurosporina, um controle positivo para apoptose. Após decorridas as 24 horas, incubaram-se as células com

anexina V e iodeto de propídeo (Pi) conforme descrito na metodologia. Observando a figura 6, o primeiro gráfico (A), o grupo em que foi induzida a necrose apresenta uma porcentagem de morte total maior do que os demais grupos de estudo (meio e anti-CD3/CD28. Estaurosporina corresponde ao grupo controle positivo para morte celular). A avaliação da porcentagem de morte celular total consiste na soma das porcentagens de células apenas anexina V+ (apoptose), células anexina V+ e Pi+ (apoptose tardia e necrose) e apenas Pi+ (necrose).

No segundo gráfico (B) é possível observar que o grupo em que foi induzido à necrose possui uma frequência maior de células anexina V+ e Pi- quando comparado as células dos grupos “meio” e células estimuladas com anti-CD3/CD28. Da mesma forma que o gráfico anterior, o grupo de controle positivo, tratado com estaurosporina,

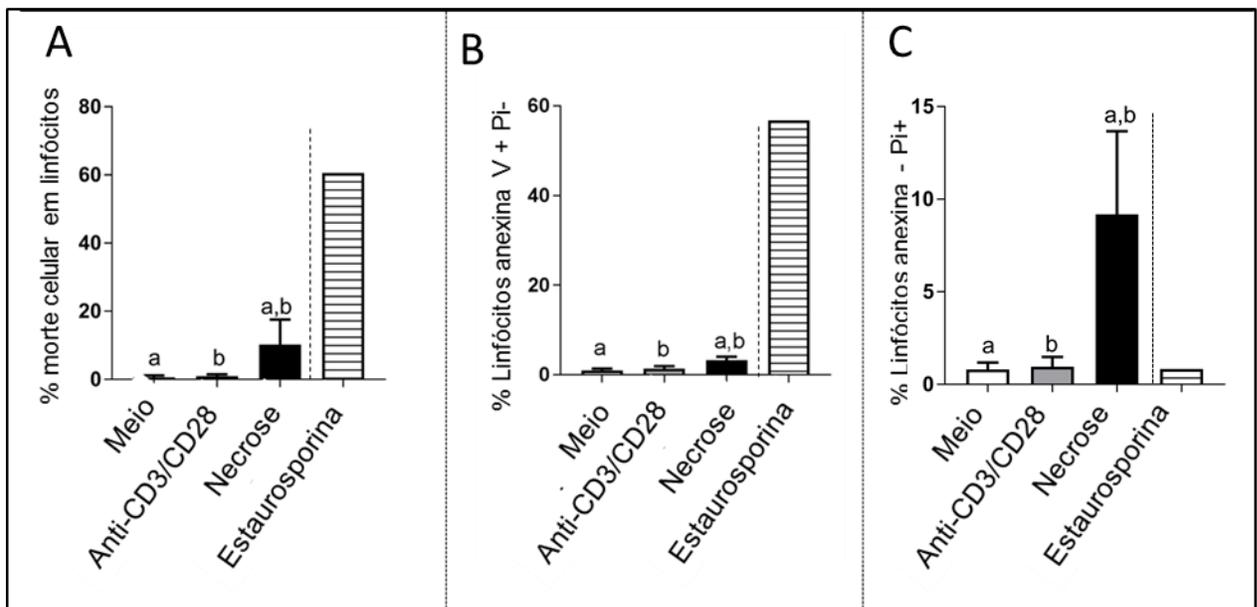


Figura 6: **Avaliação da porcentagem de morte celular por citometria de fluxo.** Após separar as CMSP, estimular com anti-CD3/CD28 ou induzir as células à necrose, foi realizada a marcação com anexina V e iodeto de propídeo (Pi) após 24 horas de cultura. As células positivas apenas para anexina V são características de células em apoptose, enquanto as positivas apenas para Pi são características de necrose. Porcentagem de morte totais em linfócitos foi feita através da soma de células apenas anexina V positivas, apenas Pi positivas e as células duplo positivas para esses marcadores. Estaurosporina é um controle positivo para morte celular por apoptose. Em A foi avaliado a porcentagem de morte celular total em linfócitos. Em B foi avaliado a porcentagem de linfócitos em apoptose (anexina V + e Pi). Em C foi avaliado a porcentagem de linfócitos em necrose (apenas Pi+). Letras iguais = estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

apresenta uma frequência maior de células apenas anexina V+ demonstrando uma predominância maior de morte por apoptose do que os demais grupos. O terceiro gráfico (C), frequência de células anexina V- e Pi+, demonstra a ocorrência de morte celular por necrose. Dessa forma é possível observar que o grupo em que foi induzida a necrose possui uma frequência maior de células apenas Pi+ quando comparado aos demais grupos analisados, demonstrando assim que a nossa estratégia de indução à necrose de fato é capaz de induzir as células à necrose. Além disso, as tabelas demonstram, também, que as células cultivadas apenas em meio de cultura e aquelas estimuladas com anti-CD3/CD28 apresentam uma baixa frequência de morte celular, diferenciando o grupo estimulado e o induzido à necrose quanto a caracterização do tipo de morte celular.

Quantificação da produção de redes extracelulares em culturas enriquecidas de linfócitos utilizando-se coloração histoquímica específica para DNA.

Após obter uma cultura enriquecida, verificar que a estratégia de indução da necrose é efetiva e que os grupos meio e estimulado são diferentes do induzido à necrose, realizou-se o plaqueamento de 1×10^5 células em lamínulas de vidro pré-tratadas com poli-L-lisina. Posteriormente, as células foram colocadas em cultura apenas com meio (controle), estimuladas com anti-CD3/CD28 ou induzidas à necrose. Com o objetivo de identificar a ocorrência de DNA fora das células, foram utilizados os corantes DAPI e Iodeto de propídio (Pi) e a análise foi realizada através de microscopia confocal.

Na figura 7 é possível observar que, após o estímulo com anti-CD3/CD28, observam-se estruturas em forma de fio coradas com DAPI (azul) e por Pi (vermelho) evidenciadas pelas setas em branco. Em contrapartida, nas imagens relacionadas ao

grupo controle (meio) e ao grupo induzido à necrose é possível observar uma quantidade pequena ou inexistente dessas estruturas.

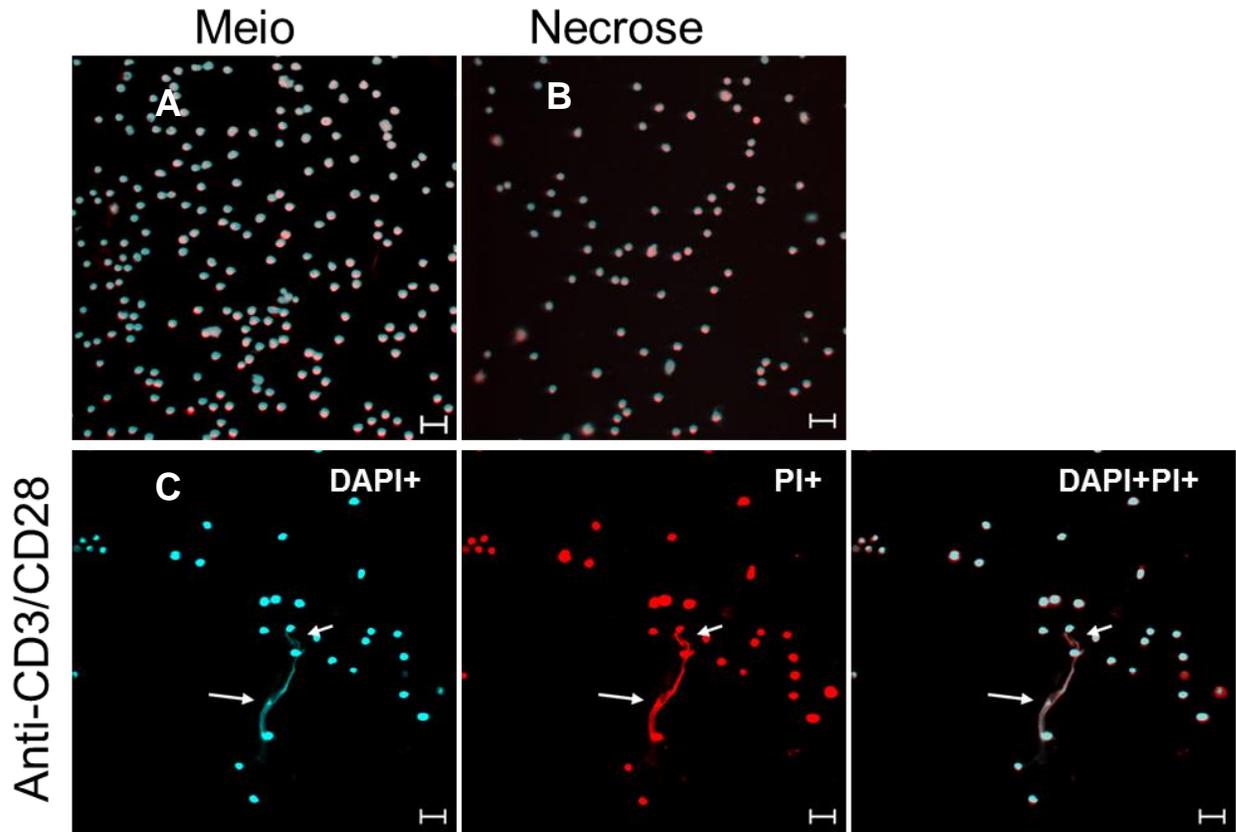


Figura 7: **Avaliação, em culturas enriquecidas em linfócitos, por microscopia confocal, da ocorrência de DNA extracelular** através da coloração do DNA com DAPI (azul) e iodeto de propídeo (vermelho). Setas indicam ocorrência de DNA fora da célula. Barras = 20µm. Em A observa-se a sobreposição da coloração com o DAPI e o PI em células cultivadas em meio. Em B tem-se a imagem de cultura induzidas à necrose e no painel C observa-se células estimuladas com anti-CD3/CD28 DAPI+, PI+ e com a sobreposição das duas colorações (DAPI+PI+). Imagens representativas.

Com o objetivo de quantificar essas estruturas de DNA observadas nas imagens de microscopia confocal, foram contadas as estruturas coradas com DAPI e PI que estavam presentes fora das células. Além disso, como essas estruturas aparentam conectar uma célula a outra, contaram-se também as células que estavam envolvidas nesse processo. Dessa forma, observando-se o gráfico A da figura 8, pode-se destacar que o grupo estimulado com anti-CD3/CD28 apresenta aproximadamente 2,5 vezes mais

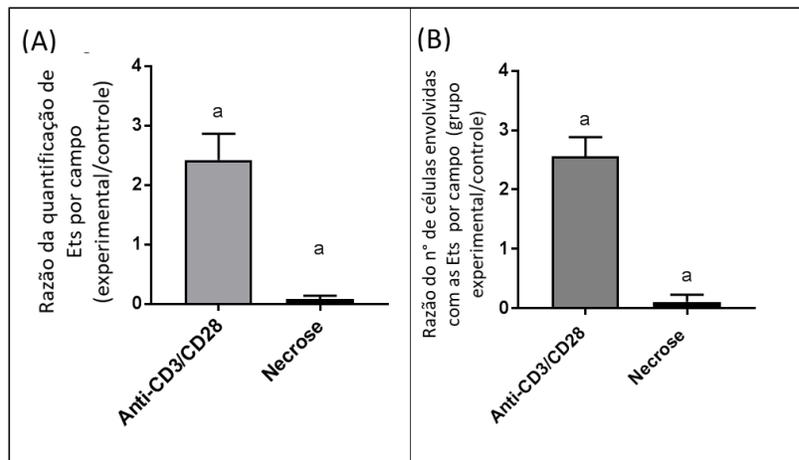


Figura 8: **Quantificação da ocorrência de etose nas culturas enriquecidas em linfócitos.** Quantificação de redes extracelulares e de células envolvidas no evento nos grupos analisados de culturas enriquecidas em linfócitos, estimulados ou não com anti-CD3/anti-CD28 por 24h, induzidos ou não a necrose. Letras iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$). No gráfico A é observado a razão da quantificação das redes extracelular dos grupos estimulado e induzido à necrose sobre a quantificação de redes no grupo controle (células cultivadas apenas em meio de cultura). No gráfico B é demonstrado a razão da quantificação de células envolvidas no processo de liberação e/ou participação das redes de DNA dos grupos estimulado e induzido à necrose sobre a quantificação dessas células no grupo controle.

estruturas que o grupo controle, enquanto o grupo que foi induzido à necrose praticamente apresenta a mesma quantidade de estruturas que o grupo controle. Ainda, é possível destacar que, o grupo estimulado é estatisticamente diferente do grupo induzido à morte celular. Ainda nesse contexto, é possível observar no gráfico B da figura 8 que a quantidade de células envolvidas nesse processo é maior no grupo estimulado do que nos demais grupos. Esses dados ressaltam a importância do estímulo no surgimento dessas estruturas extracelulares de DNA.

Quantificação de DNA e lactato desidrogenase no sobrenadante das culturas enriquecidas de linfócitos.

Diversos estudos que avaliam ocorrência de etose liberadas por diversos tipos celulares utilizam a quantificação de DNA no sobrenadante da cultura para avaliar e quantificar a ocorrência desse evento (BRINKMANN et al., 2010; DE BUHR et al., 2016). Sendo assim, após visualizar, por microscopia confocal, a ocorrência de estruturas extracelulares de DNA em culturas enriquecidas em linfócitos e estimuladas com anti-CD3/CD28, quantificou-se a liberação, no sobrenadante das culturas de DNA, utilizando o kit *Picogreen*, e de lactato desidrogenase (LDH), com o Kit da Bioclin, como descrito na

sessão materiais e métodos. Após a obtenção desses dados, foi feita a razão entre os grupos estudados e o grupo controle (células cultivadas apenas no meio de cultura). Nos grupos tratados com DNase, a razão realizada foi o valor encontrado na quantificação do DNA no sobrenadante das culturas tratadas com DNase dividido pelo valor dessa cultura sem o tratamento. Observando-se a figura 9 A, é possível constatar que a liberação de DNA em culturas estimuladas com anti-CD3/CD28 foi quase 25% maior que em culturas controle. Além disso, a liberação de DNA das culturas estimuladas é estatisticamente diferente da liberação de DNA das culturas em que foi induzida a necrose. Como controle positivo do experimento, lisaram-se as células (-70°C por 1h) para quantificação do DNA

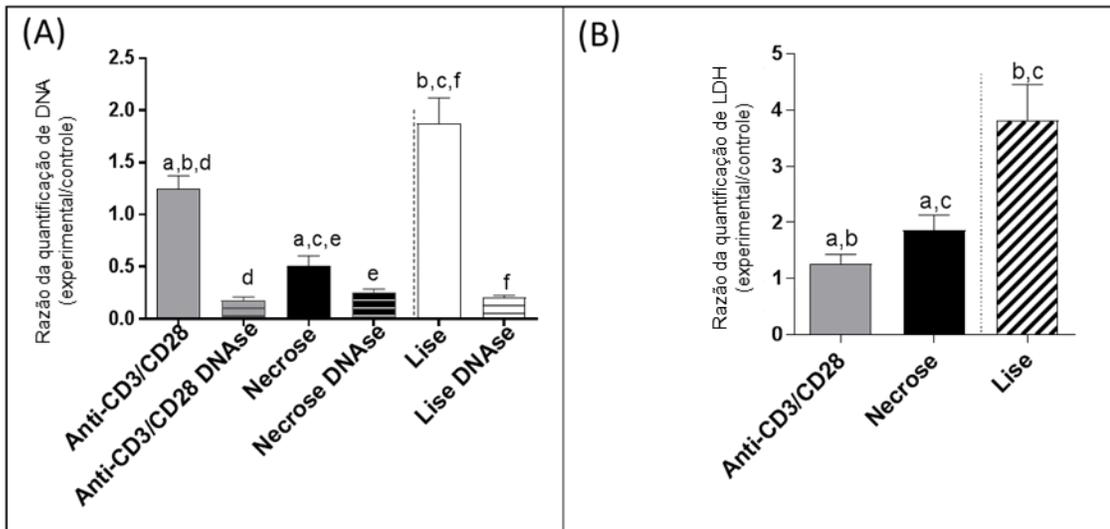


Figura 9 Avaliação de características bioquímicas no sobrenadante das culturas enriquecidas em linfócitos. (A) Razão da quantificação de DNA dos grupos de células estimuladas com anti-CD3/CD28 ou induzidas à necrose sobre a quantificação de DNA no grupo controle. (B) Razão da quantificação de lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante de culturas estimulas com anti-CD3/CD28 ou induzidas à necrose sobre a quantificação de LDH no sobrenadante do grupo controle. O grupo "lise" (em que as células foram lisadas) foi utilizado como grupo controle. Letras iguais = estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

liberado. Para confirmar que a metodologia de fato dosava DNA, trataram-se as amostras com a enzima DNase I conforme descrito na metodologia. Foi possível observar que houve uma redução na quantificação de DNA em todos os grupos avaliados após o

tratamento com a DNase, o que reforça a especificidade da quantificação de DNA nesse experimento. A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima que apresenta-se aumentada no sobrenadante das culturas quando a célula morre por necrose (CHAN; MORIWAKI; DE ROSA, 2013). Na figura 9 B, é possível observar que a liberação de LDH no grupo induzido à necrose é estatisticamente diferente do grupo estimulado com anti-CD3/CD28. Além disso, como controle positivo, foi quantificada a liberação dessa enzima em sobrenadante de células lisadas, apresentando assim uma quantidade maior de LDH no sobrenadante.

Avaliação da produção de redes extracelulares em culturas enriquecidas de linfócitos utilizando-se coloração específica para DNA, histona e actina.

Quando as redes extracelulares de DNA (ETs) foram descritas, foi demonstrado que são principalmente constituídas de DNA e histonas (BRINKMANN et al., 2004; FUCHS et al., 2007a). Dessa forma decidiu-se verificar, através de imunofluorescência, se as estruturas observadas em culturas estimuladas enriquecidas em linfócitos marcavam concomitantemente para DNA e histonas. Para isso, foram plaqueadas 1×10^5 células em lamínulas pré-tratadas com poli-L-lisina, e foram estimuladas com anti-CD3/CD28 por 24 horas, em estufa úmida, a 37°C. Após esse período, as lâminas foram coradas com anticorpo anti-histona e DAPI e as imagens foram adquiridas no microscópio confocal. Na figura 10 é possível observar a presença de estruturas extracelulares coradas concomitantemente em azul, que demonstram a ocorrência de DNA, e em

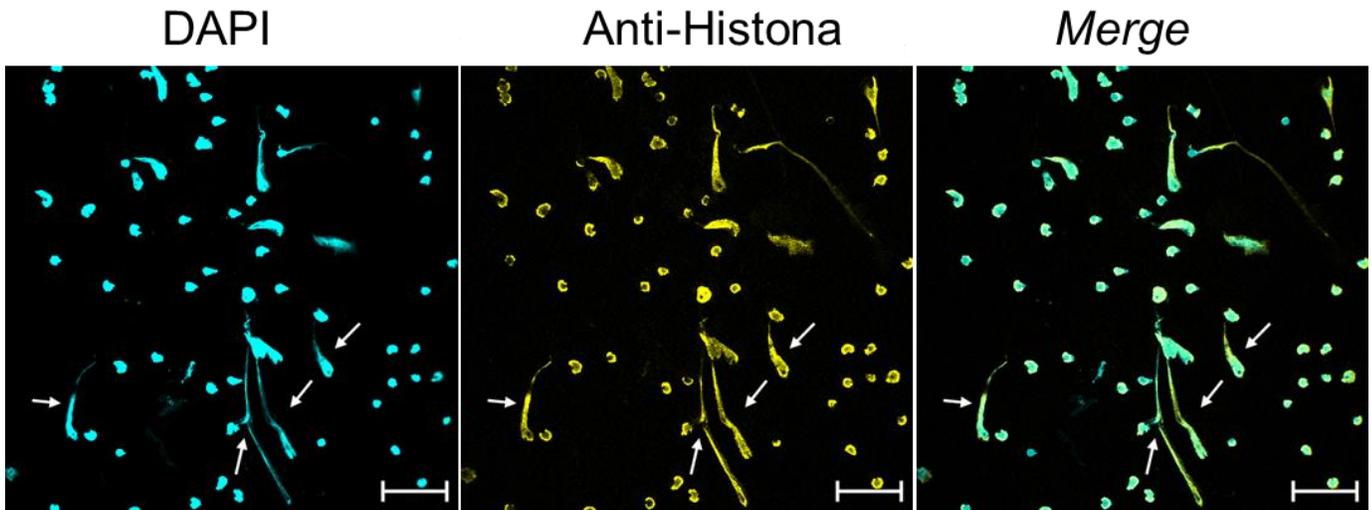


Figura 10: **Redes extracelulares coradas por DAPI e anti-histona.** Avaliação, em culturas enriquecidas em linfócitos, por microscopia confocal, da ocorrência de redes extracelulares através da marcação de DNA por DAPI (azul) e histona (amarelo) e em merge observa a sobreposição dessas duas imagens. Setas indicam a ocorrência de redes extracelulares. Barras = 50 μ m.

amarelo, a ocorrência de histonas, evidenciando que essas estruturas são compostas por DNA e histonas. Ainda com o objetivo de caracterizar a composição dessa rede extracelular, utilizou-se o corante faloidina que cora o componente actina filamentosa do citoesqueleto celular. Na figura 11 pode-se observar a ocorrência da rede extracelular evidenciada em ETs azul pela coloração com o DAPI e em vermelho, a actina. Ao observar a sobreposição das duas imagens é possível verificar que as Ets não são compostas por actina.

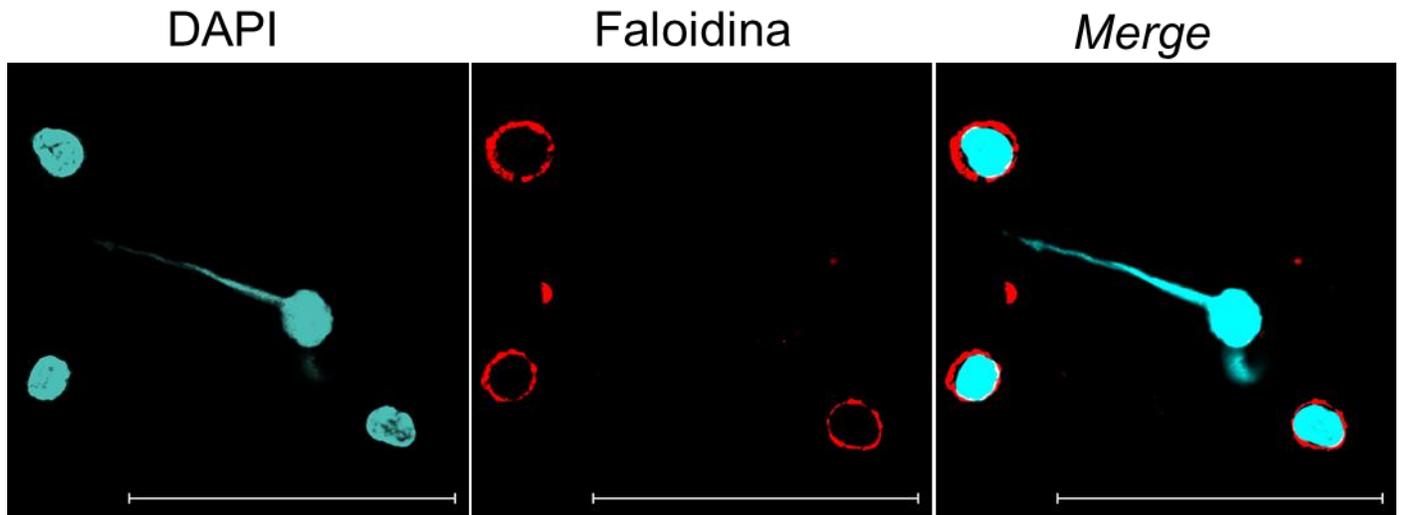


Figura 11: **Redes extracelulares coradas por DAPI não apresentam actina.** Avaliação, em culturas enriquecidas em linfócitos, por microscopia confocal, da presença de actina corada pela faloidina em redes extracelulares de DNA. Barras = 50μm.

Avaliação da liberação de redes extracelulares em cultura enriquecida de linfócitos T humanos por microscopia eletrônica de varredura e transmissão

A microscopia eletrônica é uma ferramenta importante para estudar a etose (DE BUHR et al., 2016). Após fazer a separação de CMSP e recuperar uma cultura enriquecida em linfócitos, 5×10^5 células foram plaqueadas em lamínulas pré-tratadas com poli-L-lisina e cultivadas por 24 horas, a 37°C em estufa úmida na presença e ausência de anti-CD3/CD28. Plaquearam-se, ainda, utilizando-se protocolo semelhante, células que foram induzidas à necrose. Nas últimas 6h de cultivo foi adicionada DNase I em algumas das amostras, e todas foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura. Na figura 12 A, D, G estão mostradas imagens ilustrativas de células que foram cultivadas apenas com meio de cultura. Já as imagens B, E, H são imagens de células que foram

estimuladas, e C, F, I são imagens de culturas que foram induzidas à necrose. Todos os grupos apresentam estruturas em forma de fio que aparentam conectar uma célula a outra. Entretanto, o grupo que foi estimulado, apresenta uma frequência maior dessas estruturas. Ao se tratarem essas culturas nas lamínulas com DNase é possível observar que as estruturas afiladas antes existentes deixam de existir como pode ser observado nas imagens D, E, F. Nas imagens G, H, I da figura 12 é possível observar diferenças morfológicas na morfologia externa das células. Comparativamente com a imagem do grupo cultivado apenas com meio de cultura, o grupo que foi estimulado apresenta diversas projeções da membrana da célula, enquanto o grupo que foi induzido à necrose apresenta a membrana rompida, com poros, sem uniformidade. Já no painel J é demonstrado em detalhe a ocorrência dessa rede extracelular. De forma individualizada é possível medir o diâmetro desses fios que parecem agrupar-se, sendo 14,7nm o diâmetro médio de cada uma dessas fibras.

Na figura 13 observam-se imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Essa técnica nos permite avaliar a morfologia interna celular. Sendo assim, a imagem A apresenta aspectos morfológicos normais de uma célula, como envoltório nuclear e diversas organelas distribuídas no citoplasma celular. Já na figura 13 B, observam-se, em células provenientes do grupo estimulado com anti-CD3/CD28, ausência do envoltório nuclear, mistura do conteúdo citoplasmático com o nuclear e a polarização do conteúdo intracelular.

4.2. Redes extracelulares de DNA liberadas por linfócitos T CD4+ e TCD8+

Avaliação por microscopia confocal e eletrônica de varredura da capacidade de linfócitos T CD8+ e T CD4+ fazerem etose

Após observar por diversas técnicas que as células das culturas enriquecidas em linfócitos T são capazes de liberar estruturas compostas por DNA e histona, propusemos a avaliar se culturas isoladas das subpopulações de linfócitos T (CD8+ e CD4+) são capazes de fazer etose. Após realizar a separação dessas subpopulações por citometria de fluxo (*sorting*), as células foram coradas com CFSE, conforme descrito. As células das subpopulações de linfócitos T foram plaqueadas e estimuladas com anti-CD3/CD28 por 24 horas, em estufa úmida, a 37°C e posteriormente coradas com DAPI. Por fim, as imagens foram adquiridas por microscopia confocal. Na figura 14 é possível observar em azul a presença de DNA (DAPI) e em rosa é observada a ocorrência da marcação com CFSE. Quando é avaliada a sobreposição das imagens, é possível observar que, nas setas, elas ocorrem concomitantemente. Células CD4+ apresentam estruturas dispersas, enquanto as estruturas provenientes das células CD8+ parecem conectar uma célula a outra (setas)

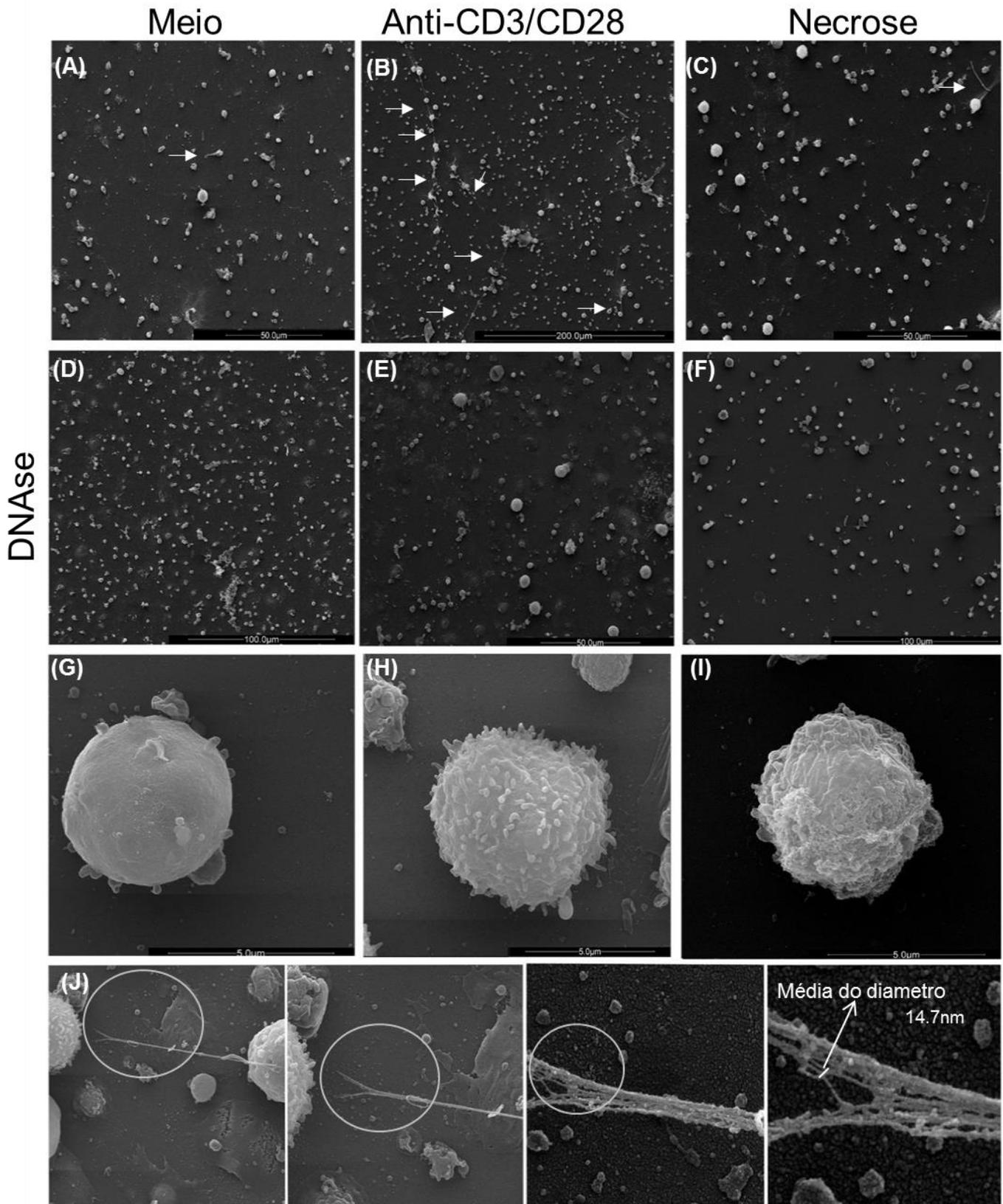


Figura 12 **Avaliação por microscopia eletrônica de varredura da presença de redes extracelulares em culturas enriquecidas em linfócitos.** Os quadros de A J foram adquiridos por microscopia eletrônica de varredura; as barras de aumento estão presentes em cada figura. As setas evidenciam a presença de estruturas extracelulares. As imagens A, D, G são referentes a cultura controle; B, E, H são de culturas estimuladas por anti-CD3/CD28 por 24h e C, F, I são referentes às culturas induzidas à necrose. Os quadros D, E F corresponde a culturas que foram tratadas com DNase I. O painel J demonstra rede extracelular e a medição média de 14,7nm do filamento individualizado.

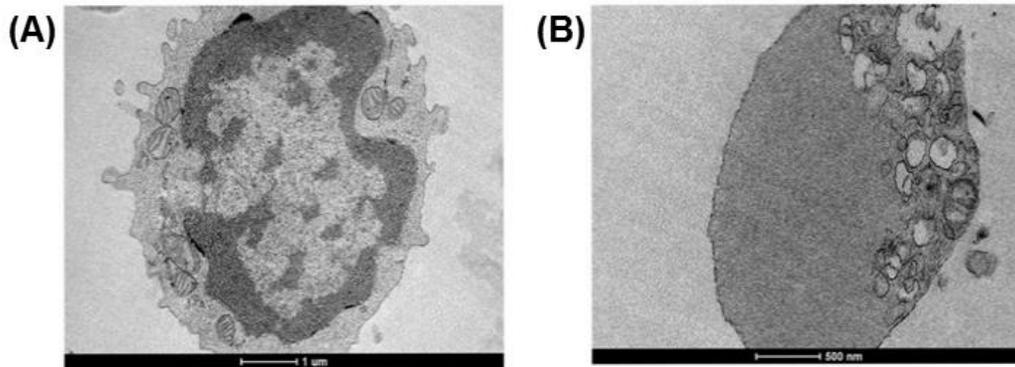


Figura 13 **Avaliação por microscopia eletrônica de transmissão da morfologia interna dos linfócitos.** A imagem A corresponde uma célula do grupo controle e B a uma célula do grupo estimulado com anti-CD3/CD28 por 24 horas. As barras de aumento estão presentes em cada figura.

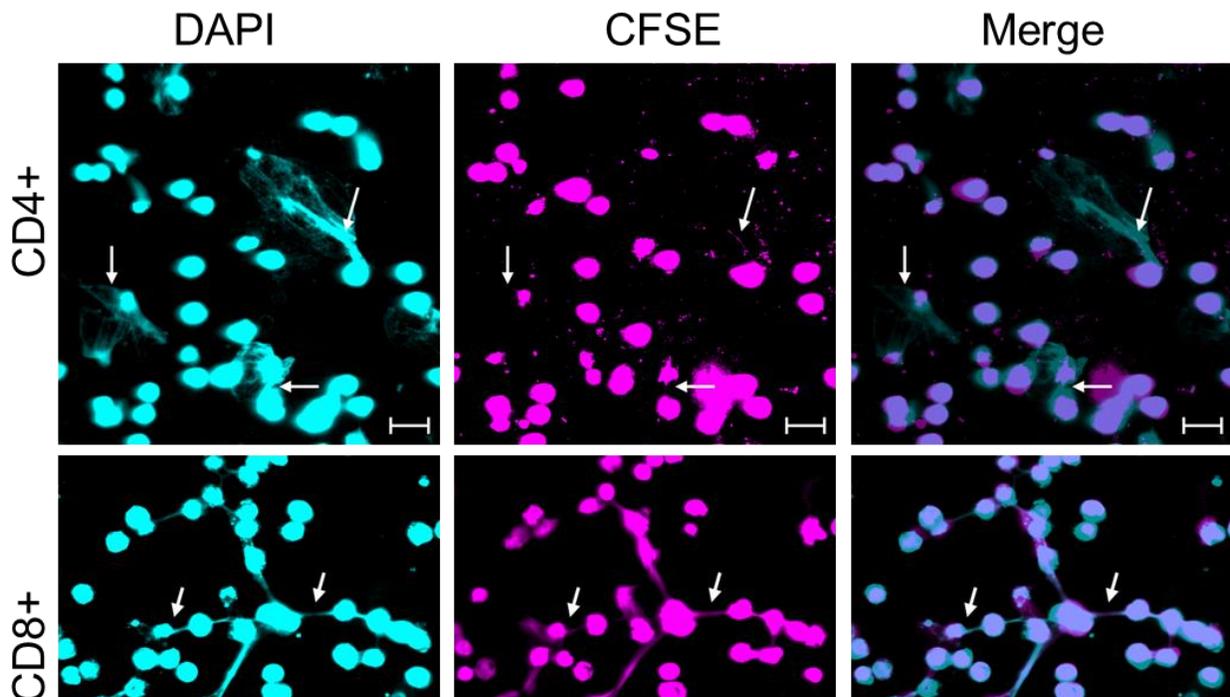


Figura 14: **Redes extracelulares de linfócitos T CD4+ e CD8+ em microscopia confocal.** Avaliação por microscopia confocal de redes extracelulares produzidas por linfócitos T CD4+ e CD8+ após 24h de estímulo com anti-CD3/CD28 através da marcação com CFSE (rosa – conteúdo citoplasmático) e DAPI (DNA- em azul). Setas evidenciam a presença de redes extracelulares de DNA.

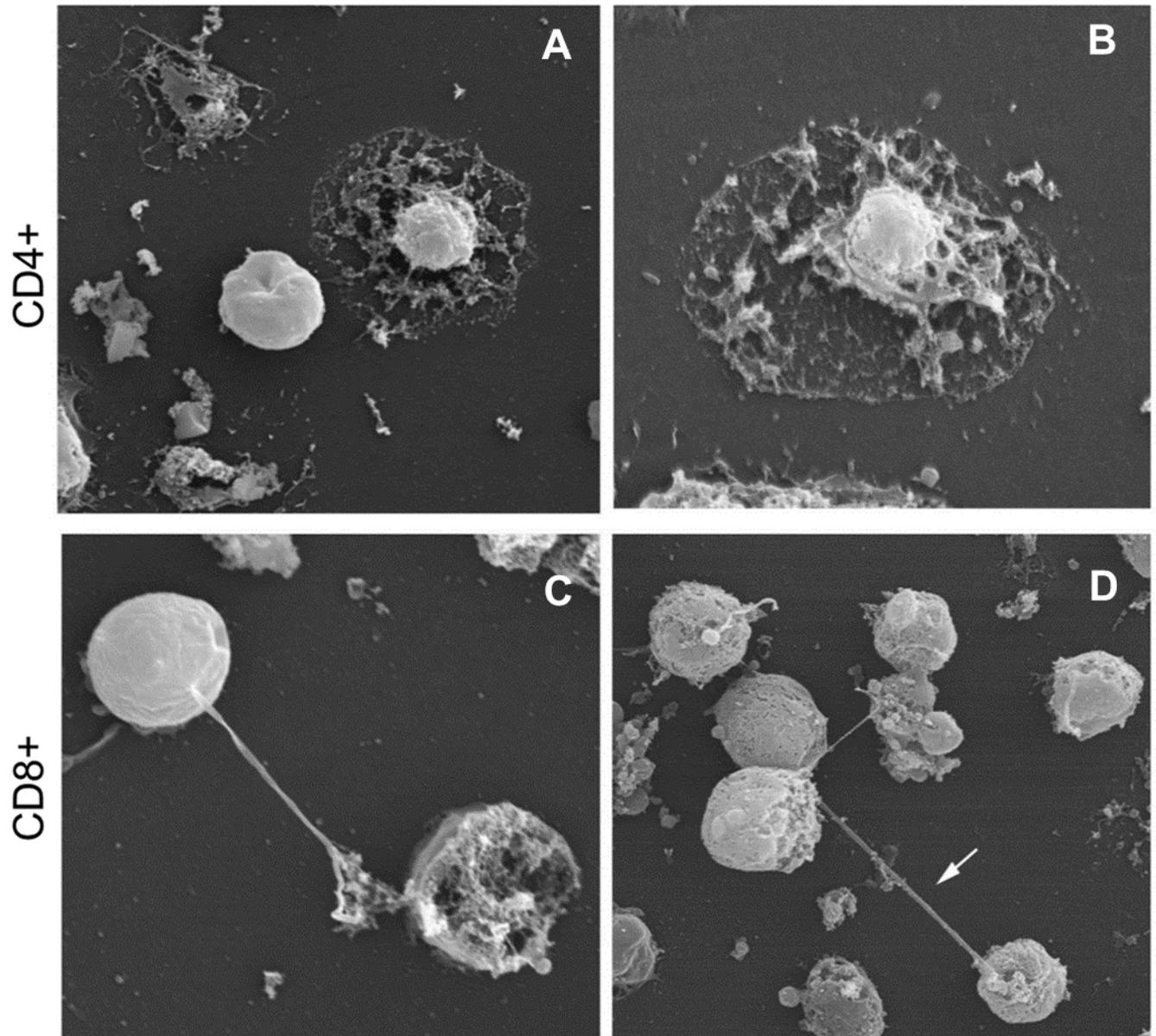


Figura 15: **Avaliação por MEV de linfócitos T CD4+ e CD8+.** Avaliação por microscopia eletrônica de varredura de culturas de linfócitos T purificadas em CD4 e CD8 e estimuladas com anti-CD3/CD28 por 48h. Seta indica a presença de rede extracelular. A e B são referentes a células CD4 purificadas e estimuladas com anti-CD3/CD28. C e D são referentes a culturas purificadas de linfócitos T CD8 estimuladas com anti-CD3/CD28.

Após a separação das subpopulações de linfócitos T, e o estímulo com anti-CD3/CD28 por 48 horas, avaliou-se a ocorrência de redes extracelulares por microscopia eletrônica de varredura. Na figura 15 é possível observar que culturas das células CD4+ e CD8+ parecem apresentar morfologias diferentes. As células T CD4+ parecem estar

envoltas por “nuvens” dispersas enquanto as células T CD8+ parecem liberar estruturas conectando uma célula a outra (seta), como de fato sugerido pelos resultados de microscopia confocal.

Caracterização da rede produzida por linfócitos T CD8+

Para determinar a frequência de morte celular nas culturas de células purificadas, realizou-se a marcação com anexina V e Pi, como descrito anteriormente. Na figura 16 estão demonstrados os resultados da avaliação da frequência de morte total, de células em necrose ou apoptose tardia (anexina V+ e Pi-) e células em necrose (anexina V- e Pi+). A morte celular total consiste na soma das porcentagens de células apenas anexina V + (apoptose), anexina V+ e Pi- (apoptose tardia ou necrose) e apenas Pi+ (necrose). Observando-se os gráficos é possível dizer que tanto linfócitos T CD4+ quanto CD8+ após serem induzidos à necrose apresentam um aumento na frequência de células em morte total quando comparado aos demais grupos. Além disso, foi possível observar que células CD4+ estimuladas apresentam uma porcentagem maior de células anexina V+ e Pi+ quando comparado ao grupo cultivado apenas no meio de cultura (meio). Esse resultado não é observado em linfócitos T CD8+.

Com o objetivo de avaliar a expressão de moléculas importantes relacionadas à ativação celular, como o CD69, e relacionadas a morte celular, como TNF- α , culturas estimuladas com anti-CD3/CD28 foram submetidas à marcação com anticorpos anti-CD69 e anti-TNF- α e lidas em citômetro de fluxo, conforme descrito na metodologia. Na figura 17, em A e B, é possível observar que após o estímulo, células CD4+ apresentaram um aumento de CD69 e um claro aumento da expressão de TNF- α embora não seja

estatístico. Já linfócitos T CD8+, apresentaram um aumento representativo embora não estatístico tanto da ativação celular quanto da expressão de TNF- α .

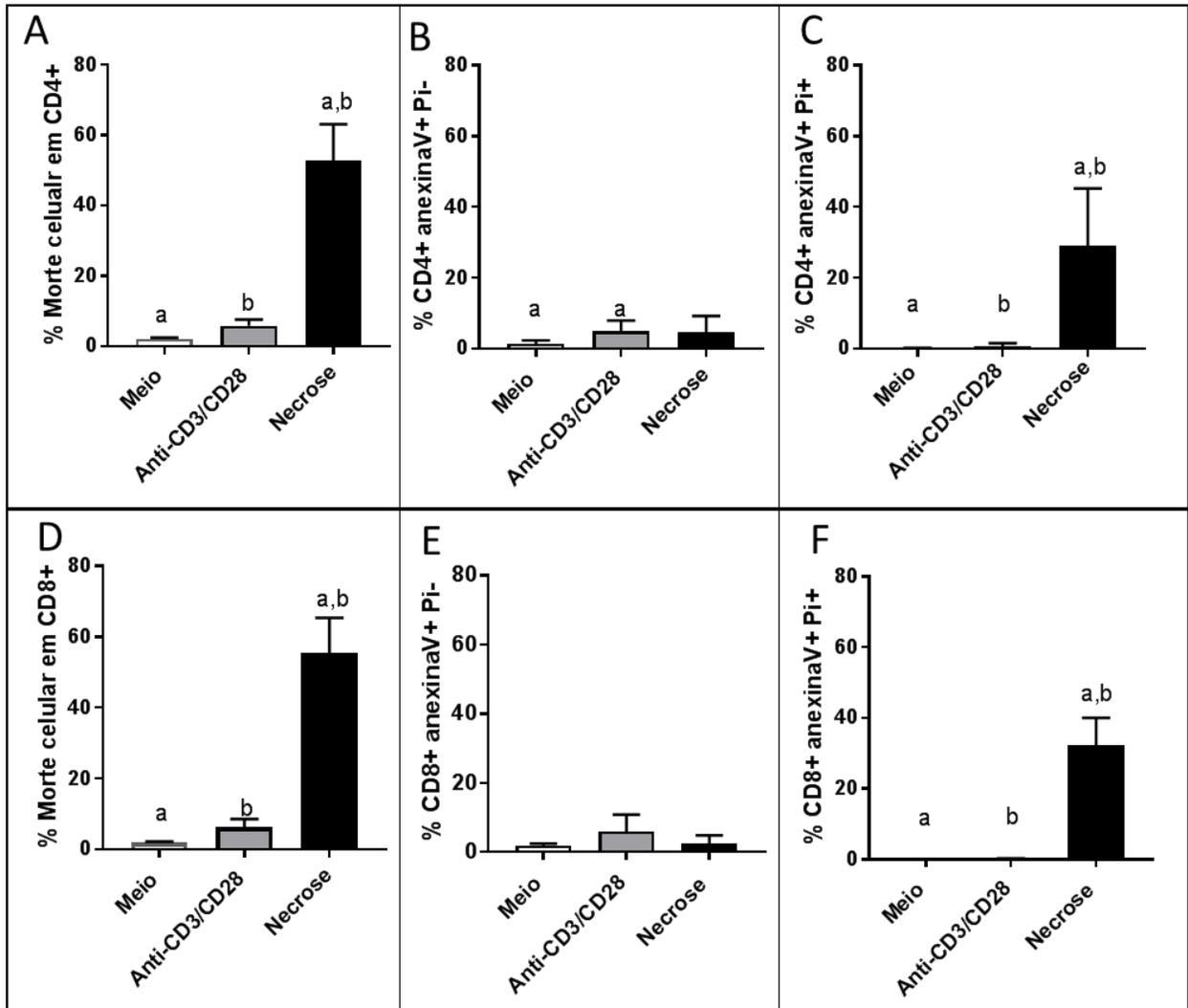


Figura 16: **Avaliação da porcentagem de morte celular por citometria de fluxo de linfócitos T CD4+ e CD8+.** Após separar as CMSP, estimular com anti-CD3/CD28 ou induzir as células à necrose, foi realizada a marcação com anexina V e iodeto de propídeo (Pi) anti-CD4 e anti-CD8 após 24 horas de cultura. Os gráficos A, B e C são relativos às análises em linfócitos T CD4 e os gráficos D, E e F relativos aos linfócitos T CD8. Porcentagem de morte totais em linfócitos foi feita através da soma de células apenas anexina V positivas, apenas Pi positivas e as células duplo positivas para esses marcadores). Em A e D, foi avaliada a frequência de morte total em linfócitos CD4 (A) e CD8 (D). As células positivas apenas para anexina V (gráficos B e E) é características de células em apoptose, enquanto as positivas apenas para Pi (gráficos C e F) é características de necrose. Letras iguais = estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Granzimas e perforina são moléculas citotóxicas importantes nesse contexto de morte celular (RUSSELL; LEY, 2002). São moléculas exocitadas em vesículas recobertas com LAMP (ESKELINEN; TANAKA; SAFTIG, 2003; LIU et al., 2009; MITTENDORF et al., 2005). Utilizar anticorpo anti-LAMP (CD107a) conjugado a um fluorocromo em culturas de células é uma estratégia para avaliar o potencial citotóxico das subpopulações de linfócitos T. Dessa forma, através de citometria de fluxo foi possível observar, na figura 18, que há uma elevada expressão de CD107 em células T CD8+, mesmo antes do estímulo, e que esta expressão é bastante elevada comparando-se com a observada em células T CD4+.

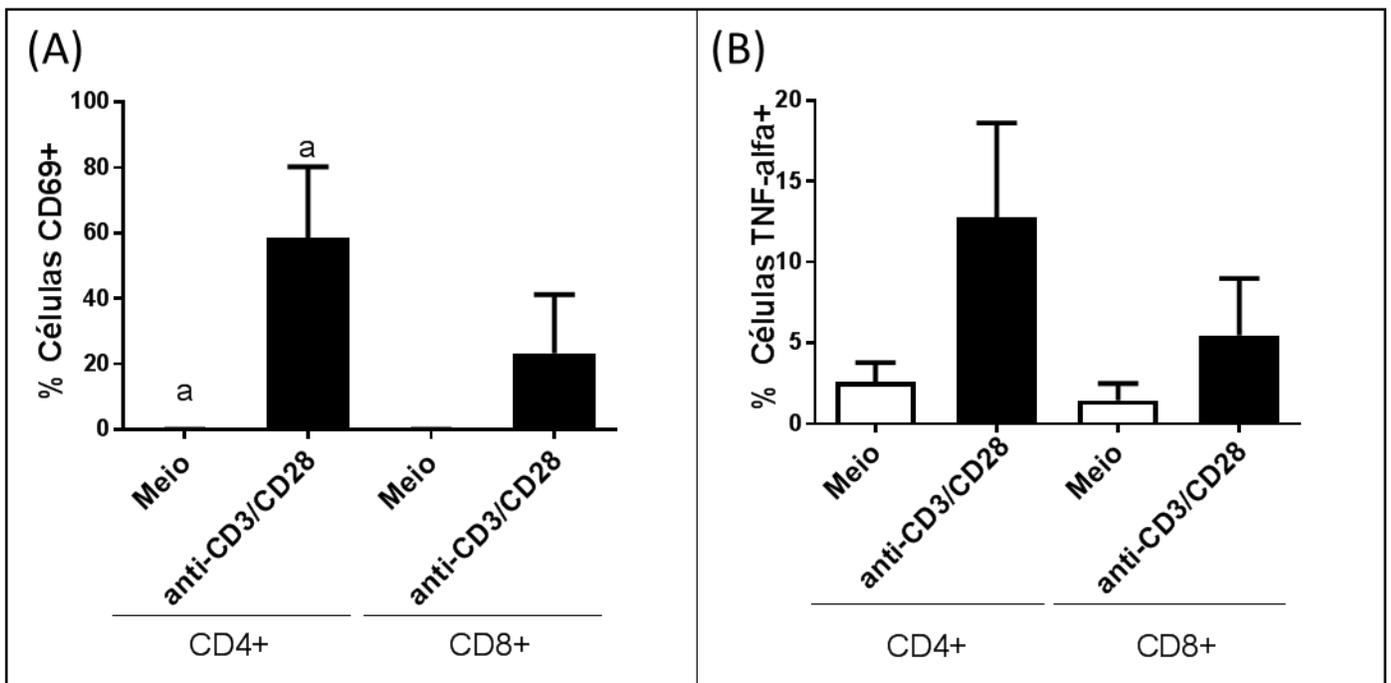


Figura 17: **Avaliação da ativação celular e produção de TNF-alfa+**. (A) Frequência de células expressando CD69 (marcador de ativação) e (B) frequência de células produzindo TNF por linfócitos T CD4+ e CD8+ antes e após estimulação com anti-CD3/anti-CD28. Os dados são apresentados como média por grupo \pm erro padrão da média e a presença das mesmas letras em diferentes barras representa diferenças estatisticamente significantes entre elas ($p < 0,05$).

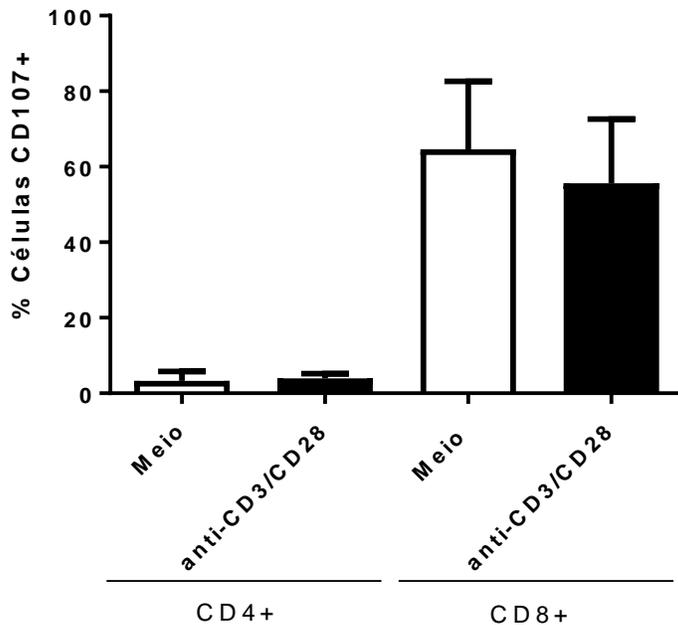


Figura 18 **Avaliação por citometria de fluxo da frequência de células CD107+**. Frequência de células CD4+ e CD8+ expressando CD107 antes e depois da estimulação com anti-CD3/CD28. A presença das mesmas letras em diferentes barras representa diferenças estatisticamente significantes entre elas ($p < 0,001$). Os dados são apresentados como média por grupo \pm erro padrão da média.

Tendo em vista que a ocorrência de vesículas CD107+ está associada a linfócitos T CD8+, propusemo-nos a avaliar se vesículas CD107+ estariam associadas a redes extracelulares derivadas de linfócitos T CD8+. Para isso, realizou-se a marcação por imunofluorescência utilizando anticorpos anti-CD8, anti-CD107 e corante DAPI que cora DNA. Através de microscopia confocal observa-se, na figura 19, que os linfócitos T CD8+ (amarelo) eram capazes de liberar redes extracelulares de DNA (azul) e que, nessas estruturas, estavam presentes vesículas citotóxicas CD107+ (rosa), evidenciadas nas setas.

Após a observação da ocorrência de vesículas CD107+ em redes extracelulares de DNA liberadas por linfócitos T CD8+ na microscopia confocal, propusemo-nos a

avaliar, por microscopia eletrônica de varredura, a associação entre a ocorrência de ETs e morte celular. Para isso, culturas de linfócitos CD8+ purificados por *sorting* foram estimuladas com anti-CD3/CD28 e, na figura 20, é possível observar que associada à rede extracelular existe uma célula com a membrana celular característica de uma célula viva, e outra com a topografia celular característica de uma célula morta.

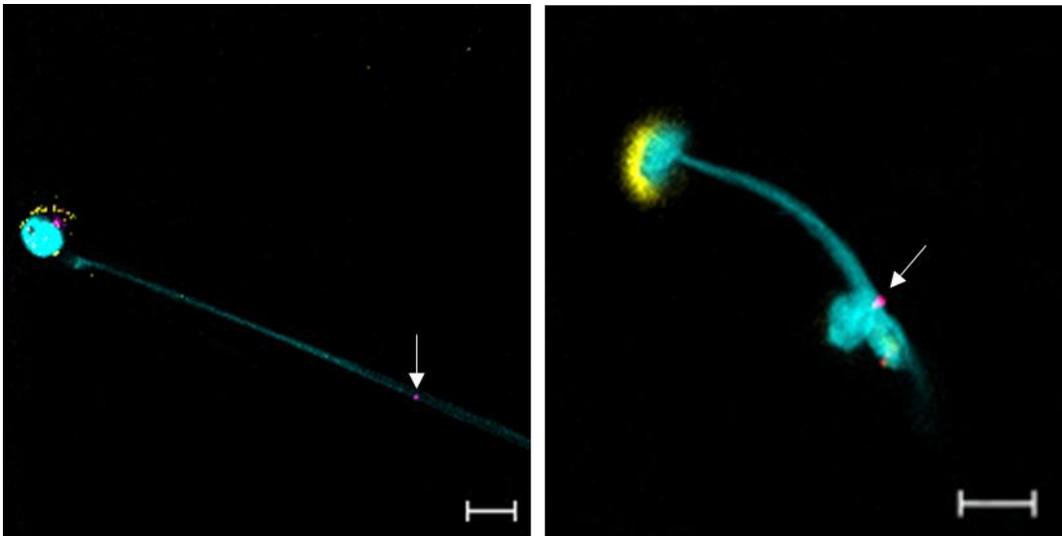


Figura 19: **Imunofluorescência de células CD8+, LETs e CD107.** Imagem de imunofluorescência representativa de culturas enriquecidas com linfócitos T coradas com anti-CD8 (amarelo), anti-CD107 (rosa), DAPI (azul claro). A seta indica vesículas CD107+ colocalizadas com a armadilha extracelular (DAPI). Barras = 10µm.

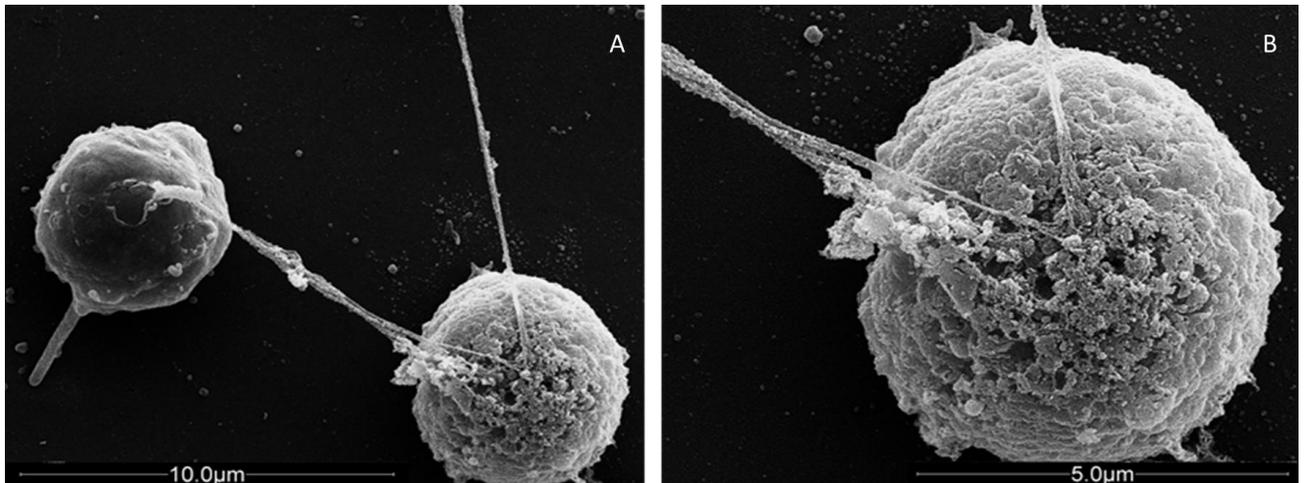


Figura 20: **MET de cultura purificada de Linfócitos T CD8+ após 48h de estímulo.** Através da microscopia eletrônica de varredura de uma cultura purificada de linfócitos T CD8, observam-se estruturas conectando uma célula a outra, e morfologia diferentes entre as células (A). Em B observa-se uma célula em detalhe com a morfologia típica de uma célula em morte. O tamanho das barras está indicado na imagem.

4.3. Redes extracelulares de DNA e Leishmaniose tegumentar americana (LTA)

Avaliação da frequência de Linfócitos T em lesões de pacientes com LTA através de imunofluorescência

Tendo em vista a demonstração por diversas técnicas que linfócitos T são capazes de liberar redes extracelulares de DNA (LETs) propusemo-nos investigar a ocorrência de LETs em lesões de pacientes com leishmaniose tegumentar americana. Para isso, avaliou-se a frequência de células mononucleares, polimorfonucleares, de neutrófilos e eosinófilos através da coloração com hematoxilina e eosina e a avaliação por microscopia ótica. Na figura 21 é possível observar que quase 100% das células presentes nas lesões de pacientes com leishmaniose tegumentar americana são mononucleares, enquanto os outros tipos celulares avaliados apresentam uma frequência próxima de zero. Por imunofluorescência e microscopia confocal, avaliou-se a presença de células mononucleares CD68+ (macrófagos residentes) e linfócitos T (CD4+ e CD8+) nas lesões de pacientes com as formas cutânea (inicial e tardia) e mucosa da leishmaniose tegumentar americana. Na figura 22, é possível observar que aproximadamente 1/3 das

células mononucleares são CD68+, 1/3 CD4+ e 1/3 CD8+, tanto em lesões de pacientes com leishmaniose cutânea, inicial ou tardia, ou com a forma mucosa. Ainda como parte deste trabalho, avaliou-se a frequência de células T CD4+, CD8+ e CD68+ em pacientes com LC antes e após o tratamento com pentoxifilina associada ao antimônio. Estes resultados estão apresentados no anexo 1.

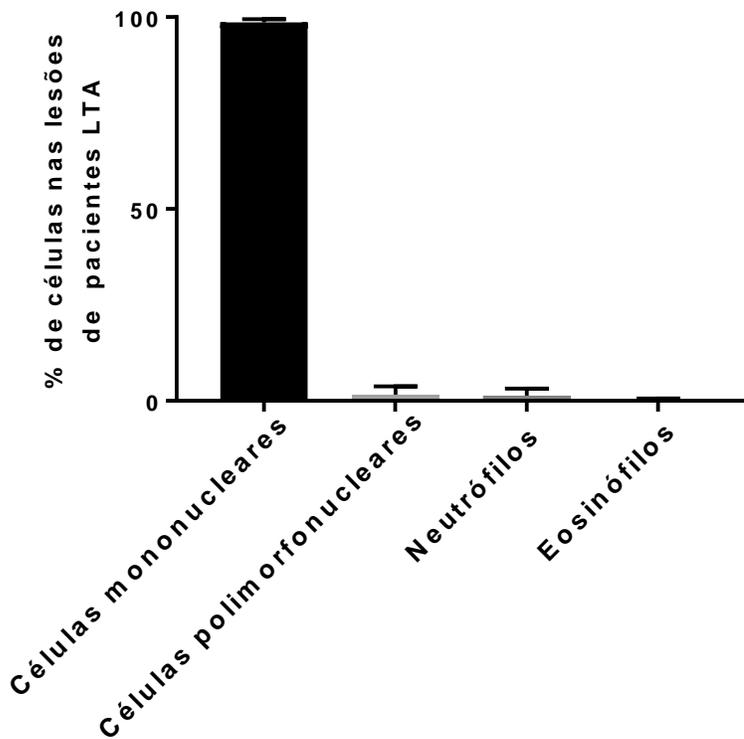


Figura 21: Avaliação da composição celular de lesões de pacientes por meio de análise histopatológica por coloração de hematoxilina/eosina.

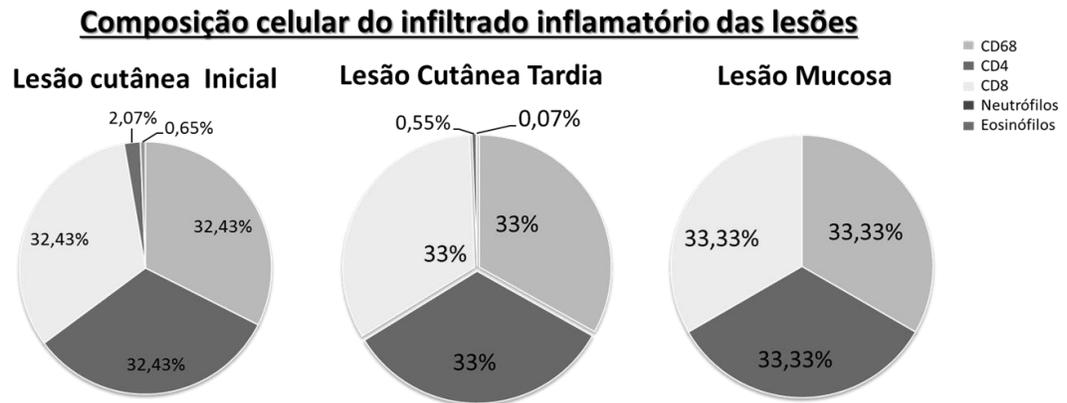


Figura 22: **Avaliação da composição celular de lesões de pacientes com LTA** por meio de microscopia confocal com anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD68 como descrito em Materiais e Métodos.

Avaliação da presença de redes extracelulares em lesões de pacientes com a forma cutânea e mucosa de LTA utilizando-se coloração histoquímica específica para DNA e histonas.

Aproximadamente 2/3 das células presentes nas lesões são de linfócitos T. Dessa forma, nos perguntamos se existia a presença de redes extracelulares nessas lesões. Como uma primeira investigação decidiu-se por corar as lesões de pacientes com a forma cutânea da doença com o corante DAPI (azul) e avaliar por microscopia confocal se existiam estruturas compatíveis com as ETs. Na figura 23, é possível observar, de forma representativa, a ocorrência dessas estruturas (setas) em 3 pacientes distintos (P1, P2 e

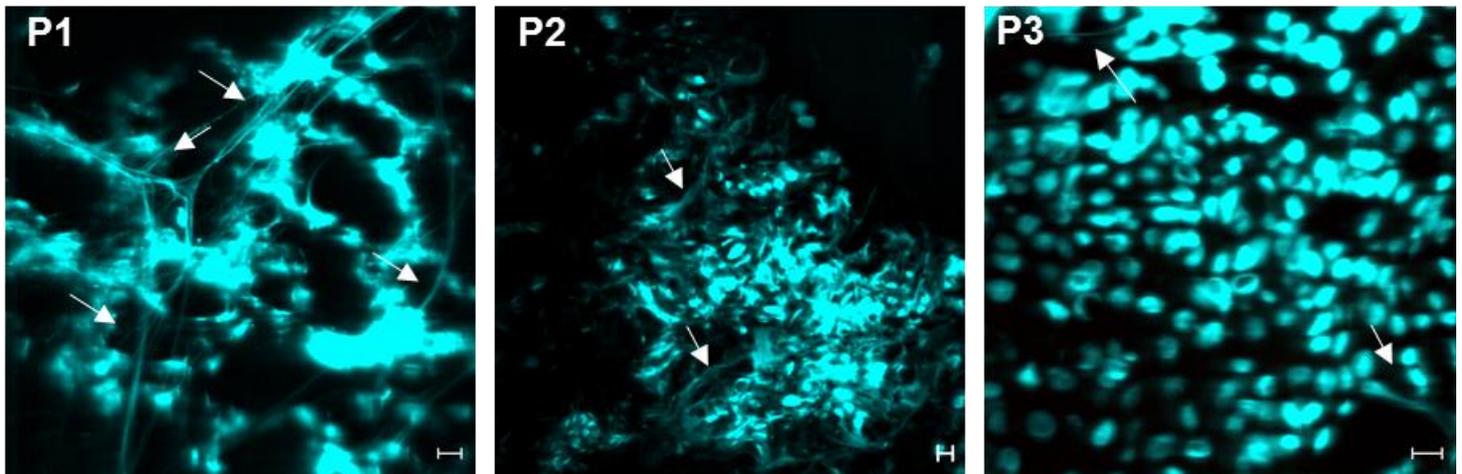


Figura 23 : **Avaliação por microscopia confocal de ETs em lesões de pacientes da forma cutânea da LTA.** Secções de tecido congeladas foram coradas com DAPI como descrito em Materiais e Métodos e adquiridas por microscopia confocal. Imagens representativas da ocorrência de estruturas extracelulares compostas por DNA (positivas para DAPI- azul- (setas)) em lesões de pacientes com leishmaniose cutânea. P1, P2 e P3 representam três pacientes diferentes. Barras = 10µm.

P3). Na figura 24, é possível observar a coloração com DAPI (azul) e com a marcação com anti-histona (verde) em lesões provenientes de pacientes com as formas cutânea e mucosa da LTA. Nas imagens é possível observar (nas setas) a presença de estruturas extracelulares afiladas coradas evidenciando a presença de histona e DNA. Nas imagens em detalhe é possível observar, nas setas, as estruturas coradas com esses dois componentes ao mesmo tempo.

Após observar a ocorrência de estruturas extracelulares de DNA + histona, decidiu-se avaliar se linfócitos T CD8 eram capazes de liberar essas estruturas nas lesões de pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa da LTA. Para isso, através de imunofluorescência realizou-se a coloração com DAPI (azul), anti-CD8 (amarelo) e anti-CD107 (rosa). Na figura 25 é possível observar a presença de células CD8+CD107+ emitindo redes extracelulares (setas) tanto em lesões de pacientes com a forma cutânea (A) e mucosa (B) da LTA.

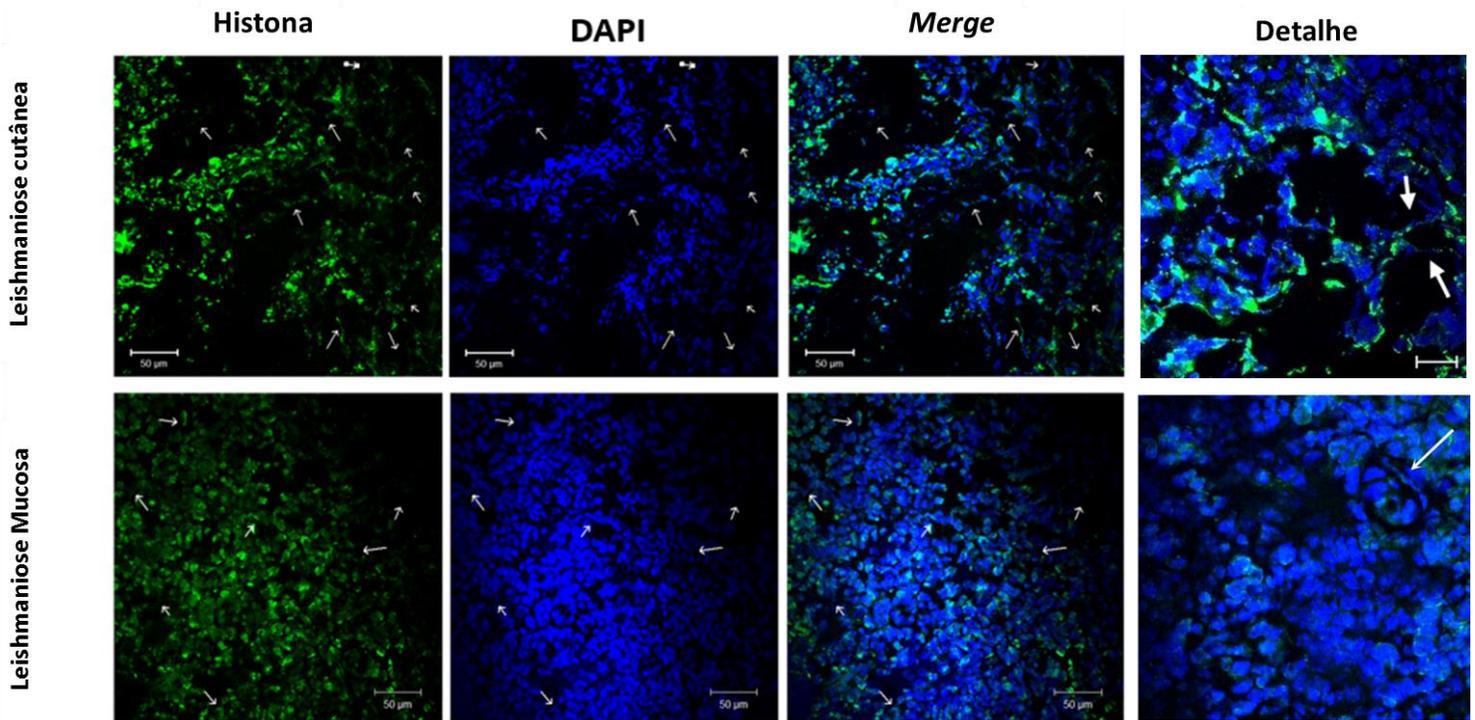


Figura 24: Avaliação por microscopia confocal da ocorrência de redes extracelulares em lesões cutâneas e mucosas de pacientes com leishmaniose tegumentar americana. Secções de tecido congeladas foram coradas como descrito em Materiais e Métodos e adquiridas por microscopia confocal. DNA marcado com DAPI (azul) e anti-histona (verde). Setas evidenciam a ocorrência de redes extracelulares. A sobreposição das imagens está demonstrada na coluna “merge”. Barras = 50µm. Imagens representativas

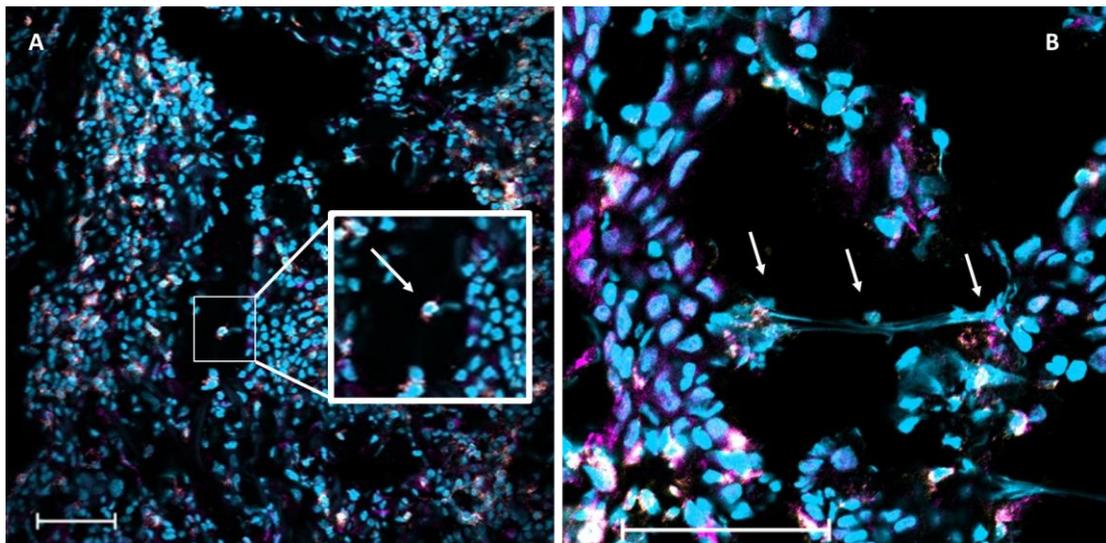


Figura 25: Avaliação, por microscopia confocal, da ocorrência de redes extracelulares de DNA em lesões de pacientes com a forma cutânea (A) e mucosa (B) da LTA. Secções de tecido congeladas foram coradas como descrito em Materiais e Métodos e adquiridas por microscopia confocal. Foi realizada a marcação com DAPI (azul), anti-CD8 (amarelo) e anti-CD107 (rosa). Setas = redes liberadas por Linfócitos T CD8+CD107+. Letra A é correspondente a um corte da lesão de paciente com a forma cutânea da LTA e a B referente àquela com a forma mucosa da doença. Barras = 50µm. Imagens representativas.

Avaliação, *in vitro*, da interação do parasito com as redes extracelulares de DNA de linfócitos.

Após demonstrar a ocorrência de redes extracelulares em lesões de pacientes com leishmaniose, avaliou-se se os sobrenadantes de culturas estimuladas com anti-CD3/CD28, onde observaram-se as redes, eram capazes de interferir no crescimento de *Leishmania amazonensis*. Para isso, coletou-se o sobrenadante das culturas controle, estimuladas com anti-CD3/CD28, induzidas à necrose e de células lisadas. Estes sobrenadantes foram então colocados na cultura de *L. amazonensis*. Posteriormente, foi realizada a contagem das leishmanias durante 11 dias para avaliar a curva de crescimento do parasito. Como controle nesse experimento, cultivaram-se os parasitos apenas com meio, ou seja, sem a presença de DNA de qualquer fonte estudada.

Para avaliar se o DNA proveniente dos grupos estimulados com antiCD3/CD28, necrose e lise apresentava função leishmanicida, calculamos o Δ total parasitos liberados no grupo de estudo menos total parasitos liberados no grupo controle. Os valores do grupo “meio” são valores brutos uma vez que foi um grupo controle de crescimento dos parasitos. Observando a figura 26, foi possível concluir que as redes originadas de linfócitos T não são capazes de interferir no crescimento do parasito, seja favorecendo seja controlando seu crescimento.

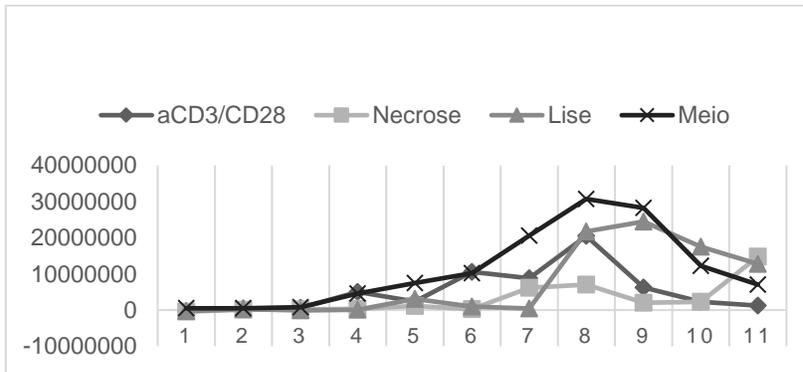


Figura 24: **Curva de crescimento da *Leishmania amazonensis*** após entrar em contato com os sobrenadantes de culturas não estimuladas (controle) e estimuladas com anti-CD3/CD28 (aCD3/CD28) por 24 horas. Além disso, foram utilizadas sobrenadantes de culturas que foram induzidas à necrose (necrose) ou sobrenadante de células lisadas (lise). Como controle negativo foi utilizado apenas meio de cultura sem a presença de DNA proveniente de células em morte celular (meio). No eixo X, foi contabilizado os dias que foram contados os parasitos na câmara de Neubauer e no eixo Y está expresso o número de parasitos contados nos grupos avaliados (aCD3/CD28, Necrose, Lise) menos a quantificação encontrada no grupo controle.

Com o objetivo de avaliar se o parasito é capaz de aumentar ou reduzir a produção de rede, realizou-se uma cocultura de *Leishmania braziliensis* com linfócitos T, na presença e ausência do estímulo anti-CD3/CD28 e foi possível observar que a *Leishmania braziliensis* não é capaz de interferir na produção ou manutenção das redes extracelulares como observado na figura 27. Além disso, utilizou-se o *T. cruzi* como controle para verificar se o que acontece com a cocultura de *Leishmania* ocorria também com outro integrante da família Trypanosomatidae, como o *T. cruzi*. De forma curiosa, observa-se que o *T. cruzi* foi capaz de reduzir a quantificação de DNA no sobrenadante das culturas.

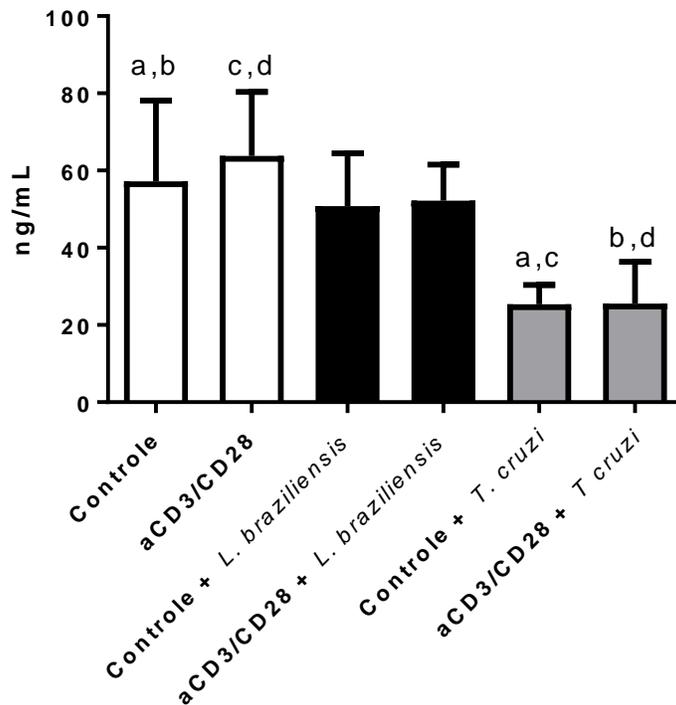


Figura 25: **Dosagem de DNA nos sobrenadantes das culturas expostas a *Leishmania braziliensis* e ao *Trypanosoma cruzi*.** Após realizar a cocultura das células e dos parasitos por 24 horas, o sobrenadante foi recolhido e armazenado para posterior quantificação de DNA conforme descrito na seção materiais e métodos. Culturas não estimuladas e estimuladas apenas com anti-CD3/CD28 foram utilizadas como controles. Letras iguais indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$).

5. Discussão

Brinkmann e colaboradores (BRINKMANN et al., 2004) demonstraram pela primeira vez que as ETs eram compostas principalmente de DNA e histonas. Outros autores também caracterizaram ETs produzidas por células diferentes dos neutrófilos como eosinófilos, mastócitos e macrófagos tendo a mesma constituição básica de DNA (CHOW et al., 2010; GOLDMANN et al., 2008; GOLDMANN; MEDINA, 2012; MUNIZ et al., 2018). Foi demonstrado, no presente estudo, que as estruturas liberadas pelos linfócitos estimulados são compatíveis com redes extracelulares, uma vez que: (1) elas têm estrutura e diâmetro semelhantes à de um filamento de DNA, como demonstrado por MEV; (2) tratamento com DNase elimina as estruturas observadas em MEV; (3) eles coram com anticorpos DAPI, PI e anti-histona, e (4) os sobrenadantes das culturas contêm DNA medido pelo *PicoGreen*. Assim, passaremos a nos referir a estas estruturas como LETs (de "*lymphocyte extracellular traps*"), em analogia às ETs.

A fim de demonstrar a capacidade das células T de produzirem ETs (*extracellular traps*), realizou-se uma série de estudos utilizando-se células de indivíduos saudáveis. Para realizar os estudos utilizando cultura enriquecida em linfócitos, separaram-se as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) por gradiente de densidade, seguida de aderência de monócitos em placas de 6 poços. Para avaliar a pureza dessa cultura enriquecida, utilizaram-se anticorpos anti-CD14, anti-CD19, anti-CD4 e anti-CD8 conjugados a fluorocromos e foi avaliada por citometria de fluxo a frequência das populações celulares expressando estes marcadores. Decidiu-se pela utilização desses marcadores pois, através da marcação para CD14 é possível avaliar a porcentagem de, principalmente, monócitos (alta expressão) e granulócitos (baixa expressão), CD19

demonstra a porcentagem de linfócitos B, enquanto anticorpos anti-CD4 e CD8 permitem avaliar a porcentagem dessas subpopulações de linfócitos T nas quais temos interesse. Os resultados na figura 5 mostraram que a porcentagem de células CD14 e CD19 positivas são baixas, sendo que a maioria das células presentes nas culturas após a aderência são linfócitos T, sobretudo CD4 e CD8. É possível que nessas culturas estivessem presentes os linfócitos T CD4-CD8-, não identificados pelas marcações utilizadas. Sabe-se que a frequência dessas células no sangue periférico de indivíduos saudáveis é extremamente baixa, podendo aumentar em determinadas doenças (ANTONELLI et al., 2006; PASSOS et al., 2017; VILLANI et al., 2010). No entanto, devido ao enriquecimento, é possível que estas células estivessem presentes em maiores concentrações. Outros estudos serão realizados com foco nas células T CD4-CD8-, uma população especial de linfócitos. Estes experimentos demonstraram o enriquecimento das culturas para linfócitos CD4+ e CD8+, que compuseram aproximadamente 60% das células nas culturas. Este fato é relevante, uma vez que pretendeu-se avaliar a produção de ETs por linfócitos. Por se tratar de uma cultura enriquecida, decidiu-se utilizar um estímulo que seja específico para estimular linfócitos T e, nesse caso, utilizou-se uma combinação de anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD28 (AZUMA et al., 1993; BOUR-JORDAN; BLUESTONE, 2009).

Uma questão importante foi demonstrar que a liberação de DNA não estava relacionada à necrose, o que poderia ser um fator de confusão relacionado à etose (HOPPENBROUWERS et al., 2017; YANG et al., 2016). Para excluir essa hipótese, primeiro foi demonstrado que a morte celular, particularmente a necrose, era extremamente baixa nas culturas estimuladas como pode ser observada na figura 6. A

utilização do anticorpo anexina V e o corante iodeto de propídeo (Pi) é uma estratégia utilizada para diferenciar a apoptose e a necrose por citometria de fluxo. Células apenas anexina V positivas são células em apoptose; células apenas Pi⁺ estão em necrose, enquanto as duplamente marcadas estão em necrose ou apoptose secundária. Utilizando-se essa estratégia, observou-se que o grupo que foi induzido à necrose apresentou uma quantidade maior de células na análise de morte celular total, de células anexina V⁺ e Pi⁻ e apenas Pi⁺, demonstrando que de fato a nossa estratégia para induzir células à necrose foi bem-sucedida. A análise de morte total consistiu em somar a frequência de células anexina V⁺, anexina V⁺ e Pi⁺ e apenas Pi⁺. O uso da estaurosporina foi um controle positivo de morte celular, em especial, de apoptose. Nas culturas estimuladas, a expressão de anexina V e Pi foi extremamente baixa, indicando que necrose e apoptose não foram fenômenos frequentes. Estes dados corroboram outros da literatura que mostram que o estímulo com anti-CD3/anti-CD28 não induz morte em linfócitos normais (NOEL et al., 1996). Destaca-se ainda o reduzido tempo de cultura utilizado.

Após obter uma cultura enriquecida em linfócitos, utilizar um estímulo específico, e obter por aquecimento (56°C por uma hora) uma cultura contendo células com características de células em necrose, foi decidido avaliar por microscopia confocal se após o estímulo, havia DNA do lado de fora das células. Para detectar a presença de DNA extracelular foram utilizados o DAPI e o iodeto de propídeo (PI), que são agentes intercalantes de DNA, e também usados em outros estudos para mostrar a presença de DNA em ETs (HOPPENBROUWERS et al., 2017). Na figura 7 é possível observar cultura sem estímulo, culturas estimuladas com anti-CD3/CD28 e induzidas à necrose e outras

coradas com DAPI (azul) e Pi (vermelho). É possível observar que todas as culturas apresentam estruturas (seta) do lado de fora da célula que estão coradas com corantes específicos para DNA. As redes extracelulares apresentam o DNA como eixo principal da estrutura (BRINKMANN et al., 2004; BRINKMANN; ZYCHLINSKY, 2012). Embora essas estruturas (setas) ocorram em todos os grupos, visualmente pareciam ocorrer mais no grupo estimulado. Dessa forma, quantificaram-se essas estruturas presentes nos grupos e, para isso, foi contabilizada a ocorrência das estruturas. Como essas estruturas parecem partir e conectar uma célula a outra, avaliou-se também a quantidade de células envolvidas com essas redes extracelulares.

Na figura 8 estão demonstradas as quantificações em forma de gráfico de barra. Foi possível observar que o grupo que foi estimulado apresentava 2,5 vezes mais estruturas do que o grupo controle e ainda, é estatisticamente diferente do grupo de células em que foi induzida a necrose. Da mesma forma, o grupo estimulado apresentou uma quantidade maior de células envolvidas na liberação do DNA do que os demais grupos. Esses dados sugerem que, ao estimular culturas enriquecidas em linfócitos com anti-CD3/CD28, as células apresentam uma liberação maior de DNA, assim como mais células são envolvidas nesse processo em relação tanto a culturas não estimuladas, como induzidas à necrose. Esses dados acrescentaram evidências de que a liberação de DNA pelas culturas enriquecidas com linfócitos T foi resultado de etose e não de necrose. Uma observação interessante é que, enquanto o anti-CD3/CD28 estimula todas as células T (NOEL et al., 1996), nem todas as células nas culturas liberam DNA. As características das células T liberadoras de DNA após estímulo com anti-CD3/CD28 permanecem por determinar. É possível que essas estruturas sejam liberadas apenas

por células T pré-ativadas, ou por um subconjunto de células de memória. De fato, sabe-se que células pré-ativadas e de memória respondem mais vigorosamente a estímulos *in vitro* (DASGUPTA; SAXENA, 2012; GROSSMAN et al., 2004; LEMIEUX et al., 2016). Nossos estudos também já demonstraram que células pré-ativadas *in vivo*, como resultado de infecção parasitária, por exemplo, respondem mais ao estímulo com anti-CD3/CD28 do que células de indivíduos saudáveis (GOLLOB et al., 2004). Mais estudos para caracterizar melhor as células T liberadoras de DNA estão em andamento no laboratório.

Além disso, foi avaliada a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante das culturas. A LDH está presente no citoplasma de células saudáveis e, quando estas entram em necrose, ocorre o rompimento da membrana celular e conseqüentemente o extravasamento da enzima para o meio externo (CHAN; MORIWAKI; DE ROSA, 2013; DEATH et al., 2018). Na figura 9 foi possível observar que a LDH foi significativamente menor no sobrenadante de culturas estimuladas com anti-CD3/CD28 em comparação com os grupos de células induzidas à necrose e células lisadas (-70° por uma hora). Observou-se também que as culturas estimuladas com anti-CD3/CD28 apresentam uma maior liberação de DNA do que as culturas induzidas à necrose. Além disso, o tratamento com DNase I diminuiu a quantificação de DNA nos sobrenadantes de culturas, confirmando que o DNA coletado no sobrenadante da cultura era DNA de fita dupla, como mostrado anteriormente em outros modelos de etose (GUIMARAES-COSTA et al., 2009; SCHORN et al., 2012). Além disso, a quantificação de DNA é uma metodologia bem estabelecida para a quantificação de redes extracelulares no sobrenadante de culturas (BRINKMANN et al., 2010; DE BUHR et al.,

2016). A célula em necrose é capaz de ativar uma DNase intracelular que é capaz de clivar o próprio DNA, o que justifica a baixa quantificação do DNA liberado na necrose (KOYAMA et al., 2016).

Após obtermos uma série de evidências que linfócitos são células capazes de liberarem redes extracelulares, buscamos caracterizar, de forma mais específica, estas estruturas. Para isso, avaliou-se, por microscopia confocal, a ocorrência de estruturas de DNA associadas às histonas. Já foi demonstrado que a colocalização dessas duas marcações do lado de fora das células está associada à presença de ETs (BRINKMANN et al., 2004; YOUSEFI et al., 2008). Na figura 10 é possível observar linfócitos corados com DAPI (azul) e anticorpo anti-histona (amarelo), evidenciando a presença dessas estruturas no núcleo celular. Além disso, observa-se que as estruturas extracelulares se coram por ambas as marcações, além de ser possível ver a sobreposição dessas duas marcações. Este resultado confirmou que as estruturas extracelulares eram compostas de DNA e histonas, fortalecendo a hipótese de que sejam ETs. Porém, precisávamos excluir a possibilidade dessas estruturas conterem DNA e histonas, mas serem citonemas e não ETs.

Os citonemas ou "tunneling nanotubes" (TNT's) são estruturas compostas basicamente por actina, recentemente descritas como envolvidas na comunicação célula-célula (ONFELT et al., 2006; RUSTOM, 2004; STANGANELLO; SCHOLPP, 2016). Para avaliar se as estruturas observadas eram ou não TNTs, através de microscopia confocal foi avaliada a presença de filamentos de actina nas redes extracelulares. Na figura 11 demonstrou-se claramente que: (1) actina está presente no citoesqueleto celular, como esperado, e (2) actina, corada pela faloidina (vermelho), não está presente nas redes

extracelulares de DNA (DAPI – Azul) uma vez que não houve colocação de coloração de actina e DNA, excluindo a possibilidade de que as estruturas que observamos fossem TNTs ou citonemas (ONFELT et al., 2006; RUSTOM, 2004; STANGANELLO; SCHOLPP, 2016).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma das estratégias utilizadas para visualizar as ETs (DE BUHR et al., 2016). Esta metodologia permite avaliar a topologia da célula ou de estruturas celulares, com alta magnificação e resolução. Avaliando-se células das diferentes culturas por MEV (figura 12), é possível observar que as preparações de células estimuladas apresentam estruturas compatíveis com redes extracelulares, e que parecem conectar uma célula a outra. Embora estas estruturas tenham sido visualizadas em preparações de culturas não estimuladas, ocorreram em muito menor frequência, corroborando nossos resultados anteriores. Ainda foi possível observar que a utilização da DNase I (figura 12 D, E, F) desfaz aquelas estruturas antes visualizadas demonstrando mais uma vez que essas estruturas são formadas por DNA. A MEV (figura 12 G, H, I) mostrou também que as células presentes nessas culturas apresentam morfologias diferentes, sendo que a imagem G demonstra uma célula não ativada, a H apresenta uma morfologia de uma célula ativada, e a I demonstra uma célula que aparenta estar em necrose. Isso mostra claras diferenças entre culturas estimuladas e de necrose: o grupo de necrose tinha uma membrana celular degradada, típica de uma célula necrótica (PADANILAM, 2003), enquanto a célula ativada tinha uma membrana “encrespada” e uma aparência saudável (PADANILAM, 2003; ZHANG et al., 1998). Também utilizando MEV, foi possível medir a espessura dos filamentos individualizados das ETs, que exibem um diâmetro médio de 14,7nm, como mostrado na imagem J da

figura 12, o que é compatível com a fita de DNA. Em 2004, Brinkmann e colaboradores demonstram que as redes consistiam em filamentos finos de aproximadamente 17nm. Urban et al descreveram que provavelmente esse diâmetro é compatível com nucleossomos empilhados e modificados. Dessa forma, esses achados reforçam o fato de que o observado em nosso estudo é compatível com a estrutura de redes extracelulares e com a de um nucleossomo (BRINKMANN et al., 2004, 2012; URBAN et al., 2009). É importante destacar que a própria técnica de preparo das amostras consiste em uma etapa de deposição de ouro na amostra e essa camada depositada pode variar de local para local de processamento, o que, de forma direta, interfere no diâmetro do filamento.

Diferentemente da MEV, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma abordagem ultraestrutural que permite a visualização de estruturas dentro das células, determinando a morfologia de organelas e componentes subcelulares. A análise da morfologia interna, avaliada por MET, mostrou, na figura 13 A, que as células sem estímulo apresentavam membranas nucleares intactas, com heterocromatina típica e organelas dispersas homoganeamente no citoplasma, enquanto células de cultura ativada, nas quais ETs eram observadas (figura 13 B), apresentaram uma morfologia semelhante à observada nas células em etose (FUCHS et al., 2007a), com ausência da membrana nuclear e com organelas deslocadas para um dos polos da célula.

Através de microscopia confocal (DNA- DAPI/Pi e Histona), quantificação de DNA no sobrenadante das culturas, MEV e MET foi possível demonstrar que células presentes em culturas enriquecidas em linfócitos T são capazes de liberar redes extracelulares de DNA, especialmente após o estímulo com anti-CD3/CD28. Como os linfócitos perfaziam

a maioria dessas culturas, foi avaliado se linfócitos TCD4+ e TCD8+ eram capazes de, isoladamente, liberarem as ETs. Para isso, foi realizada a separação dessas subpopulações por citometria de fluxo (*sorting*), coloração do citoplasma dos linfócitos com CFSE, a adesão das células puras às lamínulas pré-tratadas com poli-L-lisina, e a estimulação com anti-CD3/CD28 por 24 ou 48 horas. A pureza das culturas de células CD4+ e CD8+ foi de 90-95%.

A análise por microscopia confocal de culturas de células T CD4+ e CD8+ (figura 14) purificadas mostrou que ambas as subpopulações de células T foram capazes de liberar estruturas coradas com o CFSE após estimuladas com anti-CD3/CD28. ETs são compostas principalmente de DNA, mas também contêm proteínas citoplasmáticas, como mostrado em estudos de imunofluorescência e proteômica. Na descrição do evento em 2004, foi demonstrada por imunofluorescência a ocorrência de redes formadas por DNA, histona e elastase. Posteriormente outros trabalhos foram feitos e demonstraram a presença de outras proteínas, inclusive aquelas presentes em grânulos de neutrófilos como mieloperoxidase, lisozima C e catalase, nas redes extracelulares (BRINKMANN et al., 2004; DOSTER et al., 2018; URBAN et al., 2009). De forma interessante, em 2018, Doster e colaboradores publicaram uma revisão sobre as redes extracelulares de DNA liberadas por macrófagos. Nesse compilado de estudos, foi demonstrado que a composição das redes extracelulares, principalmente associada aos componentes citoplasmáticos, variam entre redes extracelulares de diferentes espécies.

Curiosamente, a análise de MEV das células purificadas estimuladas mostrou (figura 15) que as estruturas extracelulares derivadas de linfócitos CD4+ e CD8+ eram dramaticamente distintas. As estruturas observadas nas culturas de células T CD4+

pareciam com uma “nuvem” ao redor das células, enquanto as das células T CD8+ pareciam conectar uma célula à outra. Este dado interessante nos levou a postular se estas diferentes estruturas provenientes de células CD4+ ou CD8+ eram resultado de processos biológico distintos: talvez o estímulo induzisse diferentes tipos de morte em subpopulações distintas de linfócitos.

Com o objetivo de avaliar a ocorrência de morte celular após o estímulo com anti-CD3/CD28 em culturas de linfócitos T CD4+ e CD8+, foi feita a marcação com anexina V e iodeto de propídio após 24 horas de cultura e fizemos a aquisição de imagens no citômetro de fluxo. Sendo assim, como pode ser observado na figura 16, foi possível destacar que, embora a morte celular total das subpopulações nas culturas tenha sido baixa, a frequência de células T CD4+ em apoptose (anexina+ Pi-) nas culturas estimuladas foi maior do que nas culturas não estimuladas. Além disso, as culturas de CD4 estimuladas produziram altos níveis de TNF como observado na figura 17. Alta produção de TNF já foi associada à morte celular por apoptose e necrose (KIM et al., 2010; VANDENABEELE et al., 2010), o que poderia justificar a ocorrência de apoptose em linfócitos T CD4 após o estímulo. Fato que não foi observado em linfócitos T CD8+. O que é importante destacar é que os resultados observados na figura 15, MEV de CD4+ e CD8+, são de uma cultura de 48 horas, enquanto os da figura 16, obtidos por citometria de fluxo, são de uma cultura de 24 horas sendo assim, é possível que apresente células com tipos mortes celulares diferentes. Além disso, se trata de técnicas diferentes: enquanto a microscopia avalia aspectos morfológicos, a citometria de fluxo permite a avaliação de aspectos bioquímicos relacionados à morte celular.

Os linfócitos T CD8+ são uma subpopulação de linfócitos T e são células da resposta imune adaptativa. São especialmente voltadas para responder a patógenos intracelulares e, embora sejam capazes de produzir citocinas, são conhecidas pela sua função efetora de citotoxicidade, sendo chamadas de linfócitos T citotóxicos (CTLs) ou células T *killer*. Essa função citotóxica envolve a entrega de grânulos contendo moléculas citotóxicas às células alvo (PETERS, 1991). Esses grânulos classicamente expressam marcadores lisossomais, como LAMP-1 (FLESCH et al., 2012; GIRALDO et al., 2011; PETERS, 1991). Os mecanismos de liberação dos grânulos citotóxicos descritos até o momento demonstram que esse processo envolve interação célula a célula (ANIKEEVA; SYKULEV, 2011). Esses grânulos citotóxicos contêm proteínas efetoras como a perforina e granzimas, que criam poros na membrana e celular e induzem as células à apoptose, respectivamente (FAN; ZHANG, 2005). Tendo em vista que demonstramos que linfócitos T CD8+ são células capazes de liberarem LETs e que essas estruturas são também compostas por proteínas citoplasmáticas, hipotetizamos que esses grânulos CD107+ (recobertas por LAMP-1) poderiam estar presentes nas redes extracelulares liberadas por células T CD8+. Para testar essa hipótese, através de citometria de fluxo reafirmou-se de fato a expressão de CD107a é maior em células CD8+ do que CD4+, como observado na figura 18. Posteriormente, foi avaliada a expressão de CD107 em culturas de células T CD8+ estimuladas com anti-CD3/CD28, utilizando microscopia confocal. Nossos dados mostraram, como pode ser observado na figura 19, uma clara colocalização do CD107 com os DAPI + LETs liberados pelas células T CD8+. Além disso, a MEV, figura 20, também mostrou que uma das células conectadas à LET de linfócitos CD8+ exibe uma morfologia consistente com a de uma célula que está morrendo.

Nossos resultados sugerem que a liberação de LETs por células T CD8+ pode apresentar um novo mecanismo de comunicação célula-célula, provavelmente associado à rápida entrega de vesículas citotóxicas CD107 + para células distantes.

Estas descobertas trazem novas perspectivas para a compreensão da citotoxicidade mediada por CD8 e podem ter implicações críticas em mecanismos fisiológicos e patológicos em que a morte celular induzida por CD8 desempenha um papel crítico, como em infecções por patógenos intracelulares e cânceres.

Nosso primeiro indício de que os linfócitos T seriam capazes de liberar ETs veio da observação de imagens coradas com DAPI de lesões de pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa (Koh, 2015). Estudos prévios de Guimarães-Costa em 2009 mostraram que lesões de pacientes infectados por *L. amazonensis* apresentavam ETs (Guimarães-Costa et al. 2009). Sendo assim, decidiu-se avaliar se o mesmo fenômeno ocorria em lesões de pacientes infectados por *L. braziliensis*, que é a principal espécie de *Leishmania* causadora da leishmaniose tegumentar na América Latina.

Estudos prévios do nosso grupo mostraram que lesões de pacientes infectados por *L. braziliensis* apresentam baixas frequências de neutrófilos (FARIA et al., 2005), o que foi confirmado pelos nossos dados (figura 21). Assim, as ETs observadas nas lesões analisadas por nós provavelmente eram provenientes de um tipo celular diferente dos neutrófilos. Cerca de 30% das células presentes no infiltrado inflamatório das lesões eram macrófagos, e já se foi descrito que são células capazes de liberar ETs (CHOW et al., 2010; DOSTER et al., 2018). No entanto, embora não se possa descartar completamente a hipótese de que os ETs vieram dessas células, foi demonstrado neste estudo que as

células T CD4+ e CD8+ compõem a grande maioria do infiltrado celular presente nas lesões analisadas de pacientes (figura 22).

As imagens de lesões de pacientes infectados por *L. braziliensis* foram de fato muito semelhantes àquelas observadas por Guimarães-Costa (Guimarães-Costa et al. 2009), sugerindo que essas estruturas poderiam ser ETs. Para reforçar essa hipótese, após corar as lesões apenas com DAPI (figura 23) realizou-se uma dupla coloração utilizando anticorpos monoclonais anti-histona e DAPI. Observou-se na figura 24 que as estruturas DAPI+ e anti-histona+ se colocam dentro (núcleo) e também fora das células, sugerindo a presença de ETs em lesões de pacientes infectados com *L. braziliensis*. A análise histopatológica das lesões não mostrou necrose extensa, como também mostrado em outros trabalhos (SALDANHA et al., 2017), sugerindo que o DNA extracelular, não foi derivado de necrose mas, sim, de etose.

Observou-se então, nesse estudo, que: (1) 2/3 das células do infiltrado inflamatório nas lesões de pacientes com LTA eram linfócitos T; (2) que existiam estruturas demonstrando a ocorrência de redes extracelulares (DNA+histonas); (3) que linfócitos T são células capazes de fazer etose. Sendo assim, decidiu-se avaliar a ocorrência de redes extracelulares provenientes de linfócitos T CD8+, por microscopia confocal, nas lesões de pacientes com a forma cutânea e mucosa da LTA. A figura 25, mostra a ocorrência de redes extracelulares de DNA liberadas por linfócitos T CD8+ e CD107+. Esse achado corrobora com os nossos dados apresentados de que células T CD8+ *in vitro* são capazes de produzir redes extracelulares de DNA. A demonstração, *in vivo*, é muito importante pois abre novas perspectivas de estudos para compreender o

desenvolvimento e manutenção da lesão em LC e LM. A avaliação da frequência de células CD8+CD107 liberando LETs está sendo realizada.

Tem sido demonstrado que as ETs podem induzir a inflamação e também participar da eliminação de parasitas (Guimarães-Costa et al. 2009; de Buhr et al. 2018). Além disso, as ETs derivadas principalmente de neutrófilos estão associadas à patogênese de várias doenças autoimunes, bem como à vasculopatia associada ao câncer e à diabetes (BEREZIN, 2018; KIM et al., 2018; ROMERO et al., 2013). Já foi descrito que as ETs estão associadas à resposta inflamatória ou ao controle parasitário na leishmaniose humana. Entretanto, mais estudos precisam ser feitos em relação à infecção por *L. braziliensis* e às redes extracelulares. Futuros estudos utilizando células de indivíduos infectados por *L. braziliensis* serão realizados. O que é de particular interesse, pois as células T CD8+ desempenham um papel importante na progressão da lesão na leishmaniose humana (CARDOSO et al., 2015; FARIA et al., 2009; NOVAIS et al., 2018).

Tendo em vista que as NETs são capazes de eliminar *L. amazonensis*, principalmente pela função leishmanicida atribuída às histonas (Guimarães-Costa et al. 2009), avaliou-se a possibilidade de as LETs possuírem essa mesma função. Para isso, os parasitos foram colocados, durante 30min, em contato com o sobrenadante de culturas controle, de culturas em que as células foram estimuladas com anti-CD3/CD28 e de culturas induzidas à necrose ou lisadas. Nesse experimento, as leishmanias foram cultivadas em meio sem nenhum DNA como controle do crescimento do parasito. Observou-se que houve crescimento/multiplicação da *L. amazonensis* independentemente do contato com o DNA presente nos sobrenadantes utilizados (figura

26). O trabalho de Guimarães-Costa demonstrou que os parasitos expostos às NETs não apresentavam crescimento/multiplicação da cultura, sendo possível concluir que essas redes os levavam à morte. Nossos dados não corroboram com os descritos na literatura (GUIMARAES-COSTA et al., 2009), entretanto, no trabalho de Guimarães-Costa a *Leishmania* foi colocada junto ao neutrófilo enquanto este liberava as NETs. Nesse estudo não fica claro se a liberação de alguma outra molécula leishmanicida foi avaliada. Não é possível excluir a possibilidade dos sobrenadantes utilizados em nossos experimentos conterem outras moléculas capazes de interferir no crescimento da *Leishmania*. Entretanto, por se tratar de células diferentes, o neutrófilo e o linfócito, uma da resposta imune inata e outra da resposta imune adquirida, acredita-se que esse seja um ponto chave para explicar essa diferença de resultados.

Sabendo-se que as LETs não interferem no crescimento e multiplicação de *L. amazonensis*, avaliou-se se o parasito era capaz de interferir na produção de LETs. Para isso, decidiu-se utilizar a *L. braziliensis* pois é a espécie responsável pela infecção na área de Corte de Pedra (BA) cujas lesões dos pacientes dessa área endêmica apresentam cerca de 2/3 de linfócitos (fig 22) Na figura 25, demonstrou-se que a *L. braziliensis* não foi capaz de alterar a liberação de LETs nas coculturas de linfócitos e parasito. De forma interessante, as coculturas de células e *T. cruzi* apresentaram uma quantificação menor de DNA no sobrenadante da cultura.

Já foi descrito que diversas espécies de leishmanias expressam a enzima 3'-nucleotidase/nuclease (3'NT/NU), que é capaz de atuar como uma fosfodiesterase, realizando a quebra da ligação do 3' com 5" de nucleotídeos adjacentes. Esses achados já foram associados a diversas espécies de *Leishmania*, inclusive a *L. braziliensis*

(DEBRABANT; BASTIEN; DWYER, 2001; VIEIRA et al., 2011). De forma interessante, é descrito na literatura que as lesões de pacientes com a forma cutânea e mucosa da LTA possuem uma quantidade muito baixa ou virtual de parasitos (PEDRAL-SAMPAIO et al., 2016). Sendo assim, é compreensível que as LETs não interfiram na multiplicação do parasito, e que esses não interfiram na liberação das redes. Sendo assim, mais estudos serão feitos a fim de demonstrar qual é o estímulo presente nas lesões dos pacientes com LTA para que se observe a ocorrência das LETs.

O *Trypanosoma cruzi*, diferentemente da *Leishmania*, possui uma fase marcante de alta parasitemia. A fase aguda da doença de chagas é marcada por uma alta parasitemia (LARANJA, 1953) e, por isso, ocorre a coexistência entre o parasito e os linfócitos durante um período da doença. Já foi descrito, por especulação, que o *T. cruzi* possui a 3'-Nucleotidase/Nuclease (DEBRABANT; BASTIEN; DWYER, 2001) e que por essa razão poderia realizar a quebra das LETs, sendo esse um possível mecanismo de escape. Outra hipótese é que os parasitos sejam capazes de regular a liberação de redes extracelulares de linfócitos. Mais estudos serão feitos para entender melhor essa relação do *T. cruzi* com as LETs.

Nossos estudos demonstram inequivocamente, por diversas técnicas, que os linfócitos T CD4+ e CD8+ humanos liberam redes extracelulares (ETs) morfologicamente distintas na estimulação. É importante ressaltar que os ETs das células T CD8+ formam filamentos de DNA longos conectando uma célula a outra, contendo vesículas CD107+. Isto sugere que a liberação de ETs por linfócitos T CD8+ pode ser um mecanismo de liberação de vesículas citotóxicas para alvos distantes. Nossos achados, além de caracterizarem a ocorrência de armadilhas extracelulares derivadas de linfócitos T

(LETs), trazem novos insights sobre mecanismos de função efetora de células T CD8+. Além disso, nós demonstramos a ocorrência, *in vivo*, de LETs provenientes de Linfócitos T CD8+ em lesões de LC e LM, e que na LTA, redes provenientes de linfócitos T parecem estar mais associadas à manutenção da inflamação na lesão que à eliminação da Leishmania. Este trabalho abre perspectivas para maiores estudos sobre o papel das LETs na leishmaniose e em outras doenças humanas.

6. Conclusões

Através de nossos estudos é possível concluir que:

Culturas enriquecidas em linfócitos são capazes de liberar ETs;

Linfócitos T CD4+ e CD8+ com 24 horas de cultura produzem redes extracelulares morfológicamente distintas e que essas redes são compostas por DNA e componentes citoplasmáticos.;

Linfócitos T CD4+ e CD8+ parecem ter desfechos distintos relacionados à morte celular. Células CD4+ parecem estar em necrose enquanto as CD8+ parecem emitir redes extracelulares que conectam uma célula à outra;

Linfócitos T CD8+ emitem LETs com vesículas CD107+ em sua estrutura, sugerindo um novo mecanismo de entrega de grânulos líticos a alvos distantes;

Existe a ocorrência de LETs em lesões de pacientes com LC e LM, e essas LETs são derivadas de células CD8+ e contém vesículas CD107+;

Leishmania braziliensis não é capaz de interferir na produção de LETs e essas estruturas também não são capazes de alterar o crescimento e multiplicação do parasito;

7. Referências

- ABI ABDALLAH, D. S.; DENKERS, E. Y. Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. DEC, p. 1–6, 2012.
- ALMEIDA, R. P. et al. RIBEIRO-DE-JESUS et al 1998 - CYTOKINE PROFILE AND PATHOLOGY IN HUMAN LEISHMANIASIS.pdf. v. 31, p. 143–148, 1998.
- ALTINCICEK, B. et al. Host-Derived Extracellular Nucleic Acids Enhance Innate Immune Responses, Induce Coagulation, and Prolong Survival upon Infection in Insects. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 4, p. 2705–2712, 15 Aug. 2014.
- ANIKEEVA, N.; SYKULEV, Y. Mechanisms controlling granule-mediated cytolytic activity of cytotoxic T lymphocytes. **Immunologic Research**, v. 51, n. 2–3, p. 183–194, 2011.
- ANTONELLI, L. R. V et al. Disparate Immunoregulatory Potentials for Double-Negative (CD4⁺ CD8⁻) and CD8⁺ T Cells from Human Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **J. Invest. Dermatol.** v. 74, n. 11, p. 6317–6323, 2006.
- AVERHOFF, P. et al. Single Residue Determines the Specificity of Neutrophil Elastase for Shigella Virulence Factors. **Journal of Molecular Biology**, v. 377, n. 4, p. 1053–1066, 2008.
- AZUMA, M. et al. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. **Nature**, v. 366, n. 6450, p. 76–79, 4 Nov. 1993.
- BARTNECK, M. et al. Phagocytosis independent extracellular nanoparticle clearance by human immune cells. **Nano Letters**, v. 10, n. 1, p. 59–64, 13 Jan. 2010.
- BERENDS, E. T. M. et al. Nuclease expression by Staphylococcus aureus facilitates escape from neutrophil extracellular traps. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 6, p. 576–586, 2010.
- BEREZIN, A. Neutrophil extracellular traps: The core player in vascular complications of diabetes mellitus. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, p. 1–7, 2018.
- BETTS, M. R. et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. **Journal of Immunological Methods**, v. 281, n. 1–2, p. 65–78, 2003.
- BETTS, M. R.; KOUP, R. A. Detection of T-Cell Degranulation: CD107a and b. **Methods in Cell Biology**, v. 75, p. 497–512, 2004.
- BIANCHI, M. et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. **Blood**, v. 114, n. 13, p. 2619–2622, 2009.
- BIANCHI, M. et al. Restoration of anti-Aspergillus defense by neutrophil extracellular traps in human chronic granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-dependent. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 5, p. 1243- 1252.e7, 2011.

BIENVENU, A.; GONZALEZ-REY, E.; PICOT, S. Apoptosis induced by parasitic diseases. **Parasites & vectors**, v. 3, p. 106, 2010.

BOLÍVAR, B. E.; VOGEL, T. P.; BOUCHIER-HAYES, L. Inflammatory caspase regulation: Maintaining balance between inflammation and cell death in health and disease. **The FEBS Journal**, n. 11, p. febs.14926, 2019.

BOUR-JORDAN, H.; BLUESTONE, J. A. Regulating the regulators: Costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells. **Immunological Reviews**, v. 229, n. 1, p. 41–66, 2009.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science (New York, N.Y.)**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 2004.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil Extracellular Traps : How to Generate and Visualize Them. **Journal of Visualized Experiments**, n. February, p. 3–5, 2010.

BRINKMANN, V. et al. Automatic quantification of in vitro NET formation. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JAN, p. 1–8, 2012.

BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? **Journal of Cell Biology**, v. 198, n. 5, p. 773–783, 2012.

BROGDEN, G. et al. The effect of β -glucan on formation and functionality of neutrophil extracellular traps in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 44, n. 2, p. 280–285, 2014.

BUCHANAN, J. T. et al. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. **Current Biology**, v. 16, n. 4, p. 396–400, 2006.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. **Leishmaniasis** **The Lancet**, 2018.

CARDOSO, T. M. et al. Protective and pathological functions of CD8+ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 3, p. 898–906, Mar. 2015.

CASTES, M.; AGNELLI, A.; RONDON, A. J. Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. **Clin Exp Immunol**, v. 57, n. 2, p. 279–286, 1984.

CHAN, F. K. M.; MORIWAKI, K.; DE ROSA, M. J. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. **Methods in Molecular Biology**, v. 979, p. 65–70, 2013.

CHOW, O. A. et al. Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps. **Cell Host and Microbe**, v. 8, n. 5, p. 445–454, Nov. 2010.

CHUAMMITRI, P. et al. Chicken heterophil extracellular traps (HETs): Novel defense mechanism of chicken heterophils. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 129, n. 1–2, p. 126–131, 2009.

- CLARK, S. R. et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. **Nature medicine**, v. 13, n. 4, p. 463–9, 2007.
- COHEN, G. M. Caspases : the executioners of apoptosis. **The Biochemical journal**, v. 16, n. Pt 1, p. 1–16, 15 Aug. 1997.
- DA-CRUZ, A. M. et al. Tumor Necrosis Factor- α in Human American Tegumentary Leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 2, p. 225–229, 1996.
- DA SILVA SANTOS, C.; BRODSKYN, C. I. The Role of CD4 and CD8 α T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Public Health**, v. 2, n. September, p. 1–6, 2014.
- DASGUPTA, A.; SAXENA, R. Regulatory T cells: A review. **National Medical Journal of India**, v. 25, n. 6, p. 341–351, 2012.
- DE BUHR, N. et al. How Neutrophil Extracellular Traps Become Visible. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, n. Table 1, 2016.
- DE BUHR, N. et al. Extracellular trap formation in response to *Trypanosoma cruzi* infection in granulocytes isolated from dogs and common opossums, natural reservoir hosts. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–12, 15 May 2018.
- DE LA ROCHE, M.; ASANO, Y.; GRIFFITHS, G. M. **Origins of the cytolytic synapse** *Nature Reviews Immunology* Nature Publishing Group, , 6 Jul. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri.2016.54>>. Acesso em: 8 feb. 2019
- DE OLIVEIRA-NETO, M. P. et al. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: Main clinical and epidemiologic characteristics. **International Journal of Dermatology**, v. 39, n. 7, p. 506–514, 2000.
- DEATH, C. et al. Chapter 9. v. 1709, p. 107–127, 2018.
- DEBRABANT, A.; BASTIEN, P.; DWYER, D. M. A unique surface membrane anchored purine-salvage enzyme is conserved among a group of primitive eukaryotic human pathogens. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 220, n. 1–2, p. 109–116, 2001.
- DOSTER, R. S. et al. **Macrophage Extracellular Traps: A Scoping Review** *Journal of Innate Immunity*, 2018.
- EIGLER, A. et al. Taming TNF: strategies to restrains this Proinflammatory Cytokine. **immunology today**, 1997.
- ESKELINEN, E. L.; TANAKA, Y.; SAFTIG, P. At the acidic edge: Emerging functions for lysosomal membrane proteins. **Trends in Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 137–145, 2003.
- FADEEL, B.; ORRENIUS, S. **Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease** *Journal of Internal Medicine*, Aug. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4561027>>. Acesso em: 14 dec. 2018

FADOK, V. A. et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages Bratton and PM Henson REMOVAL BY MACROPHAGES'. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 148, n. 7, p. 2207–16, 1 Apr. 2010.

FALCONE, L. M. et al. Pentoxifylline as a Treatment for Subcorneal Pustular Dermatitis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, n. 2, p. e12818, 2019.

FAN, Z.; ZHANG, Q. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity. **Cellular & molecular immunology**, v. 2, n. 4, p. 259–64, 2005.

FARIA, D. R. et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 7853–7859, 1 Dec. 2005.

FARIA, D. R. et al. Recruitment of CD8+ T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 432–439, Aug. 2009.

FITZPATRICK, D. R.; WILSON, C. B. Methylation and demethylation in the regulation of genes, cells, and responses in the immune system. **Clinical Immunology**, v. 109, n. 1, p. 37–45, 2003.

FLESCH, I. E. A. A. et al. Linear fidelity in quantification of anti-viral CD8+ T cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e39533, 20 Jun. 2012.

FRÉZARD, F.; MONTE-NETO, R.; REIS, P. G. Antimony transport mechanisms in resistant leishmania parasites. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 1, p. 119–132, 2014.

FUCHS, T. A. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **Journal of Cell Biology**, v. 176, n. 2, p. 231–241, 2007a.

FUCHS, T. A. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **Journal of Cell Biology**, v. 176, n. 2, p. 231–241, 2007b.

GABRIEL, C. et al. Leishmania donovani promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 185, n. 7, p. 4319–4327, 2010.

GERTNER-DARDENNE, J. et al. Lipophilic Fluorochrome Trackers of Membrane Transfers between Immune Cells. **Immunological Investigations**, v. 36, n. 5, p. 665–685, Sep. 2007.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R.; PRESS, D. Leishmaniasis in humans : drug or vaccine therapy ? **Drug design, development and therapy**, v. 12, p. 25–40, Dec. 2018.

GIRALDO, N. A. et al. Increased CD4+/CD8+ double-positive T cells in chronic chagasic patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. e1294, 23 Aug. 2011.

GOLDMANN, O. et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. **Blood**, v. 111, n. 6, p. 3070–3080, 2008.

- GOLDMANN, O.; MEDINA, E. The expanding world of extracellular traps: Not only neutrophils but much more. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JAN, p. 1–10, 2012.
- GOLLOB, K. J. et al. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 136, n. 2, p. 341–348, 2004.
- GROSSMAN, W. J. et al. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 589–601, 5 Feb. 2004.
- GUIMARAES-COSTA, A. B. et al. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 16, p. 6748–6753, 21 Apr. 2009.
- GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. 3'-nucleotidase/nuclease activity allows Leishmania parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 4, p. 1732–1740, 2014.
- HANAUER, S. B. Biologic therapy for inflammatory bowel disease comes of age. **Current Gastroenterology Reports**, v. 10, n. 6, p. 565–567, 2008.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, 2000.
- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, p. 1191–1199, 1999.
- HOPPENBROUWERS, T. et al. In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–29, 2017.
- KIM, J. J. et al. TNF- α -induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-XL. **Cell Death and Differentiation**, v. 17, n. 9, p. 1420–1434, 2010.
- KIM, T. Y. et al. Elevated extracellular trap formation and contact system activation in acute leukemia. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 46, n. 3, p. 379–385, 11 Oct. 2018.
- KO, M. VON et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. **Blood**, v. 111, n. 6, p. 3070–3080, 2008.
- KOH, C. C. Evidências da produção de redes extracelulares por linfócitos T humanos. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências). Pós graduação em Biologia Celular. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.
- KOYAMA, R. et al. DNase γ , DNase I and caspase-activated DNase cooperate to degrade dead cells. **Genes to Cells**, v. 21, n. 11, p. 1150–1163, 2016.
- KROEMER, G.; REED, J. C. **Mitochondrial control of cell death** *Nature Medicine*, 2000.
- KRYSKO, D. V et al. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 205–221, 2008.
- LARANJA, F. S. [Clinical aspects of Chagas' disease]. **Revista brasileira de medicina**, v. 10, n. 7, p. 482–91, Jul. 1953.

- LEMIEUX, J. et al. A global look into human T cell subsets before and after cryopreservation using multiparametric flow cytometry and two-dimensional visualization analysis. **Journal of Immunological Methods**, v. 434, p. 73–82, 2016.
- LESSA, H. A. et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 2, p. 87–89, 1 Aug. 2001.
- LIU, D. et al. Integrin-Dependent Organization and Bidirectional Vesicular Traffic at Cytotoxic Immune Synapses. **Immunity**, v. 31, n. 1, p. 99–109, 2009.
- MAJNO, G.; LA GATTUTA, M.; THOMPSON, T. E. Cellular death and necrosis: Chemical, physical and morphologic changes in rat liver. **Virchows Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin**, v. 333, n. 5, p. 421–465, 1960.
- MARTÍNEZ-LOSTAO, L.; ANEL, A.; PARDO, J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 22, p. 5047–5056, 2015.
- MARTINOD, K. et al. Regular Article PAD4-deficiency does not affect bacteremia in polymicrobial sepsis and ameliorates endotoxemic shock. **Blood journal**, v. 125, n. 12, p. 1948–1957, 2017.
- MASUDA, S. et al. Clinica Chimica Acta NETosis markers : Quest for specific , objective , and quantitative markers. **Clinica Chimica Acta**, v. 459, p. 89–93, 2016.
- MCCORMICK, A. et al. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 12–13, p. 928–936, 2010.
- MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. **Qjm**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.
- METZLER, K. D. et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: Implications for innate immunity. **Blood**, v. 117, n. 3, p. 953–959, 2011.
- MILLER, S. E. Biological Specimen Preparation for Transmission Electron Microscopy . Audrey M. Glauert , Peter R. Lewis. **The Quarterly Review of Biology**, v. 75, n. 1, p. 97–98, 2004.
- MINKO, T.; KOPEČKOVÁ, P.; KOPEČEK, J. Preliminary evaluation of caspases-dependent apoptosis signaling pathways of free and HPMA copolymer-bound doxorubicin in human ovarian carcinoma cells. **Journal of Controlled Release**, v. 71, n. 3, p. 227–237, Apr. 2001.
- MITTENDORF, E. A. et al. Evaluation of the CD107 cytotoxicity assay for the detection of cytolytic CD8+ cells recognizing HER2/neu vaccine peptides. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 92, n. 1, p. 85–93, 2005.
- MIYATA, T.; FAN, X. A second hit for TMA. **Blood**, v. 120, n. 6, p. 1152–1154, 9 Aug. 2012.

MORGAN, M. J.; KIM, Y. S.; LIU, Z. G. TNF α and reactive oxygen species in necrotic cell death. **Cell Research**, v. 18, n. 3, p. 343–349, 2008.

MUNIZ, V. S. et al. Eosinophils release extracellular DNA traps in response to *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 141, n. 2, p. 571- 585.e7, Feb. 2018.

NARASARAJU, T. et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. **American Journal of Pathology**, v. 179, n. 1, p. 199–210, 2011.

NEELI, I. et al. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 3, p. 1895–1902, 2008.

NOEL, P. J. et al. CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation. **The Journal of Immunology**, v. 157, n. 2, p. 636–642, 15 Jul. 1996.

NOVAIS, F. O. et al. Cytotoxic T Cells Mediate Pathology and Metastasis in Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 7, 2013.

NOVAIS, F. O. et al. CD8⁺ T Cells Lack Local Signals To Produce IFN- γ in the Skin during *Leishmania* Infection. **The Journal of Immunology**, p. j1701597, 24 Jan. 2018.

ONFELT, B. et al. Structurally Distinct Membrane Nanotubes between Human Macrophages Support Long-Distance Vesicular Traffic or Surfing of Bacteria. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 12, p. 8476–8483, 2006.

PADANILAM, B. J. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 284, n. 4, p. F608–F627, 2003.

PASSOS, L. S. A. et al. Specific activation of CD4–CD8– double-negative T cells by *Trypanosoma cruzi*-derived glycolipids induces a proinflammatory profile associated with cardiomyopathy in Chagas patients. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 190, n. 1, p. 122–132, 2017.

PEDRAL-SAMPAIO, G. et al. Detection of IgG Anti-leishmania antigen by flow cytometry as a diagnostic test for cutaneous leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–9, 2016.

PETERS, P. J. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, n. 5, p. 1099–1109, 1 May 1991.

RIBEIRO DE JESUS, A. et al. Pentoxifylline down modulate in vitro T cell responses and attenuate pathology in *Leishmania* and HTLV-I infections. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 10, p. 1344–1353, Oct. 2008.

ROCHA ARRIETA, Y. C. et al. The Lymphocytes Stimulation Induced DNA Release, a Phenomenon Similar to NETosis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 86, n. 4, p. 229–238, Oct. 2017.

- RODRIGO, C. et al. Amphotericin B for treatment of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of prospective comparative clinical studies including dose-ranging studies. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 6, p. 591–598, Jun. 2018.
- ROMERO, V. et al. Immune-mediated pore-forming pathways induce cellular hypercitrullination and generate citrullinated autoantigens in rheumatoid arthritis. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 209, p. 209–150, 2013.
- RUSSELL, J. H.; LEY, T. J. LYMPHOCYTE-MEDIATED CYTOTOXICITY. **Annual Review of Immunology**, v. 20, n. 1, p. 323–370, 2002.
- RUSTOM, A. Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport. **Science**, v. 303, n. 5660, p. 1007–1010, 13 Feb. 2004.
- SALDANHA, M. G. et al. Characterization of the histopathologic features in patients in the early and late phases of cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 3, p. 645–652, 2017.
- SANTOS, C. D. S. et al. CD8+ granzyme B+ -mediated tissue injury vs. CD4 + IFN γ + -mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 6, p. 1533–1540, 2013.
- SCHORN, C. et al. Bonding the foe - NETting neutrophils immobilize the pro-inflammatory monosodium urate crystals. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. DEC, p. 1–6, 2012.
- STANGANELLO, E.; SCHOLPP, S. Role of cytonemes in Wnt transport. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 4, p. 665–672, 15 Feb. 2016.
- SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Investigational drugs for visceral leishmaniasis. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 24, n. 1, p. 43–59, Jan. 2015.
- THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. **Caspases: Enemies within** *Science*, 1998.
- URBAN, C. F. et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, 2009.
- VANDENABEELE, P. et al. The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. **Science Signaling**, v. 3, n. 115, p. re4–re4, 30 Mar. 2010.
- VIEIRA, D. P. et al. *Leishmania chagasi*: An ecto-3'-nucleotidase activity modulated by inorganic phosphate and its possible involvement in parasite-macrophage interaction. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 3, p. 702–707, 2011.
- VILLANI, F. N. A. et al. *Trypanosoma cruzi*-Induced Activation of Functionally Distinct ab and yd CD4- CD8- T Cells in Individuals with Polar Forms of Chagas' Disease. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 10, p. 4421–4430, 2010.
- VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M. et al. Innate immunity turned inside-out : antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 87, n. 8, p. 775–783, Aug. 2009.

- WANG, Y. et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. **Journal of Cell Biology**, v. 184, n. 2, p. 205–213, 2009.
- WARTHA, F. et al. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1162–1171, 2007.
- WEN, F. et al. Extracellular DNA Is Required for Root Tip Resistance to Fungal Infection. **Plant Physiology**, v. 151, n. 2, p. 820–829, 2009.
- WYLLIE, A. H. **Cell Death : The Significance of Apoptosis**. [s.l.: s.n.]. v. 68
- YANG, H. et al. **New insights into neutrophil extracellular traps: Mechanisms of formation and role in inflammation** *Frontiers in Immunology* Nature Publishing Group, , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri.2016.147>>
- YOKOYAMA, W. M.; THOMPSON, M. L.; EHRHARDT, R. O. Cryopreservation and thawing of cells. **Current Protocols in Immunology**, n. SUPPL.99, p. 1–5, 2012.
- YOUSEFI, S. et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. **Nature medicine**, v. 14, n. 9, p. 949–953, 2008.
- ZHANG, C. et al. A cell surface receptor defined by a mAb mediates a unique type of cell death similar to oncosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 11, p. 6290–6295, 1998.