

Carolina Cattoni Koh

**EVIDÊNCIAS DA PRODUÇÃO DE REDES EXTRACELULARES
POR LINFÓCITOS T HUMANOS**

**Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro/2015**

Carolina Cattoni Koh

**EVIDÊNCIAS DA PRODUÇÃO DE REDES EXTRACELULARES POR
LINFÓCITOS T HUMANOS**

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Dr^a Walderez Ornelas Dutra

Co-orientadora: Dr^a Amanda Brito Wardini

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro/2015

LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

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

ORIENTAÇÃO

Orientadora: Dr^a Walderez Ornelas Dutra
Co-orientadora: Dr^a Amanda Brito Wardini

COLABORADORES

Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais.

Laboratório de Biologia das Interações Celulares

- Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti

Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução

- Dr. Helio Chiarini Garcia

Laboratório de Immunobiofotônica

- Dr. Gustavo Batista de Menezes

Programa de Pós-graduação da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte:

- 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

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 a Pesquisa do Estado de Minas Gerais
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais – INCT-DT

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.

Ao Agostinho, por todo o apoio nessa jornada, por toda a atenção e cuidado, por sempre estar disposto a me ajudar e a contribuir.

À Nay por todo o apoio, por me tranquilizar e arrancar inúmeras risadas e muito carinho.

À Lívia, Luísa, Mauricio, Rita, Augusto, Thaís, e especialmente a Bárbara pela disponibilidade em ajudar e a trocar ideias “científicas”.

Ao Rafa por todo carinho, companheirismo e atenção! À prof. Micena por toda preocupação, por ser tão atenciosa e querida.

À prof. Juliana Bastos, por todo carinho, disposição, disponibilidade em ajudar.

Ao centro de aquisição e processamento de imagens – ICB/UFMG, por todo apoio e disponibilidade em ajudar, pelo processamento das imagens para microscopia eletrônica de varredura.

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

À Amanda, que antes de co-orientadora, é uma grande amiga. Obrigada por dividir tantos momentos, me ensinar tantas coisas, por todo o apoio e por, principalmente, confiar em mim e dividir a sua linha de pesquisa comigo.

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.

“Mudam-se os tempos, mudam-se as vontades, muda-se o ser, muda-se a confiança; Todo o mundo é composto de mudança, tomando sempre novas qualidades.”

Luís de Camões

RESUMO

A produção de redes extracelulares foi descrita pela primeira vez em 2004 em neutrófilos, tendo as redes sido denominadas de *neutrophil extracellular traps* (NETs). As redes são compostas por um esqueleto de DNA (nuclear ou mitocondrial) decorado com peptídios antimicrobicidas, proteases e histonas. Outros tipos celulares, como mastócitos, eosinófilos e macrófagos, são capazes de liberar essas estruturas. A liberação dessas redes é chamada de etose. A etose pode ser caracterizada como um novo tipo de morte celular diferente da apoptose e necrose. Entretanto, em alguns casos de liberação da rede, não ocorre a morte da célula. As redes possuem ação microbicida contra alguns agentes como bactérias, fungos, vírus e protozoários. Já se sabe que promastigotas e amastigotas de *Leishmania* são capazes de induzir a liberação de NETs. Além disso, histonas são capazes de matar promastigotas de *Leishmania*. A leishmaniose tem como agente etiológico parasitos do gênero *Leishmania* e é uma doença que afeta milhões de pessoas no mundo. A leishmaniose cutânea (LC), forma mais comum no Brasil, é causada principalmente pela *Leishmania braziliensis* e é a forma mais branda da doença, caracterizada pela presença de úlceras únicas ou lesões nodulares próximas ao local da picada do flebotomíneo que, geralmente, regredem após terapêutica específica. A leishmaniose mucosa (LM), também causada pela *Leishmania braziliensis*, é caracterizada por lesões na mucosa com ausência de manifestações cutâneas. Essa forma clínica é progressiva e destrutiva na ausência de tratamento. Linfócitos T são células importantes e frequentes nas lesões de pacientes com leishmaniose cutânea ou mucosa e fazem parte da resposta imune adaptativa, podendo participar da eliminação dos parasitos nas lesões por mecanismos ainda não completamente esclarecidos, mas que podem envolver citotoxicidade. Por outro lado, este mesmo mecanismo parece ser importante para o desenvolvimento das lesões. Esse estudo tem como objetivo caracterizar a liberação de redes extracelulares de DNA por linfócitos T, usando diferentes técnicas como microscopia eletrônica de varredura, imunofluorescência e quantificação de DNA extracelular. Nossos resultados sugerem que linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ são capazes de liberar redes extracelulares. Essas redes parecem estar presentes nas lesões de pacientes com LC e LM, sugerindo sua contribuição para a eliminação da *Leishmania* e na participação da reatividade inflamatória causadora da lesão. Nosso trabalho é o primeiro a sugerir que linfócitos T humanos sejam capazes de liberar redes extracelulares.

Palavras-Chave: Redes extracelulares, Linfócitos T, Leishmaniose.

ABSTRACT

The release of extracellular traps (ETs) was first described in 2004, in neutrophils, and, thus, the structures were called *neutrophil extracellular traps* (NETs). The extracellular traps are composed of a DNA skeleton (nuclear or mitochondrial) decorated with antimicrobial peptides, proteases and histones. Other cell types, such as mast cells, eosinophils and macrophages, are able to release these structures. The release of ETs is called etosis. Etosis can be characterized as a new type of cell death, different from apoptosis and necrosis. However, in some cases of the trap release, cell death does not occur. It has been shown that ETs have antimicrobial activity against some agents such as bacteria, fungi, viruses and protozoa. It is known that promastigotes and amastigotes of *Leishmania* are capable of inducing the release of NETs. In addition, histones are able to kill *Leishmania* promastigotes. Human infection with parasites of the genus *Leishmania* leads to leishmaniasis, a disease that affects millions of people worldwide. Cutaneous leishmaniasis (CL), the most common form in Brazil, is mainly caused by *Leishmania braziliensis* and is the mildest form of the disease characterized by the presence of one or few skin ulcers or nodular lesions near the site of the bite of the sand fly, which usually resolves after specific therapy. Mucosal leishmaniasis (ML), also caused by *Leishmania braziliensis*, is characterized by lesions in the mucosal tissue with no concomitant cutaneous involvement. This clinical form is progressive and destructive in the absence of treatment. T lymphocytes are important and frequent cells in the lesions of patients with CL and ML, are part of the adaptive immune response, and may participate in the elimination of parasites in the lesions by mechanisms not fully understood, that may involve cytotoxicity. Interestingly, this same mechanism appears to be important for the development of lesions. This study aims to characterize the release of ETs by T lymphocytes, using different techniques such as scanning electron microscopy, immunofluorescence and quantification of extracellular DNA. Our results suggest that CD4⁺ and CD8⁺ T cells can release ETs. These ETs are present in the lesions of patients with CL and ML, suggesting that they can contribute to the elimination of *Leishmania*, but also participate in the inflammatory reactivity that leads to the tissue injury. In addition to providing possible new mechanisms associated with the pathogenesis of leishmaniasis, this work provides the first evidence that T lymphocytes are able to release extracellular traps, which may have implications for several biological activities of these cells.

Keywords: Extracellular traps, T Lymphocytes, Leishmaniasis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da via da Netose.....	5
Figura 2: Ciclo biológico da leishmaniose:	10
Figura 3: Diferentes manifestações clínicas da leishmaniose.....	12
Figura 4: Caracterização de Redes extracelulares em lesão de paciente com LC por microscopia confocal.	25
Figura 5: Caracterização de Redes extracelulares em lesão de paciente com LM por microscopia confocal.	26
Figura 6: Avaliação da pureza da cultura de linfócitos por citometria de fluxo.	27
Figura 7: Caracterização das redes extracelulares em linfócitos totais por microscopia óptica.....	29
Figura 8: Caracterização das redes extracelulares de linfócitos totais por microscopia de imunofluorescência.....	30
Figura 9: Quantificação de DNA no sobrenadante de culturas de linfócitos.	31
Figura 10: Avaliação da pureza da separação de linfócitos T por citometria de fluxo	32
Figura 11: Caracterização das redes extracelulares de linfócitos T CD4 ⁺ por microscopia de imunofluorescência..	34
Figura 12: Caracterização das redes extracelulares de linfócitos T CD4 ⁺ por microscopia eletrônica de varredura..	35
Figura 13: Quantificação de DNA no sobrenadante de culturas de linfócitos T CD4 ⁺ . 36	
Figura 14: Caracterização das redes extracelulares de linfócitos T CD8 ⁺ por microscopia de imunofluorescência.	38
Figura 15: Caracterização das redes extracelulares de linfócitos T CD8 ⁺ por microscopia de imunofluorescência..	39
Figura 16: Caracterização das redes extracelulares de linfócitos T CD8 ⁺ por microscopia eletrônica de varredura..	40
Figura 17: Quantificação de DNA no sobrenadante de culturas de linfócitos T CD8 ⁺ . 42	

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs: Células apresentadoras de antígeno
BSA: Albumina de soro bovino
Ca²⁺: Íon Cálcio
CaCl₂: Cloreto de cálcio
CD: *Cluster of differentiation*
CO₂: Dióxido de carbono
CFSE: *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*
CMSP: Células mononucleares de sangue periférico
CTLA-4: Proteína citotóxica associada ao linfócito TCD4
DAG: Diacilglicerol
DAPI: *4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride*
DMEM: Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DNA: Ácido desoxirribonucleico
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
EETs: *Eosinophils extracellular traps*
ETs: *Extracellular traps*
FITC: *Fluorescein Isothiocyanate* (Isotiocianato de Fluoresceína)
GrA: Granzima A
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
HIF 1a: *Hypoxia-inducible factor-1 alpha*
ICB: Instituto de Ciências Biológicas
IL-1β: Interleucina 1 Beta
IL-2: Interleucina 2
IL-4: Interleucina 4
IL-5: Interleucina 5
IL-8: Interleucina 8
IL-10: Interleucina 10
IL-13: Interleucina 13
IL-17: Interleucina 17
IL-23: Interleucina 23
IFN-γ: Interferon gama
LC: Leishmaniose cutânea
LM: Leishmaniose Mucosa
LMC: Leishmaniose mucocutânea
LPS: Lipopolissacarídeo
LTA: Leishmaniose tegumentar americana
LV: Leishmaniose visceral
MCs: Mastócitos
MCETs: *Mast Cells extracellular traps*
METs: *Macrophage extracellular traps*
MHC: Complexo principal de histocompatibilidade
MPO: Mieloperoxidase
MS: ministério da saúde
n: Número amostral
NaCl: Cloreto de Sódio
NADPH: *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*
NaOH: Hidróxido de Sódio

NETs: *Neutrophils extracellular traps*
OsO₄: Tetróxido de ósmio
PAD-4: *peptilarginina deaminase 4*
PBS: Tampão salina-fosfato
PMA: acetado de forbol miristato
PE: Ficoeritrina
PI: Iodeto de propídio
PKC: Proteína C cinase
ROS: Espécies reativas de oxigênio
SEB: enterotoxina B de *Staphilococcus aureus*
SES-MG: Secretaria estadual de saúde de Minas Gerais
TCR: Receptor de células T
TNF: Fator de necrose tumoral
TGF-beta: Fator de transformação do crescimento-beta
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
x: vezes
Who: *World Health Organization*

Sumário

1. Redes Extracelulares.....	3
2. Leishmanioses - Aspectos gerais.....	8
3. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....	11
Objetivo Geral.....	17
Objetivos Específicos.....	17
Metodologia.....	18
1. Separação e cultura de CMSP (Células mononucleares do sangue periférico).18	
2. Marcação com CFSE (ou CFDA-SE - carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester).....	18
3. Purificação celular em coluna magnética de linfócitos T CD8 ⁺ e T CD4 ⁺ de sangue periférico de indivíduos saudáveis.....	19
4. Separação de Linfócitos T CD8 ⁺ e T CD4 ⁺ por citometria de fluxo (sorting):	19
5. Coloração pela técnica de panótico.....	20
6. Reações de imunofluorescência em lesões de paciente.....	20
7. Reações de imunofluorescência em cultura enriquecidas com linfócitos T aderidas às lamínulas.....	21
8. Microscopia eletrônica de varredura.....	22
9. Quantificação de DNA.....	22
10. Citometria de CMSP (células mononucleares do sangue periférico).....	23
11. Análise estatística.....	23
Resultados.....	24
1. Caracterização das redes extracelulares em lesões de pacientes com LTA	24
2. Avaliação da liberação de redes extracelulares por linfócitos purificados do sangue periférico de indivíduos saudáveis	27
2.1. Avaliação da pureza dos linfócitos utilizados nos ensaios para análise da produção de redes extracelulares.....	27
2.2. Avaliação da produção de redes extracelulares em culturas enriquecidas de linfócitos utilizando-se coloração histológica.....	28
2.3. Avaliação da produção de redes extracelulares em culturas enriquecidas de linfócitos utilizando-se coloração histoquímica específica para DNA.....	29
2.4. Quantificação de DNA no sobrenadante das culturas enriquecidas de linfócitos.....	31
3. Avaliação da liberação de redes extracelulares por sub-populações purificadas de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	32
3.1. Avaliação da pureza dos linfócitos TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ utilizados nos ensaios para avaliação da produção de redes extracelulares.....	32

3.2. Avaliação da liberação de redes extracelulares por linfócitos TCD4 ⁺ humanos por imunofluorescência.....	33
3.3. Avaliação da liberação de redes extracelulares por linfócitos T CD8 ⁺ humanos por imunofluorescência.....	37
3.4. Avaliação da liberação de redes extracelulares por linfócitos T CD8 ⁺ humanos por microscopia eletrônica de varredura.	39
3.5. Quantificação de DNA em sobrenadantes das culturas linfócitos TCD8 ⁺ humanos.....	41
Discussão.....	43
Resumo dos resultados e Conclusão.....	51
Referências	52

Introdução e justificativa

1. Redes Extracelulares.

A primeira descrição da liberação de estruturas denominadas redes extracelulares (ETs) foi em 2004 por Brinkmann e colaboradores, que evidenciaram esse evento em neutrófilos. Foi descrito que essas células estimuladas com acetado 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, por domínios globulares de cerca de 25nm e que agregavam-se 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 não faziam parte da rede como α -tubulina, presente no citoplasma da célula, e f-actina presente no córtex celular. Além disso, comprovou-se que o DNA é o principal componente das redes extracelulares, o que foi evidenciado através da marcação positiva pelo DAPI e pelo fato de que o uso de DNase resultou na ausência da formação e/ou destruição das redes que, neste caso, provenientes de neutrófilos, são chamadas de NETs (Brinkmann et al., 2004).

As NETs foram descritas como um mecanismo de morte celular diferente de apoptose e necrose. Na produção de redes extracelulares não ocorre a fragmentação do DNA, a fosfatidilserina não é exposta na face externa da membrana celular, além das caspases não estarem envolvidas no processo de formação da NET (Fuchs et al., 2007).

Acredita-se na importância das redes na eliminação de microrganismos e controle de infecções, de tal forma que essas redes são capazes de conter fisicamente e eliminar patógenos (Urban et al., 2009, M. Bartneck et al, 2010). 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 (Beiter et al., 2006).

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 da mieloperoxidases (MPO) na eliminação de *S. aureus*, uma vez que permanecem ativas mesmo ligadas ao DNA. 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 (Guimarães-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 (Urban et al., 2009; Bianchi et al., 2011).

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 nucleares facilita a mistura do conteúdo citoplasmático granular com a cromatina. Finalmente, ocorre a permeabilização da membrana da célula e o DNA misturado com o conteúdo citoplasmático é liberado no meio extracelular (Fuchs et al., 2007). Este processo está resumidamente apresentado na figura 1. 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 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 (Fadde et al., 1998; Hampton et al., 2002; Metzler et al. 2011). Neutrófilos de pacientes que sofrem de doença granulomatosa crônica, que possuem NADPH oxidase defeituosa, são incapazes de formar ETs (Fuchs et al, 2007; Bianchi et al, 2009). Além disso, a enzima nuclear neutrofílica peptilarginina deaminase 4 (PAD4), responsável por catalisar a citrulinização da histona (substituição da arginina por citrulina), depende dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} . A citrulinização da histona é um processo fundamental na produção das redes extracelulares de DNA, uma vez que está associada à descondensação da cromatina (Neeli et al., 2008; Wang et al., 2009). Também tem sido relatado que os microrganismos, como *Staphylococcus aureus* (Pilszczek et al., 2010) 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.

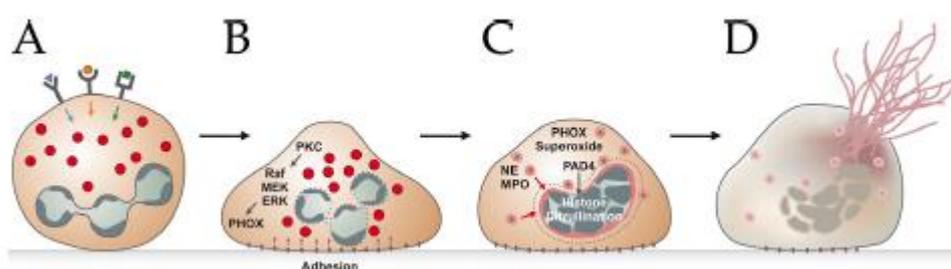


Figura 1: Representação esquemática da via da Netose. (A) Após a estimulação dos receptores, (B) os neutrófilos aderem ao substrato (C) e mobilizam grânulos contendo proteínas como, por exemplo, mieloperoxidase. (D) A membrana nuclear é desestabilizada e o conteúdo nuclear se mistura com o citoplasmático, a membrana celular é rompida. O conteúdo celular é extravasado em forma de rede (BRINKMANN & ZYCHLINSKY, 2012).

Os neutrófilos humanos foram as primeiras células nas quais o evento de etose foi descrito. No entanto, muitos esforços foram feitos para identificar esse evento em outras células. Em 2008, von Köckritz-Blickwede e

colaboradores descreveram a ocorrência de redes extracelulares em mastócitos (MCs) humanos, que são células que participam da reação inflamatória, secretando para a matriz várias moléculas acumuladas no seu citoplasma, como a histamina. Naquele estudo, foi demonstrada a capacidade da célula de eliminar *Streptococcus pyogenes* por um mecanismo independente de fagocitose, sendo descrito que os mastócitos são capazes de aprisionar bactérias nas redes extracelulares denominadas, neste caso, de *mast cell extracelular traps* (MCETs). As MCETs apresentavam a mesma composição básica das NETs: DNA, histonas e outros componentes antimicrobianos. De forma semelhante às redes produzidas por neutrófilos, as MCETs também são dependentes da produção de ROS, acompanhada de uma perturbação na membrana celular. A indução das redes extracelulares em mastócitos foi estimulada com PMA, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), bactérias, LPS (von Köckritz-Blickwede et al., 2008), IL-23 e IL-1β (Lin et al., 2011). Diferentemente dos neutrófilos, as redes dos mastócitos são compostas de proteínas específicas como a triptase, de tal forma que apenas o uso de DNase não é suficiente para desfazer a rede (von Köckritz-Blickwede et al., 2008). Recentemente foi descrita a importância do fator de transcrição HIF-1α na modulação da liberação das ETs por mastócitos humanos e murinos (Branitzki-Heinemann et al., 2012).

Também em 2008, foi descrito que eosinófilos humanos fazem redes extracelulares (*eosinophil extracelular traps* - EETs) (Yousefi et al., 2008). Essas células participam dos processos inflamatórios em alergia e asma, mas principalmente contra parasitos e outros agentes infecciosos. Os eosinófilos são capazes de produzir redes extracelulares que são lançadas num mecanismo semelhante ao funcionamento de catapultas, sendo liberadas em poucos segundos. Além disso, a constituição da rede pode ser de DNA nuclear ou mitocondrial. Nesse último caso, não há presença de proteínas do citoplasma e a EET não necessariamente ocasiona a morte celular. De forma similar às redes dos neutrófilos, as EETs também são dependentes de ROS. Os estímulos capazes de provocar a etose em eosinófilos foram LPS, eotaxina, fator de complemento 5a (C5a) e bactéria Gram-negativa, sendo que, nesse último caso, houve uma pré-ativação dos eosinófilos com IL-5 e IFN- gama (Yousefi et al., 2008). A liberação do DNA em eosinófilos tem sido relatada

principalmente em doenças inflamatórias do intestino (Yousefi et al., 2008) e na pele (Simon et al., 2011).

Em 2010, Bartneck e colaboradores descreveram que os monócitos e macrófagos também são capazes de liberar seu material nuclear produzindo as ETs. De forma similar, como já descrito para outros tipos celulares, as *monocyte/macrophage extracellular traps* (METs) são compostas por DNA e histonas e também são capazes de capturar bactérias como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Webster et al., 2010). Chow e colaboradores descreveram, em 2010, a importância das estatinas para estimular a produção de redes extracelulares em macrófagos RAW264.7. Através da inibição da via dos esteróides, o comportamento das células é alterado, aumentando a capacidade de produção de METs contra *S. aureus*. De uma forma geral, os processos moleculares que culminam na liberação das METs são semelhantes aos já descritos para neutrófilos como, por exemplo, a dependência do estresse oxidativo celular para o desencadeamento do evento.

A etose é um evento que não está restrito às células humanas. Já foi descrito em outros animais como camundongos (Martinod et al., 2015), peixes (Graham Brogdena et al., 2014), gatos (Wardini et al., 2010), galinhas (Chuammitri et al., 2009) e invertebrados como insetos (Altincicek et al., 2008).

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; Hawes et al., 2011).

Já é conhecida a participação das redes extracelulares em diversos contextos de doenças causadas por agentes infecciosos como bactérias, (Brinkmann et al., 2004, von Kockritz-Blickwede et al., 2008) fungos (Urban et al. 2006; Bruns et al., 2010; McCormick et al., 2010), vírus (Saitoh et al., 2012; Wardini et al., 2010) e protozoários (Guimarães-Costa et al., 2009). Em 2009, Guimarães-Costa e colaboradores descreveram a importância das redes extracelulares contra *Leishmania amazonensis* e a sua função leishmanicida. Naquele trabalho, foi demonstrado que os neutrófilos, primeiras células a

chegarem ao local da infecção, são capazes de liberar NETs ao interagir com o parasito e matá-lo. As redes eram compostas de DNA, elastase e histonas e, por microscopia eletrônica, foi visto que a *Leishmania* ficava entrelaçada às redes lançadas pelos neutrófilos. O tratamento com DNase durante a infecção promoveu o aumento da sobrevivência do parasito. De forma similar, a morte do parasito foi induzida pela utilização de histonas purificadas ou pelo uso do meio de cultura rico em NETs previamente induzidas por PMA, sem a presença do neutrófilo, demonstrando assim a importância da rede e seus componentes na eliminação do protozoário. Ainda neste trabalho, análises de lesões de pacientes com leishmaniose cutânea, causada por *Leishmania amazonensis*, mostraram a presença de malhas de DNA e histona através de microscopia de imunofluorescência (Guimarães-Costa et al., 2009).

2. Leishmanioses - Aspectos gerais

As leishmanioses são doenças parasitárias que representam um complexo de doenças com diversas manifestações clínicas e epidemiológicas (Desjeux 2004) e são causadas por espécies distintas do gênero *Leishmania*. Os parasitos protozoários causadores da doença pertencem ao filo Protozoa, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Ross 1903; Lainson e Shaw 1979). Estima-se que 367 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de adquirir a doença, com registro anual aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas. Atualmente, a doença afeta 98 países estimando-se uma prevalência de 14 milhões casos e 59 mil óbitos por ano (WHO, 2014).

Essa doença é prevalente em áreas tropicais e subtropicais. No entanto, a globalização e o aumento do trânsito de pessoas pode ocasionar o aparecimento de novos casos de leishmaniose em locais não endêmicos (Schwartz; Hatz; Blum, 2006).

As diferentes manifestações clínicas da doença e, conseqüentemente, a sua classificação, estão associadas à resposta imune do hospedeiro (principalmente à imunidade mediada por células) e às espécies de *Leishmania* pelas quais o indivíduo foi infectado (Gollob et al., 2008; Kaye; Scott, 2011).

Os protozoários parasitos do gênero *Leishmania* têm um ciclo de vida heteroxênico, alternando entre hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (flebotomos), estes últimos são os vetores responsáveis pela transmissão dos parasitos entre um mamífero e outro (marsupiais, carnívoros, primatas e o homem) (Furtado, 1994).

Nos mamíferos, os parasitos são encontrados na forma amastigota, que é caracterizada por serem arredondadas e imóveis, capazes de se multiplicar obrigatoriamente dentro de células fagocíticas, como macrófagos. Após diversas divisões binárias e o aumento do número de amastigotas, os macrófagos se rompem, liberando as amastigotas que poderão ser fagocitadas novamente por novas células ou então ser ingeridas no repasto sanguíneo através da picada das fêmeas de dípteros da sub-família Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo. Durante o repasto sanguíneo, as formas amastigotas são ingeridas pelo flebotomíneo e, no interior da matriz peritrófica, se diferenciam em formas flageladas, morfológica e bioquimicamente distintas das formas amastigotas, chamadas de promastigotas procíclicas (não infectantes). Posteriormente, se dividem ativamente e rompem a matriz peritrófica. Em seguida, essas formas se ligam às células do epitélio intestinal inserindo seu flagelo entre as microvilosidades. A partir deste momento as promastigotas procíclicas se diferenciam em metacíclicas (infectantes) através de um fenômeno denominado metaciclogênese, após o qual irão migrar para a probóscide do flebotomo podendo ser transmitidas ao hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo (Killick-Kendrick, 1979, 1990, 1991; Sacks et al., 1985 Walters, 1993; Reithinger, 2007) (figura 2).

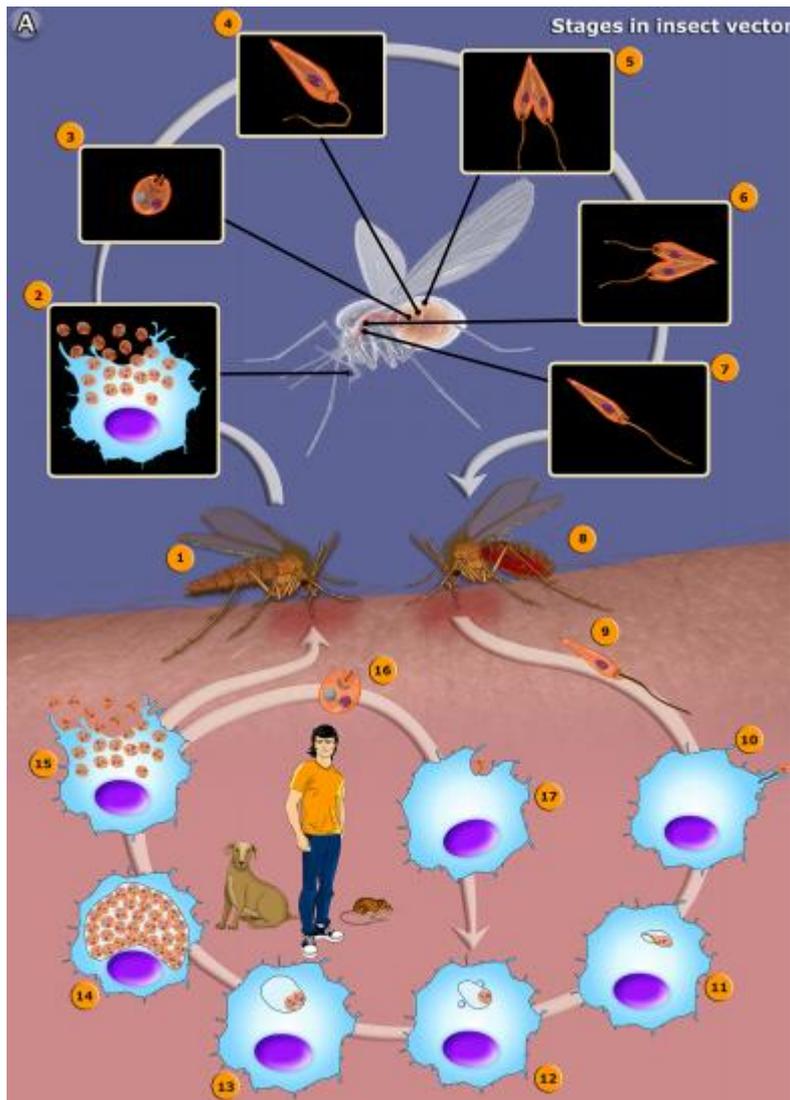


Figura 2: Ciclo biológico da *Leishmania*: Ao se alimentar em um hospedeiro infectado (1), o flebotomíneo ingere as formas amastigotas circulantes ou células fagocíticas cheias de amastigotas (2). No intestino do flebotomo, as formas amastigotas irão se transformar em promastigotas, podendo parasitar diferentes regiões do intestino, dependendo das espécies de *Leishmania spp.* (3-5). Posteriormente irão se transformar em promastigotas metacíclicas e migrarão para a probóscide dos flebotomíneos (6 e 7). Ao realizar o repasto sanguíneo, os flebotomíneos infectados regurgitam, na pele, promastigotas metacíclicas de *Leishmania spp.* (8), que podem invadir células ou ser fagocitadas por células do hospedeiro (10). Dentro dos fagossomos, as promastigotas se transformam em amastigotas (11-13) que se replicam por divisão binária (14), rompem as células (15), podendo infectar novas células (17) ou ser ingeridos pelo flebotomíneo (1). (Texeira, et al., 2013)

Em decorrência das diversas manifestações clínicas, as leishmanioses podem ser classificadas em: (i) leishmaniose cutânea localizada, (ii) cutânea difusa, (iii) mucosa (iv) mucocutânea e (v) visceral. A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave da doença e também é conhecida como Calazar (figura 3A) e caracteriza-se pela presença de febre alta, perda de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e anemia (Desjeux 2004; Murray et al.

2005; Piscopo & Mallia Azzopardi 2007). No Brasil, as formas mais comuns são as de leishmaniose tegumentar, que compreendem a cutânea localizada, difusa, mucosa e mucocutânea (MS, 2014).

3. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Por volta de 1885, na Bahia, foi identificado o primeiro caso da doença e levantada a suspeita do papel dos flebotomíneos como vetores. Em 1911, foi proposta a denominação de *Leishmania braziliensis* para o agente etiológico da LTA no Brasil (Viannia, 1912). No Brasil, foi observado que, no período entre 1985 e 2012, ocorreu uma média de 25.426 casos autóctones, sendo que, em 2012, esse valor chegou a 9.141 casos (MS, 2013). Em Minas Gerais, estado que apresenta um dos maiores números de casos no Brasil, foram notificados 1.041 em 2012 (SES-MG, 2013).

A caracterização da leishmaniose cutânea se dá pela formação inicial de uma pápula ou nódulo no local da infecção. Na região central da pápula, desenvolve-se uma crosta que pode cair expondo a úlcera. Essa manifestação cutânea pode ser única ou múltipla e podem gerar consequências esteticamente desfigurantes. Em alguns casos, as úlceras podem, após algumas semanas ou meses, cicatrizar de forma espontânea. A lesão cutânea ulcerada única, a mais comum, é arredonda ou ovóide, com bordas bem delimitadas, elevadas e eritromatosas com fundo granuloso, de tamanho variável (figura 3B). As espécies relacionadas a essa manifestação clínica são: *Leishmania tropica*, *Leishmania major* e *Leishmania braziliensis* (De Oliveira-Neto et al., 2000; OMS, 2010), sendo a última predominante no Brasil.

A forma cutânea difusa, causada pela *Leishmania amazonensis*, é caracterizada pela presença de lesões disseminadas não ulceradas pela pele (figura 3D), e se manifesta principalmente em indivíduos com deficiência na resposta imunológica específica mediada por células. O perfil de progressão clínica dificulta o tratamento, o que ocasiona uma evolução incontrolável da doença e uma longa duração devido à deficiência na resposta imune (Azeredo-Coutinho et al., 2007).

A leishmaniose mucosa (LM), causada no Brasil principalmente por *Leishmania braziliensis*, é caracterizada por lesões desfigurantes da mucosa

(figura 3C), com a ausência de lesões cutâneas e é resultado da migração hematogênica ou linfática de amastigotas para a mucosa da orofaringe e/ou da laringe, nasal e oral (Herwaldt, 1999; OMS, 2010; Castés; Agnelli; Rondón, 1984; Faria, et al., 2005). Diversas complicações podem ocorrer como perfuração nasal, rouquidão e deformidade da pirâmide nasal. Acredita-se que a patogênese da LM é altamente 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 Leishmaniose cutânea, a forma mucosa geralmente não apresenta cicatrização espontânea – a doença é progressiva e destrutiva (Lessa et al., 2001).

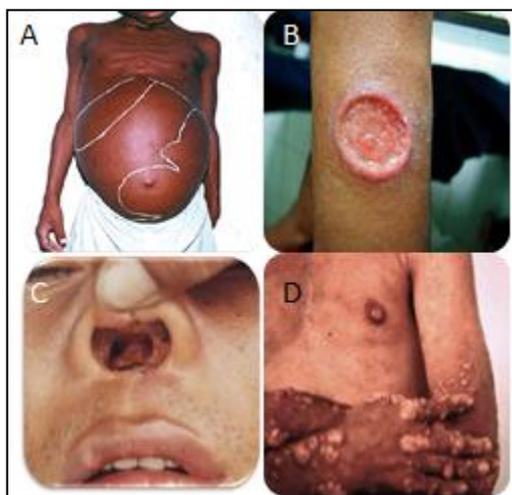


Figura 3: Diferentes manifestações clínicas da leishmaniose. **A:** Paciente com Leishmaniose Visceral apresentando hepatoesplenomegalia. Fonte: <http://medfoco.com.br/leishmaniose-visceral-calazar/>. **B:** Lesão ulcerada, arredondada, com bordas bem delimitadas, elevadas e eritromatosas com fundo granuloso, típica da leishmaniose cutânea. Fonte: <http://medfoco.com.br/leishmaniose-tegumentar-americana-ulcera-de-bauru/>. **C:** Lesão desfigurante da mucosa com ausência de lesões cutâneas apresentando deformidade do local típica da Leishmaniose mucosa. Fonte: <http://dashuehue.mspas.gob.gt/vectores/55-LEISHMANIASIS> **D:** Fotografia de paciente com diversas lesões difusas não ulceradas por toda a pele, característica da leishmaniose cutânea difusa. Fonte <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/leishmaniosis.html>

A leishmaniose mucocutânea (LMC) tem como característica lesões da pele com o comprometimento da mucosa; além disso, causa extensiva destruição da cavidade nasal-oral e faringiana com lesões desfigurantes e por isso é também conhecida como espúndia. Nesta forma clínica, o paciente apresenta lesões na mucosa logo após o aparecimento das lesões cutâneas,

que permanecem concomitantemente à lesão mucosa (De Oliveira-Neto et al., 2000). A LMC é causada por *Leishmania braziliensis* e apresenta mais de uma lesão cutânea, podendo estar associada à resposta imune inapropriada e/ou às características da espécie do parasito (De Oliveira-Neto et al., 2000).

A resposta imune à *Leishmania* começa no local de entrada do parasito, onde as formas promastigotas são fagocitadas pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) (Rittig; Bogdan, 2000). Após serem fagocitados, os parasitos são processados e apresentados via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Lodge; Descoteaux, 2005). As APCs migram para o linfonodo e ativam células T *naïves*. A ativação dessas células ocorre através do primeiro sinal, na qual o receptor de célula T (TCR) e os co-receptores CD4 ou CD8, se ligam ao MHC da APCs, levando ao reconhecimento do antígeno. Para a expansão clonal é fundamental o segundo sinal que é promovido pelas moléculas co-estimuladoras (Maroof et al., 2009). Pode existir um terceiro sinal, que garante que a proliferação linfocitária não seja exacerbada, que ocorre através do engajamento de moléculas homólogas às co-estimuladoras, dentre elas o CTLA-4 (Gray et al., 2006). Após ativados, os linfócitos T migram do órgão linfoide para o sítio da infecção, exercendo funções efetoras sendo capazes de produzir citocinas e moléculas citotóxicas para a eliminação do parasito (Xin et al., 2011). Porém, é também esta reatividade inflamatória que leva à formação da lesão.

Linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ constituem as subpopulações majoritárias de linfócitos T. Os linfócitos TCD4⁺, chamados de auxiliares, respondem aos antígenos proteicos dos microrganismos podendo se diferenciar em subpopulações de células efectoras. As subpopulações de linfócito TCD4⁺ funcionalmente distintas são denominadas Th1, Th2, Th3, Th17 e Treguladora (Treg) de acordo com as citocinas que produzem. A primeira produz principalmente IFN- γ , IL-2 e TNF; a segunda, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13; a terceira, TGF-beta; Th17, principalmente a IL-17, e as Treg, principalmente a IL-10. A diferenciação dos linfócitos auxiliares em subpopulações está relacionada à pelo menos três fatores: o tipo de APC, a natureza e quantidade do antígeno e as citocinas presentes no microambiente onde elas se diferenciam (Gollob et al., 1996; Hailu et al., 2005).

Os linfócitos TCD8⁺, quando ativados, atuam como células citotóxicas, isto é, após reconhecerem o antígeno, são capazes de liberar grânulos líticos na superfície da célula alvo, sendo este um mecanismo rápido de morte celular (Pinkoski; Green, 2003). Esses grânulos contêm proteínas efetoras chamadas de perforinas e granzimas. As perforinas são capazes de formar poros nas células alvo, enquanto as granzimas, com auxílio das perforinas, são interiorizadas clivando substratos críticos dentro das células alvo, o que induz a destruição do DNA (Fan; Zang, 2005). Essa via de morte é independente de caspases e apresenta alguns fatores apoptóticos como condensação da cromatina, fragmentação do núcleo, externalização de fosfatidilserina na membrana plasmática e perda do potencial transmembrana da mitocôndria (Lieberman, 2003).

Em 2009, Faria e colaboradores descreveram a frequência das células presente em lesões de pacientes com LC. Nas lesões iniciais de pacientes com a forma cutânea da doença, a média de células mononucleares foi de 97,92%, 2,08% de neutrófilos e 0,65% de eosinófilos. Já para as lesões tardias, as frequências foram 98,66%, 0,55% e 0,07% respectivamente. Em 2005, o mesmo grupo descreveu que aproximadamente 1/3 das células mononucleares presentes nas lesões de pacientes com LC são macrófagos CD68⁺, 1/3 são linfócitos TCD4⁺ e 1/3 são linfócitos TCD8⁺ (Faria et al., 2005).

A patogênese da LM pode ser associada à hiperativação de células T levando a uma exacerbada resposta inflamatória (Faria et al., 2005; Ribeiro De Jesus et al., 1998; Bacellar et al., 2002; Carvalho et al., 2007). Já a LC está associada a uma resposta imune modulada. De forma comparativa, pacientes com LM apresentam uma maior frequência de células que expressam granzima A do que os pacientes com LC (Faria et al., 2005). Faria e colaboradores, em 2009, demonstraram que pacientes com a forma clínica cutânea em estágio tardio, apresentavam maior frequência de células T CD8⁺GrA⁺ do que pacientes em estágios iniciais da doença. Dessa forma, é possível inferir que o aumento dessa população produtora de granzima A está associado ao aumento da destruição tecidual. Além disso, foi descrita a importância de linfócitos TCD8⁺ no processo de cura das duas formas clínicas, uma vez que ocorre um aumento dessa subpopulação na lesão após a cura (Da-Cruz et al., 2002).

Já é descrita a importância e participação das subpopulações de linfócitos T nas lesões de pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa. A proporção dessas populações em lesões cutâneas ativas é bem controversa e/ou heterogênea. Alguns autores (Barral et al., 1987; Pirmez et al., 1990) descrevem que existe uma frequência maior de linfócitos T CD4⁺ do que CD8⁺. Já Lima, em 1994, descreveu que existe uma frequência igual dessas subpopulações. Entretanto, alguns trabalhos (Vieira et al., 2002; Amato et al., 2003) demonstram uma frequência maior de linfócitos CD8⁺ do que CD4⁺ nas lesões.

Um fato interessante é que, apesar da doença ser desencadeada pela infecção, a presença dos parasitos nas lesões cutâneas ou mucosas é pouco frequente. De fato, em vários casos não se consegue detectar parasitos por microscopia, sobretudo em lesões mucosas (Lessa et al., 2001). Alguns autores relatam não conhecer o mecanismo exato pelo qual o parasito é eliminado da lesão, mas acredita-se que exista uma participação do sistema imune (Moros et al., 1987). 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). Já é descrito uma participação importante de linfócitos TCD4⁺ na produção de citocinas, que impedem a multiplicação da *Leishmania* e a progressão de lesões cutâneas (Carvalho et al., 1992), sugerindo um papel no controle do parasito. Mais recentemente, mecanismos de citotoxicidade por linfócitos TCD8⁺ têm sido também relacionados à morte de *Leishmania* (Santos, et al., 2013; Novais et al., 2013).

Muitos aspectos sobre a imunopatologia na lesão das leishmanioses cutânea e mucosa ainda permanecem obscuros, mas sabe-se que a presença da *Leishmania* é rara e que o infiltrado mononuclear nas lesões é rico em linfócitos. Além disso, inúmeros estudos sobre as redes extracelulares que descrevem seu papel microbicida nas diferentes patologias, incluindo aquelas causadas pelos tripanossomatídeos, nos motivam a buscar novos mecanismos celulares que possam ajudar na compreensão da eliminação extracelular do parasito e, conseqüentemente, na resposta imune.

Recentemente, avaliando-se as características do infiltrado inflamatório em lesões de pacientes com leishmaniose cutânea ou mucosa, observamos, em muitas das preparações, uma imagem compatível com o extravasamento

de material nuclear, semelhante a imagens vistas nos processos de etose. Do ponto de vista teórico, a presença dessas estruturas nas lesões fez sentido, uma vez que poderiam estar associadas com o controle do parasito (que é virtualmente ausente nas lesões) e com a reatividade inflamatória observada. A presença de redes de neutrófilos já foi descrita em lesões de pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. amazonensis* (Guimarães-Costa et al., 2009). Como as lesões cutâneas dos pacientes com LC e LM são compostas, em sua maioria, por células mononucleares, sobretudo linfócitos, levantamos a hipótese de que linfócitos fossem também, como outras células, capazes de liberar redes extracelulares.

Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de produção de redes extracelulares por linfócitos T humanos de indivíduos saudáveis.

Objetivos Específicos

- a) Caracterizar a formação de redes extracelulares em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ humanos, sob diferentes estímulos, *in vitro*.
- b) Quantificar a liberação de DNA por linfócitos sob diferentes estímulos *in vitro*.
- c) Identificar a presença de redes extracelulares em lesões de pacientes com as formas mucosa e cutânea da leishmaniose tegumentar americana.

Metodologia

1. Separação 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). Após 40 minutos de centrifugação a 300g, a 25°C, as células mononucleares do sangue periférico, separadas por gradiente, foram recolhidas e lavadas três vezes por centrifugação (300g a 4°C) em PBS 1x. Em seguida, as células foram ressuspensas em DMEM e plaqueadas em placas de 6 poços para adesão dos monócitos. Após 1 hora na estufa a 37°C e 5% CO₂, as células foram recolhidas, centrifugadas, ressuspensas em DMEM (para adesão de monócitos e cultura de linfócitos totais) ou PBS1x+BSA 0,5%+1mM de azida para purificação em coluna magnética e marcação para citometria. As células recolhidas 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 panótico e fluorescência, foram utilizadas 1x10⁵ células para cada lamínula. O tratamento consiste na colocação de poli-L-Lisina sobre as lamínulas por 15 minutos. Após retirar a poli-L-lisina e as lamínulas estarem secas, as células foram plaqueadas. Os estímulos utilizados para as culturas foram: LPS (*E. coli*) na concentração de 20ng/mL, anti-CD3/CD28 (2µg e 1µg/mL, respectivamente - *Biolegend*), SEB (1µg/mL- enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*) e PMA (0,025 µg/mL).

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

Para marcar os linfócitos com CFSE, foi ajustada a concentração de 5x10⁶ linfócitos por mL e a eles foi acrescido CFSE a 5mM na proporção de 1µL para 1000µL de células ressuspensas em PBS1x, sem soro. As células foram incubadas por 15 min 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 300g por 10 min e, por fim, ressuspensas em DMEM no volume desejado para serem plaqueadas com 1×10^5 células por lamínulas.

3. *Purificação celular em coluna magnética de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ de sangue periférico de indivíduos saudáveis.*

Para a seleção positiva das células em coluna magnética, as CMSP foram separadas, plaqueadas para adesão de monócitos por 1 hora, a 37°C 5%CO₂. O sobrenadante com os linfócitos foi recolhido, as células foram centrifugadas e ressuspensas em PBS1x+BSA 0,5%+1mM de azida. Foi adicionado 50 µL de anticorpo monoclonal anti-CD4-PE ou anti- CD8-FITC para cada 15×10^6 células e incubadas por 10 minutos. As células foram lavadas por centrifugação e foram adicionados 20 µL de microesfera contendo anticorpos anti-PE ou anti-FITC (Microbead Miltenyi Biotec) por 15 minutos, posteriormente uma nova lavagem foi feita e o *pellet* ressuspendido em 5 mL de PBS/0,5%BSA/2mM EDTA e reservado para passagem na coluna magnética. As colunas magnéticas foram fixadas no magneto e 2 mL PBS/0,5%BSA/2mM EDTA (1 mL por vez) foi passado pela coluna, para que as células marcadas ficassem presas à resina. O fluxo excedente foi coletado e, após a saída total do volume, foram adicionados 4 mL de PBS/0,5%BSA/2mM EDTA (1 mL por vez), para a remoção das células não presas à coluna. Por fim, a coluna magnética foi retirada do magneto e lavada com PBS/0,5%BSA/2mM EDTA, com auxílio do êmbolo móvel, com 5 mL de tampão fosfato (1 mL por vez), para obtenção das células presas à coluna magnética, que foram coletadas em tudo separado.

4. *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 1 hora. O sobrenadante foi recolhido, centrifugado a 300g e o *pellet* foi ressuspenso. Em seguida, foram adicionados os anticorpos antimarcadores de superfície (anti-CD8-PeCy7 e anti-CD4-PeCy5), já diluídos, conforme titulação padronizada no nosso

laboratório. Para as marcações, foi utilizado tubo de 5mL estéril e as células foram previamente contadas. Após adição dos anticorpos, os tubos foram incubados a 4°C por 15 minutos ao abrigo da luz. Terminado o período de incubação, foi realizada a lavagem das células adicionando-se 1mL de PBS gelado em tubo e na última lavagem, as células foram ressuspensas em DMEM onde permaneceram a 4°C até o momento da separação por citometria de fluxo (FACS Aria 3- Centro de Pesquisas René Rachou, sob a supervisão dos Drs. Lis Antonelli e Ken Gollob). A pureza das células foi de aproximadamente 99,0% e 99,0% para células CD4⁺ e CD8⁺, respectivamente.

5. Coloração pela técnica de panótico.

É uma técnica de coloração hematológica rápida composta por três reagentes: o primeiro é uma solução de triarilmetano a 0,1%, um fixador. A segunda é uma solução de xantenos a 0,1% e a 3ª, uma solução de tiazinas a 0,1%. As lamínulas foram imersas no fixador, e depois em cada uma das soluções, que são corantes. Por fim, as lamínulas foram lavadas em água corrente, secas e montadas com *Entellan*®. A aquisição das imagens foi obtida por microscopia óptica utilizando-se câmera Q Color 3 – Olympus acoplada ao microscópio Olympus BX51 e o *software* Image Pro-express com objetiva no aumento de 60x.

6. Reações de imunofluorescência em lesões de paciente.

As biópsias 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 amostras previamente 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 foram feitos no criostato a 7 µm de espessura em lâminas siliconadas da marca *Micro Slides* (Empresa VWR Scientific) e fixadas em acetona a 4°C

por 10 minutos e mantidas a -80°C até a marcação. As lâminas foram submetidas a uma sequência de 05 banhos de PBS 1x gelado com duração de 3 minutos cada. Para reduzir as marcações inespecíficas, os cortes foram incubados com PBS/BSA 2% durante 60 minutos. Em seguida, foi adicionado anti-histona H3 (Santa Cruz) em PBS/BSA 2% (1:40). Os cortes foram incubados *overnight* (\cong 15 horas) a 4°C. Posteriormente, foram realizadas sequências de 05 banhos com duração de 3 minutos cada, em PBS, e secagem de lâminas. Então, os cortes foram incubados por 1 hora, a temperatura ambiente, com anticorpo secundário diluído em PBS/BSA 2% (1:100). Após esse processo, os cortes foram lavados, com PBS, em uma sequência de 05 banhos com duração de 3 minutos cada, e por fim, foram secados. Adicionou-se, então, DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride* – SIGMA) diluído em PBS/BSA 2% (1:500) durante 15 minutos e uma nova etapa de cinco banhos com duração de 3 minutos cada em PBS. 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 5 LIVE – *software*: ZEN 2009). Em uma lâmina de cada paciente, foi feito controle de anticorpo secundário para descartar a ligação inespecífica do anticorpo secundário. As imagens foram processadas utilizando o programa Zeiss LSM Image Browser.

7. Reações de imunofluorescência em cultura enriquecidas com linfócitos T aderidas às lamínulas.

Para a marcação de imunofluorescência, as lamínulas foram fixadas com paraformaldeído 2% por 1 hora e lavadas 5 vezes com PBS por 3 minutos cada. Para reduzir as marcações inespecíficas, as lamínulas foram incubadas com PBS/BSA 2% durante 60 minutos. Em seguida, foi adicionado anticorpo monoclonal anti-histona H3 (Santa Cruz) diluído em PBS/BSA 2% (1:40); as amostras foram incubadas por 3 horas a 4°C. Posteriormente, foram realizadas sequências de 05 banhos com duração de 3 minutos cada, em PBS, e secagem de lamínulas seguidas da incubação por 1hr, na temperatura ambiente, com anticorpo secundário diluído em PBS/BSA 2% (1:100). Após esse processo, as lamínulas foram lavadas, com PBS, em uma sequência de 05 banhos com duração de 3 minutos cada, e por fim, foram secadas.

Adicionou-se, então, DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride* – SIGMA) diluído em PBS/BSA 2% (1:500) durante 15 minutos e uma nova etapa de cinco banhos com duração de 3 minutos cada em PBS. 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 5 LIVE – *software*: ZEN 2009). Em uma lamínula de cada doador foi feito controle de anticorpo secundário para descartar a ligação inespecífica do anticorpo secundário. As imagens foram processadas utilizando o programa Zeiss LSM Image Browser. Para a marcação com Iodeto de Propídio (PI, *Biolegend*), foram feitas as lavagens para retirar o fixador e posteriormente as amostras foram incubadas com o PI diluído no Buffer (10mM hepes/NaOH, 140mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) (1:20) por 10 minutos, seguidos de 5 lavagens, com PBS, de 3 minutos cada. Posteriormente foi realizada a marcação com o DAPI e montagem da lamínula com *vectashield*®.

8. *Microscopia eletrônica de varredura*

Após a separação de CMSP e adesão de células aderentes, as células foram purificadas e colocadas em lamínula de 13mm, cortadas ao meio, pré tratadas com poli-L-Lisina (5x10⁵ células por lamínula). Após 48 horas de incubação, as amostras foram fixadas em Glutaraldeído a 2,5% em tampão de cacodilato 0,2M. Após, a fixação, as lamínulas foram lavadas e mantidas em tampão, a 4°C até o processamento. A pós-fixação foi feita em OsO₄ 1% em tampão 0,1M durante 1 hora e posteriormente imersas 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 10nm, no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens – CAPI - ICB/UFMG e posteriormente as imagens foram adquiridas pelo microscópio eletrônico de varredura (Zeiss DSM-950) e analisadas.

9. *Quantificação de DNA*

Os linfócitos (1x10⁶), purificados ou não, foram estimulados ou não com LPS ou com anti-CD3/CD28 por 16, 24, 36, 48 e 72 horas. Passado o tempo de

incubação, as células foram centrifugadas a 300g por 10 minutos para retirada das células, e o sobrenadante foi coletado e congelado a -20°C. O DNA no sobrenadante das culturas foi quantificado pelo kit *Picogreen dsDNA* (Invitrogen) de acordo com as informações do fabricante. Para a digestão do DNA pela DNase, foi utilizada uma solução de DNase I (Invitrogen) 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.

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

Para as marcações, foi utilizada a placa de 96 poços e em cada poço, foram adicionadas 2×10^5 de células em 20ul. Em seguida, foram adicionados os anticorpos antimarcadores 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 200g 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 suspendidas, foram adicionados, 100μl de PBS e 100μl de solução de formaldeído 4%, por 15 minutos à temperatura ambiente. A leitura foi feita no *FacsCanto II* e a análise foi feita no *FlowJo*.

11. Análise estatística

A análise estatística, quando possível, foi feita utilizando o *GraphPad Prism 5*, teste T não pareado e não paramétrico.

Resultados

1. Caracterização das redes extracelulares em lesões de pacientes com LTA

Para demonstrar a presença de redes extracelulares nas lesões de pacientes com LC e LM por microscopia de imunofluorescência, foram utilizados marcadores de DNA (DAPI) e histona (anti-histona H3), dois componentes conhecidos dessas estruturas. Nossos resultados mostraram que lesões de pacientes com a forma cutânea da leishmaniose apresentaram estruturas semelhantes às redes que foram marcadas para DAPI (figura 4A) e histona H3 (figura 4B) e apresentaram co-localização desses 2 componentes (figura 4C). De forma similar, pacientes com a forma mucosa da doença apresentaram as mesmas marcações com co-localização desses marcadores (figura 5A, B e C). Controles de anticorpo secundário foram feitos para os mesmos cortes e não apresentaram marcação inespecíficas. Foi realizada marcações em 1 biopsia de lesão de paciente com a forma cutânea e 1 biopsia de lesão de paciente da forma mucosa de leishmaniose.

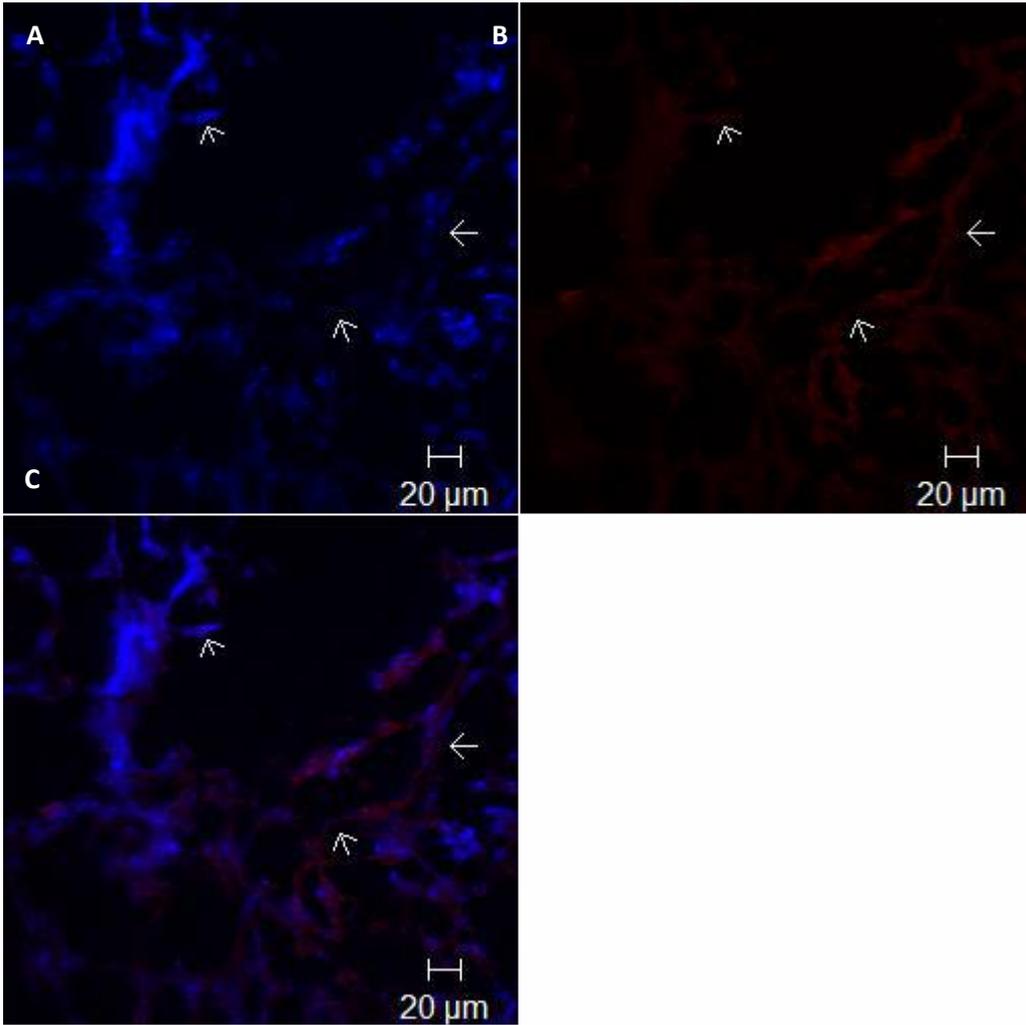


Figura 4: Caracterização de Redes extracelulares em lesão de paciente com LC por microscopia confocal. Figura representativa da análise das lesões de pacientes com leishmaniose cutânea. **(A)** Marcação com DAPI. **(B)** Marcação para histona H3. **(C)** Sobreposição das imagens. Setas = presença de DNA extracelular co localizado com histona H3.

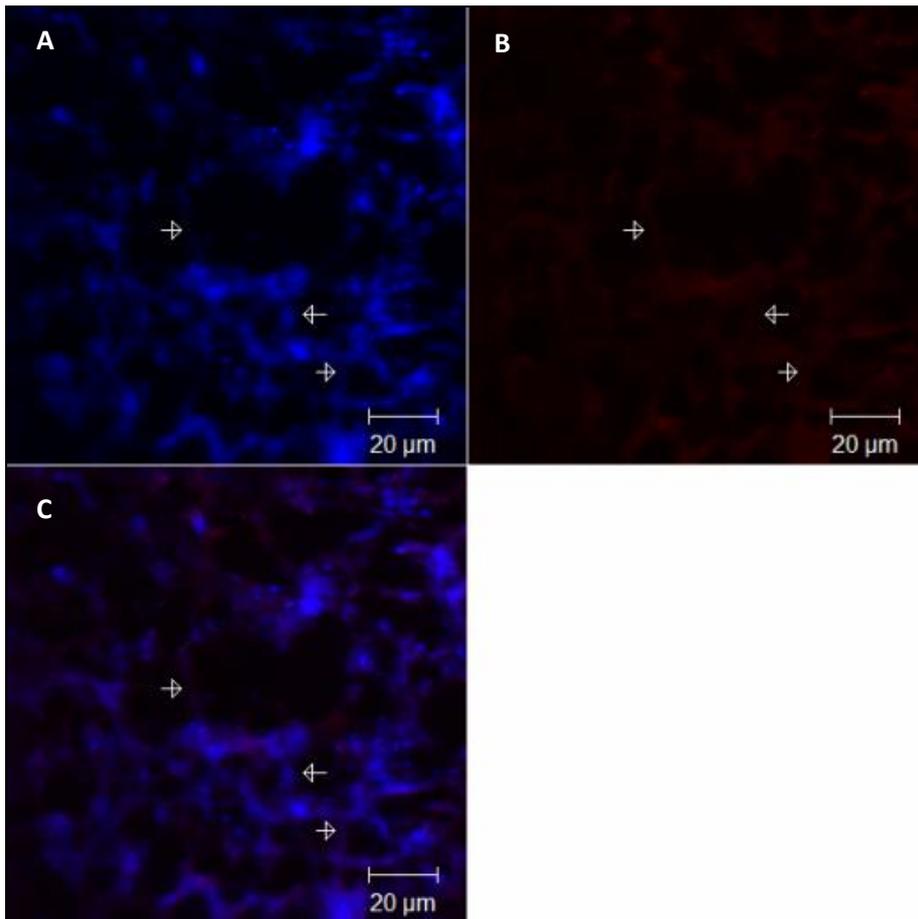


Figura 5: Caracterização de Redes extracelulares em lesão de paciente com LM por microscopia confocal. Figura representativa da análise das lesões de pacientes com leishmaniose mucosa. **(A)** Marcação com DAPI. **(B)** Marcação para histona H3. **(C)** Sobreposição das imagens. Setas = presença de DNA extracelular co localizado com histona H3.

2. Avaliação da liberação de redes extracelulares por linfócitos purificados do sangue periférico de indivíduos saudáveis

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

Sabendo que os linfócitos são células importantes e principais componentes das lesões de indivíduos com leishmaniose cutânea e mucosa (Faria et al., 2005), e tendo observado a presença de redes nessas lesões, decidimos estudar se os linfócitos são capazes de produzir redes extracelulares. Para isso, realizamos a separação de CMSP, adesão de células aderentes (monócitos) e coletamos as células não aderentes. Reservamos uma alíquota para verificar o grau de pureza da amostra utilizando a técnica de citometria. Para isso, avaliou-se a frequência de linfócitos dentre as células totais coletadas e foi observado que a cultura era enriquecida em linfócitos uma vez que obtivemos 86,5% de células marcadas com anti-CD3 (FITC) e apenas de 1,56% de células CD14⁺ (PE-Cy5) (figura 6).

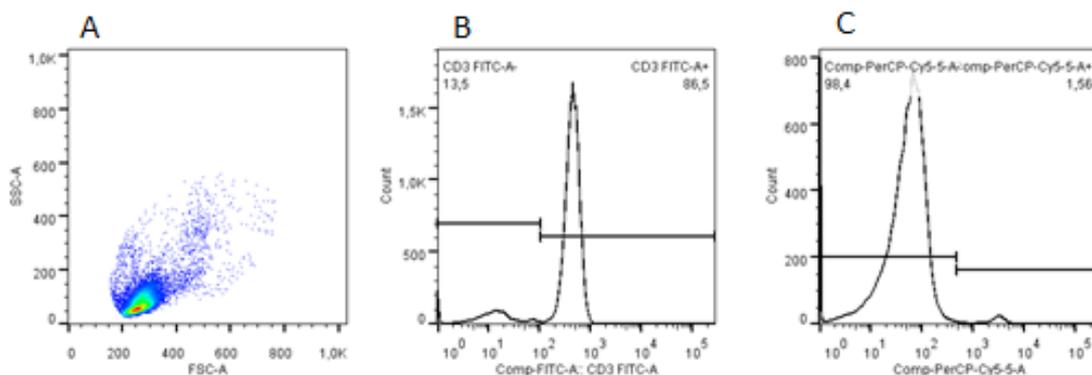


Figura 6: Avaliação da pureza da cultura de linfócitos por citometria de fluxo: Após a separações por gradiente, as CMSP foram plaqueadas para adesão dos monócitos a 37°C por 1 hora e os linfócitos foram recuperados do sobrenadante. Para determinação da pureza uma alíquota foi marcada com anti CD3 FITC e CD14 PE Cy5. **(A)** Gráfico de dispersão puntual representativo do perfil granulosidade (SSC) *versus* tamanho (FSC) das células obtidas do sobrenadante, após a incubação de 1h em cultura para aderência e remoção de células aderentes. **(B)** Histograma representativo da análise da marcação com anticorpos monoclonais anti-CD3-FITC; seleção da população negativa e positiva para CD3. **(C)** Histograma representativo da análise da marcação para com anticorpos monoclonais anti-CD14-PerCP-Cy5; seleção da população negativa e positiva para CD14.

2.2. Avaliação da produção de redes extracelulares em culturas enriquecidas de linfócitos utilizando-se coloração histológica.

Através de coloração rápida (panótico), foi possível sugerir que linfócitos totais eram capazes de fazer etose sob diferentes condições (figura 7). Na figura 7A é possível observar pequenos filamentos saindo de algumas células mesmo na ausência de estímulos. Na presença do estímulo anti-CD3/CD28, que é específico para linfócitos T, é possível observar redes finas conectando uma célula a outra e a ocorrência de redes dispersas, em forma de “nuvens” (setas grossas) (Figura 7B). A ocorrência de redes nesse estímulo parece ser maior que no grupo controle. Já na figura 7C, observa-se que, após estímulo com PMA, os linfócitos foram também capazes de produzir redes extracelulares. Entretanto, enquanto com o estímulo anti CD3/CD28 as redes pareciam ligar uma célula a outra, nesse estímulo isso fica menos evidente. Já ao utilizar o SEB (Figura 7D), um estímulo específico para linfócitos expressando regiões Vbeta específicas, foi observado que a ocorrência de redes que parecem “nuvens” é visualmente menos frequentes do que quando comparando-se às culturas expostas aos outros estímulos, da mesma forma que a emissão de redes alongadas.

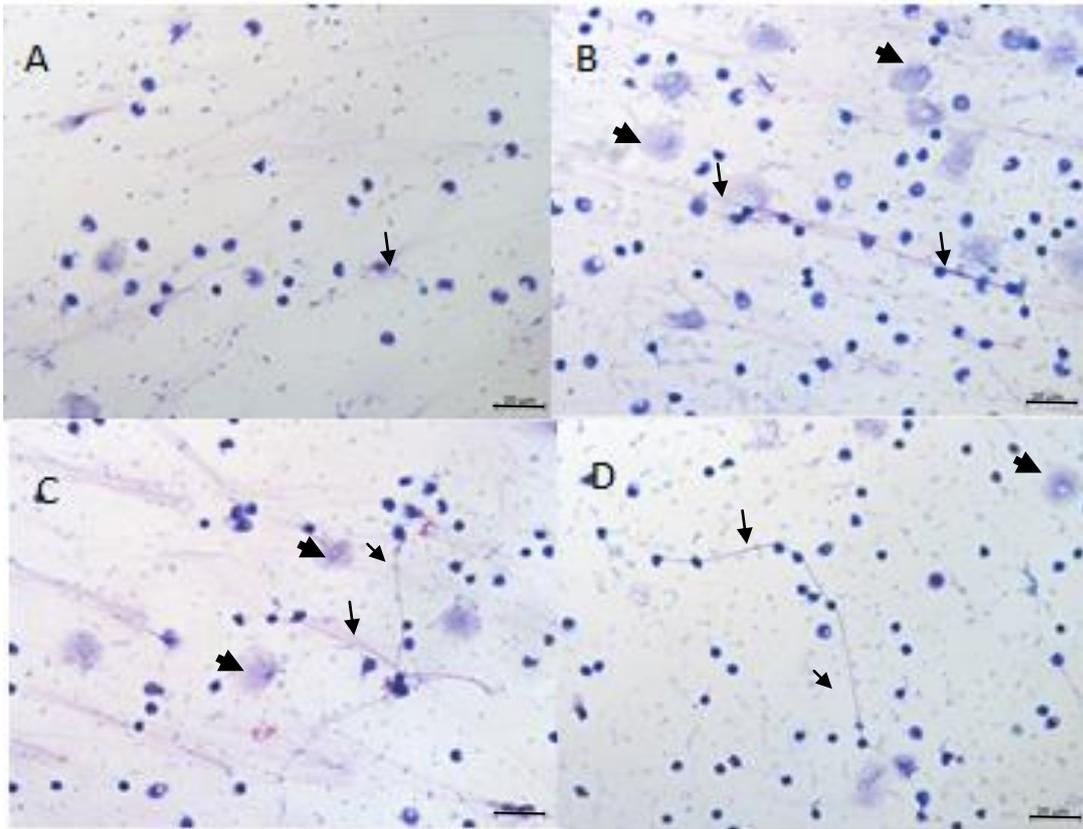


Figura 7: Caracterização das redes extracelulares em linfócitos totais por microscopia óptica. A figura é uma imagem representativa de Linfócitos totais que foram plaqueados 1×10^5 por poço e estimulados por 48 horas a 37°C $5\% \text{CO}_2$. Após o estímulo as células foram fixadas e coradas com panótico. **(A)** Linfócitos não estimulados. **(B)** Linfócitos estimulados com anti CD3/CD28. **(C)** Linfócitos estimulados com PMA. **(D)** Linfócitos estimulados com SEB. Setas finas = estruturas caracterizando a presença das redes alongadas. Setas grossas = Redes dispersas em forma de nuvens. Barra = $20\mu\text{m}$, 60x.

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

Após a realização da coloração pelo panótico, onde observamos estruturas semelhantes a redes, buscamos confirmar se essas estruturas eram formadas por componentes encontrados nas ETs. Para isso, as células mononucleares foram separadas por gradiente de densidade, os monócitos foram colocados para aderir, o sobrenadante com os linfócitos foi coletado, plaqueado e estimulados com LPS por 24 horas. Por fim, as lamínulas foram marcadas com DAPI e PI. Na figura 8, é possível observar que ocorre a presença de diversas redes extracelulares, evidenciadas pelas setas, tanto pelas marcações com DAPI (figura 8A) quanto PI (figura 8B) e a co-localização

desses componentes na figura 8C, em linfócitos totais, estimulados com LPS por 24 horas. Através da marcação com os corantes para DNA é possível observar a presença de redes finas alongadas que parecem conectar uma célula a outra. Da mesma forma, é possível ver que nem todas as células participam da emissão e/ou são conectadas às redes.

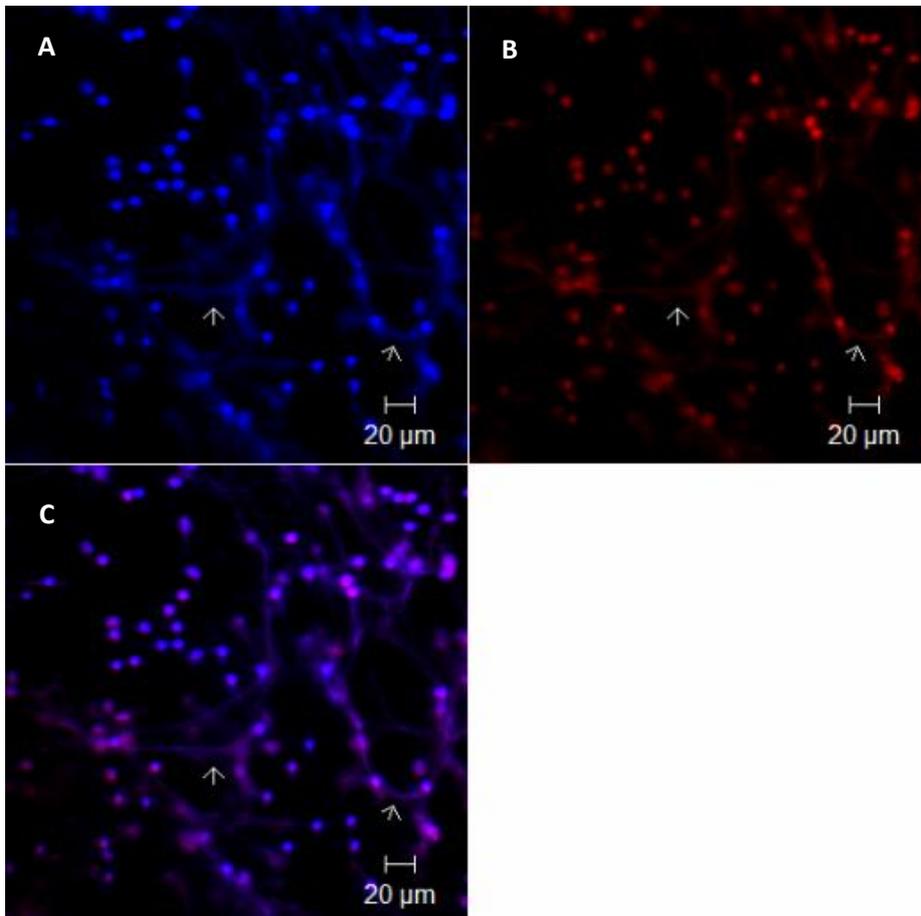


Figura 8: Caracterização das redes extracelulares de linfócitos totais por microscopia de imunofluorescência. Imagens representativas de marcação com DAPI e PI e análise por microscopia confocal, de culturas enriquecidas de linfócitos, estimuladas ou não com LPS. As células foram plaqueadas 1×10^5 por poço e estimulados com LPS (20ng/mL) por 24 horas a 37°C $5\%\text{CO}_2$. Após o estímulo as células foram fixadas com paraformaldeído 2% incubadas com DAPI (A) e PI (B). Em C sobreposição das imagens A e B. Setas = estruturas caracterizando a presença das redes.

2.4. Quantificação de DNA no sobrenadante das culturas enriquecidas de linfócitos.

Após a demonstração da presença das redes extracelulares nas lesões e nas culturas de linfócitos purificados, propusemo-nos a quantificar o DNA liberado no sobrenadante dessas culturas após o estímulo com LPS (figura 9). Nossos resultados demonstraram que, após o estímulo com LPS, a liberação do DNA foi aproximadamente duas vezes maior em relação ao controle. Este resultado foi observado para estímulo durante 24hs, 48hs ou 72hs (Figura 9). No entanto, comparando-se entre os diferentes tempos de estímulo com LPS, não foram observadas diferenças significativas em relação à liberação de DNA.

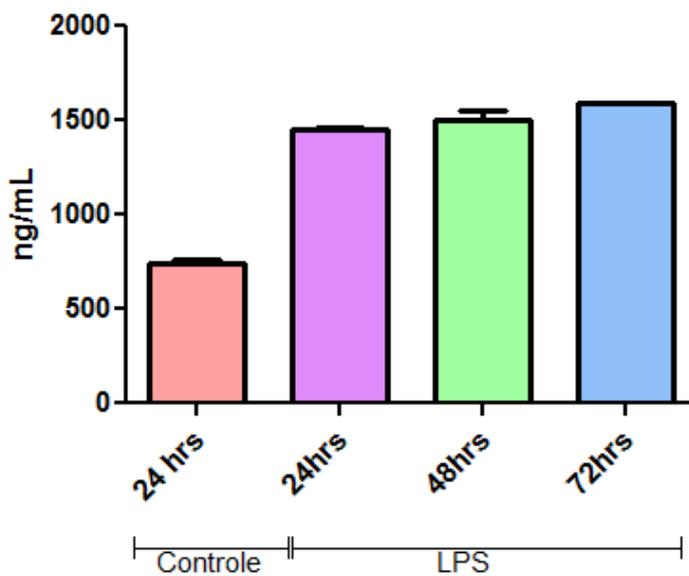


Figura 9: Quantificação de DNA no sobrenadante de culturas de linfócitos. Linfócitos (1×10^6 por poço) foram estimulados ou não com LPS (20ng/mL) por 24, 48 e 72 horas, a 37°C 5%CO₂. Em seguida, as células foram centrifugadas e o sobrenadante coletado para dosagem de DNA por *Picogreen*.

3. Avaliação da liberação de redes extracelulares por sub-populações purificadas de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺

3.1. Avaliação da pureza dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ utilizados nos ensaios para avaliação da produção de redes extracelulares.

Após termos observado a capacidade de liberação de redes por linfócitos, propusemos-nos a identificar se estas estruturas eram liberadas por linfócitos TCD4⁺ ou TCD8⁺. Para os experimentos que foram realizados após a purificação de células TCD4⁺ e TCD8⁺, como descrito em materiais e métodos, uma alíquota das células foi coletada após a separação por coluna magnética e foi adquirida no citometro de fluxo para avaliação da pureza da separação. As análises foram feitas considerando-se a seleção da população de linfócitos identificada num gráfico de dispersão de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) (figura 10A). Observou-se que, após a separação das células TCD4⁺, obteve-se uma pureza de 91% (Figura 10B) e após a purificação de células TCD8⁺, obteve-se uma pureza de 81% de linfócitos CD8^{high} (figura 10C).

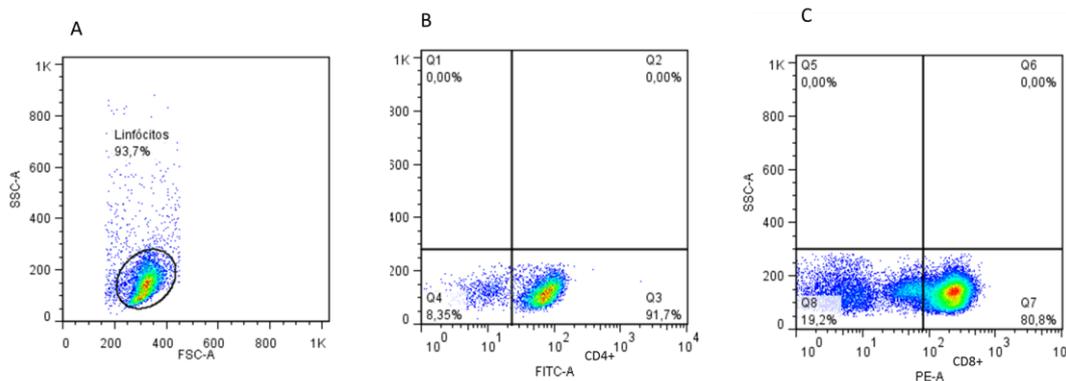


Figura 10: Avaliação da pureza da separação de linfócitos T por citometria de fluxo: As CMSP foram plaqueadas para adesão dos monócitos a 37°C por 1 hora e os linfócitos foram recuperados do sobrenadante. Posteriormente foi realizada a separação celular através de coluna magnética. Para determinação da pureza uma alíquota foi adquirida no citometro de fluxo e avaliada a pureza. Imagens representativas de (A) perfil granulosidade *versus* tamanho, (B) seleção da população positiva para TCD4, (C) seleção da população positiva para TCD8.

3.2. Avaliação da liberação de redes extracelulares por linfócitos TCD4⁺ humanos por imunofluorescência.

Para avaliar a participação dos linfócitos TCD4⁺ na produção das redes, essas células foram purificadas, marcadas com CFSE e estimuladas com uma combinação de anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD28. Após o estímulo, as células foram marcadas com DAPI e as imagens analisadas por microscopia confocal. A figura 11, mostra, por imunofluorescência, que linfócitos TCD4⁺ são capazes de realizar a etose, sob estímulo com anti-CD3/CD28 por 24 horas. Nessa figura é possível observar, através da marcação com DAPI, inúmeras redes afinadas saindo de algumas células (fig 11A); na figura 11B é possível ver, principalmente nas setas, a presença de estruturas semelhante a redes marcadas em CFSE. A figura 11C representa a sobreposição das imagens com a marcação em DAPI e em CFSE.

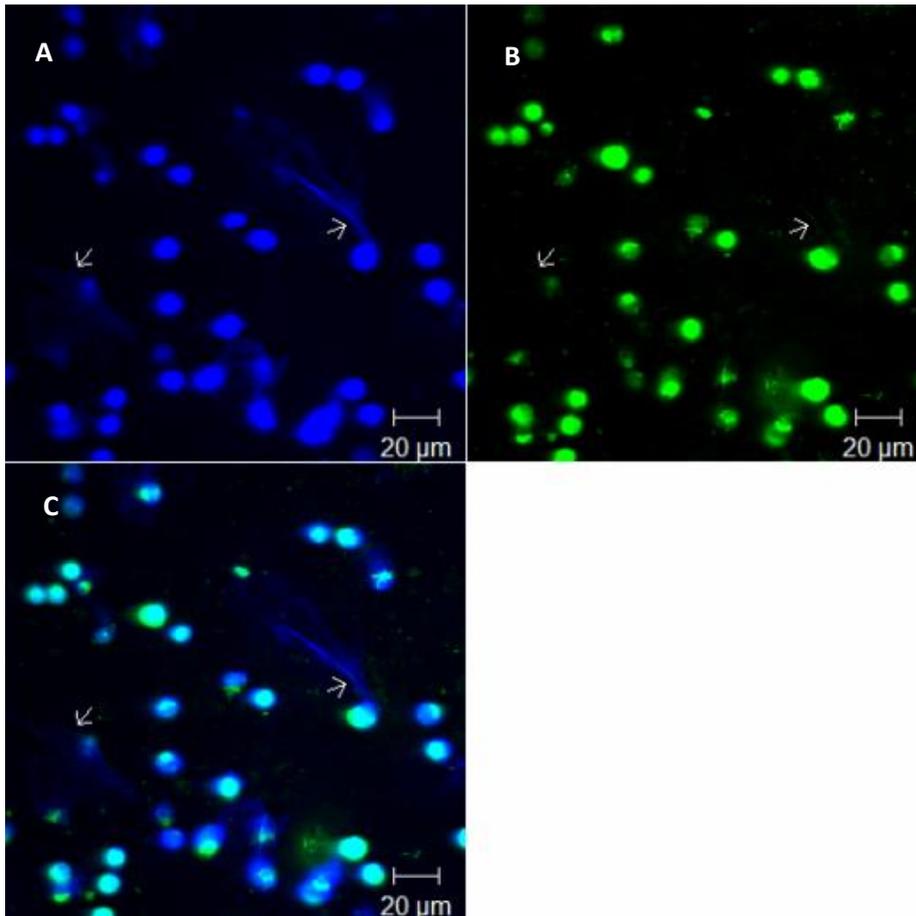


Figura 11: Caracterização das redes extracelulares de linfócitos TCD4⁺ por microscopia de imunofluorescência. Linfócitos TCD4⁺ foram marcados com CFSE (B), plaqueados 1×10^5 por poço e estimulados com anti-CD3/CD28 ($2 \mu\text{g}/1 \mu\text{g}$ por mL) por 24 horas a 37°C $5\% \text{CO}_2$. Após o estímulo as células foram fixadas com paraformaldeído 2% incubadas com DAPI (A). Em C sobreposição das imagens A e B. Setas = estruturas caracterizando a presença das redes.

3.3. Avaliação da liberação de redes extracelulares por linfócitos T CD4⁺ humanos por microscopia eletrônica de varredura

Após identificar a formação de rede em culturas de células TCD4⁺ por imunofluorescência, avaliamos as características dessas estruturas por microscopia eletrônica de varredura após cultura de 48 horas. As figuras 12A e 12B são referentes ao grupo sem a presença de estímulo. Observando a figura 12A é possível ver estruturas semelhantes a redes finas conectando uma célula a outra. Na figura 12B, em destaque, podemos observar as redes chegando ou saindo da célula e como são compostas por fios delicados. Após o estímulo com anti CD3/CD28, por 48 horas (figura 12C e 12D) é possível ver a presença de redes na forma de “nuvem”, diferentemente do grupo controle.

Comparando a figura 12B e 12D, que estão no mesmo aumento, podemos observar como que as redes se diferenciam, na primeira, formando fios (provavelmente conectando a uma outra célula) e na segunda em forma mais dispersa sem formar conexões. Enquanto observa-se a integridade da célula nas culturas controle, observa-se que as células estão, aparentemente, em processo de morte, tendo perdido a integridade de sua membrana nas culturas estimuladas.

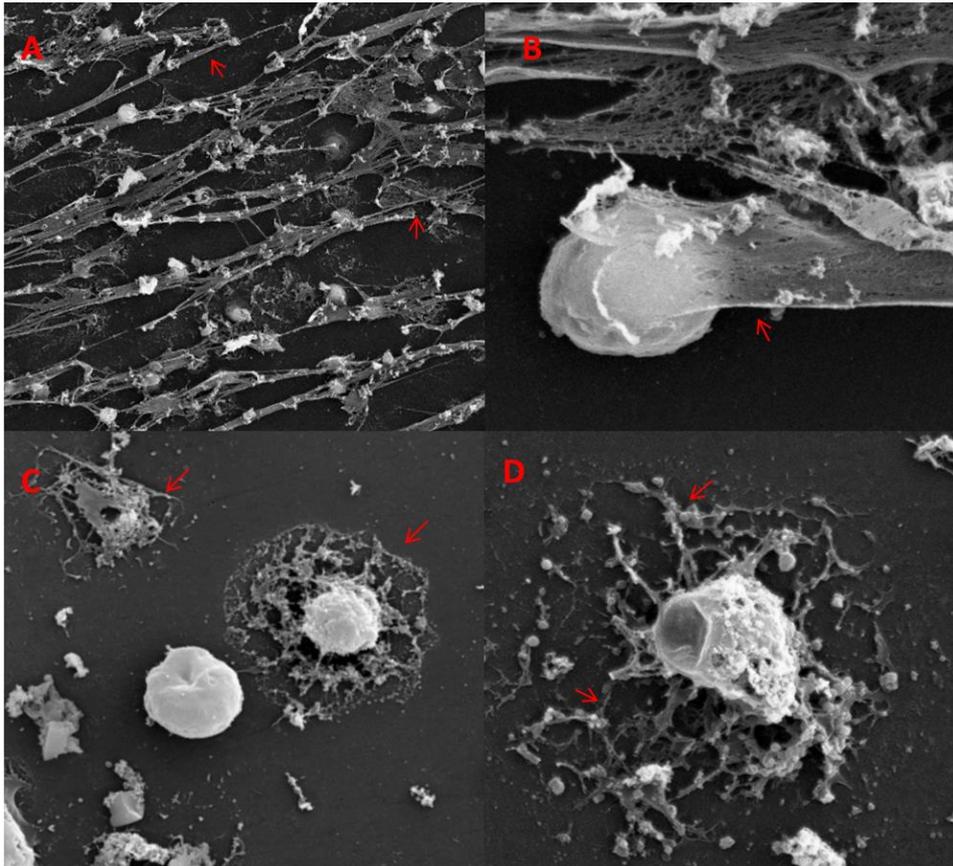


Figura 12: Caracterização das redes extracelulares de linfócitos TCD4⁺ por microscopia eletrônica de varredura. Linfócitos TCD4⁺ foram plaqueados 5×10^5 por poço e estimulados com anti-CD3/CD28 ($2 \mu\text{g}/1 \mu\text{g}$ por mL) por 48 horas a 37°C $5\% \text{CO}_2$. Após o estímulo as células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em cacodilado 0,2M. As lamínulas foram processadas para microscopia eletrônica de varredura e as imagens foram adquiridas. **(A)** Controle – 500x **(B)** Controle – 5000x. **(C)** Células Estimuladas – 3000x. **(D)** Células Estimuladas – 5000x. Setas finas = estruturas caracterizando a presença das redes.

3.4. Quantificação do DNA em sobrenadantes das culturas de linfócitos TCD4⁺ humanos

Após a verificação da ocorrência de redes extracelulares liberadas por linfócitos TCD4⁺, pelas técnicas de microscopia de imunofluorescência e microscopia eletrônica de varredura, propusemo-nos a quantificar o DNA liberado no sobrenadante dessas culturas após o estímulo com anti-CD3/CD28. Nossos dados demonstram que foi possível quantificar DNA no sobrenadante das culturas com linfócitos TCD4⁺, sob o estímulo de anti-CD3/CD28, em diferentes tempos. O tratamento com DNase evidenciou uma redução na concentração de DNA nas amostras de sobrenadante. Quando possível, em função do n, foi realizada análise estatística, que demonstrou significativa a redução de DNA com o tratamento com a DNase nos grupos estimulados com anti-CD3/CD28 nos tempos 24 e 48 horas, comparando-se ao grupo controle 48 horas. Além disso, foi possível observar diferença estatística entre os grupos estimulados com 24 horas e 48 horas (figura 13).

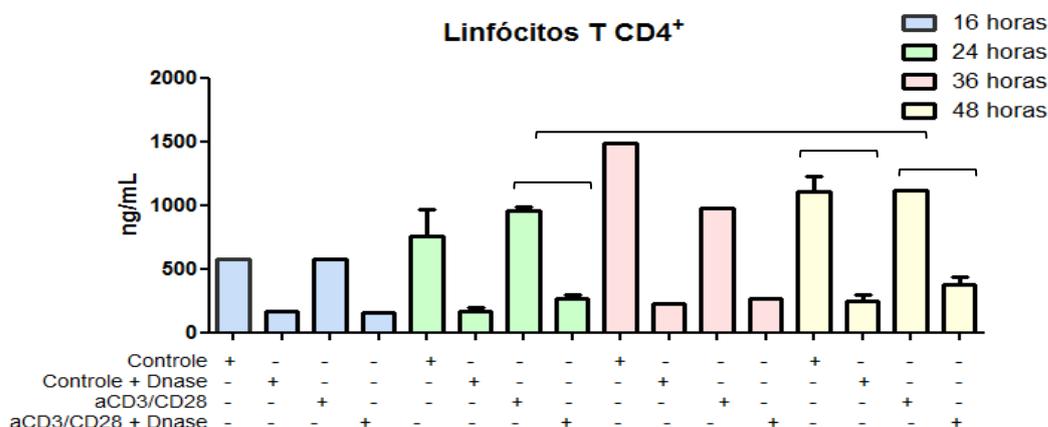


Figura 13: Quantificação de DNA no sobrenadante de culturas de linfócitos TCD4⁺. Linfócitos TCD4⁺ (1x10⁶ por poço) foram estimulados ou não com anti-CD3/CD28 (2µg/1µg por mL) por 16, 24 e 48 horas, 37°C 5%CO₂. Em seguida, as células foram centrifugadas e o sobrenadante coletado para dosagem de DNA por *Picogreen*. O DNA foi medido na ausência ou presença de estímulo e DNase (símbolos – e + indicam ausência ou presença, respectivamente). As barras representam a média dos experimentos realizados e as braquetes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, com p<0,05.

3.3. Avaliação da liberação de redes extracelulares por linfócitos T CD8⁺ humanos por imunofluorescência.

Na figura 14A, podemos observar a presença de inúmeras redes ligando uma célula a outra, pela marcação com DAPI. Na figura 14B é possível observar que, através da marcação com CFSE, existe a presença de várias redes que também aparentam ligar uma célula a outra. De forma similar, também ocorre essa característica na imagem com a presença de marcação para histona H3 (figura 14C). Podemos observar, na figura 14D, a sobreposição dessas marcações. Essas redes são evidenciadas em uma cultura estimulada com anti-CD3/CD28 por um período de 24 horas. Na figura 15, após 48 horas de estímulo com anti CD3/CD28, é possível observar a presença de redes que conectam uma célula a outra, e pode ser visto através da marcação com DAPI (figura 15A) e pela marcação com CFSE (figura 15B). A figura 15C refere-se à sobreposição das marcações com DAPI e CFSE.

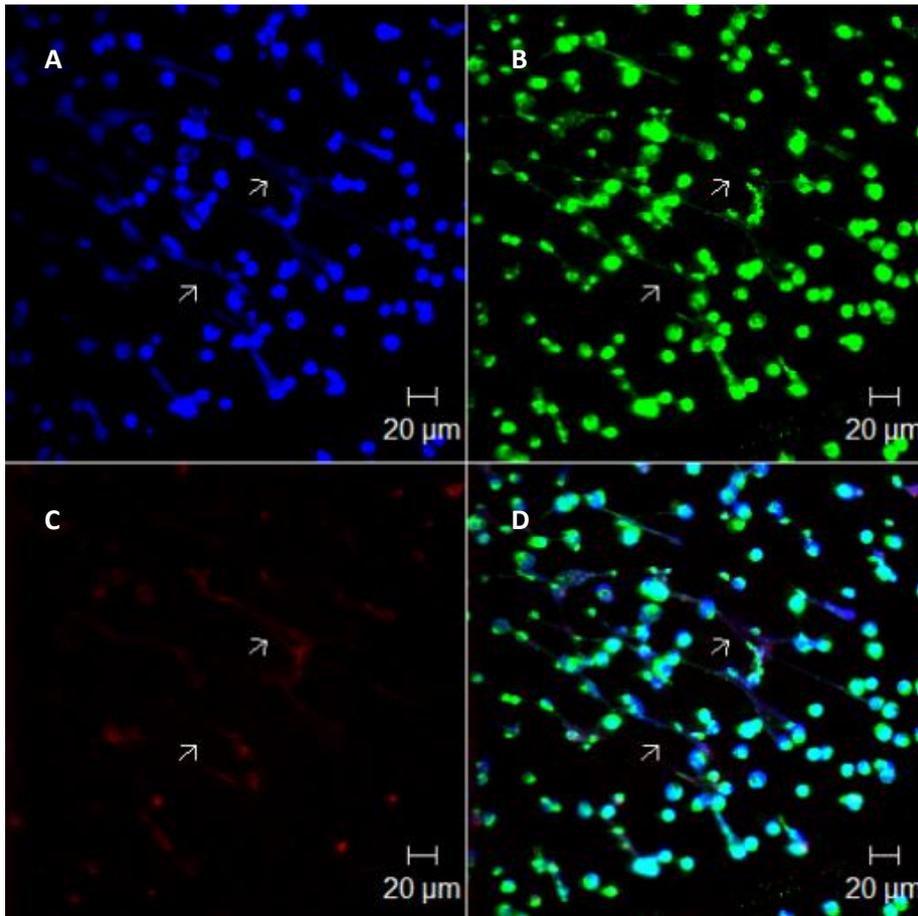


Figura 14: Caracterização das redes extracelulares de linfócitos TCD8⁺ por microscopia de imunofluorescência. Linfócitos T CD8⁺ foram marcados com CFSE (B) e plaqueados 1×10^5 por poço e estimulados com anti-CD3/CD28 ($2 \mu\text{g}/1 \mu\text{g}$ por mL) por 24 horas a 37°C $5\% \text{CO}_2$. Após o estímulo as células foram fixadas com paraformaldeído 2% incubadas com DAPI (A) e histona H3 (C). Em D sobreposição das imagens A, B e C. Setas = estruturas caracterizando a presença das redes. Imagem representativa

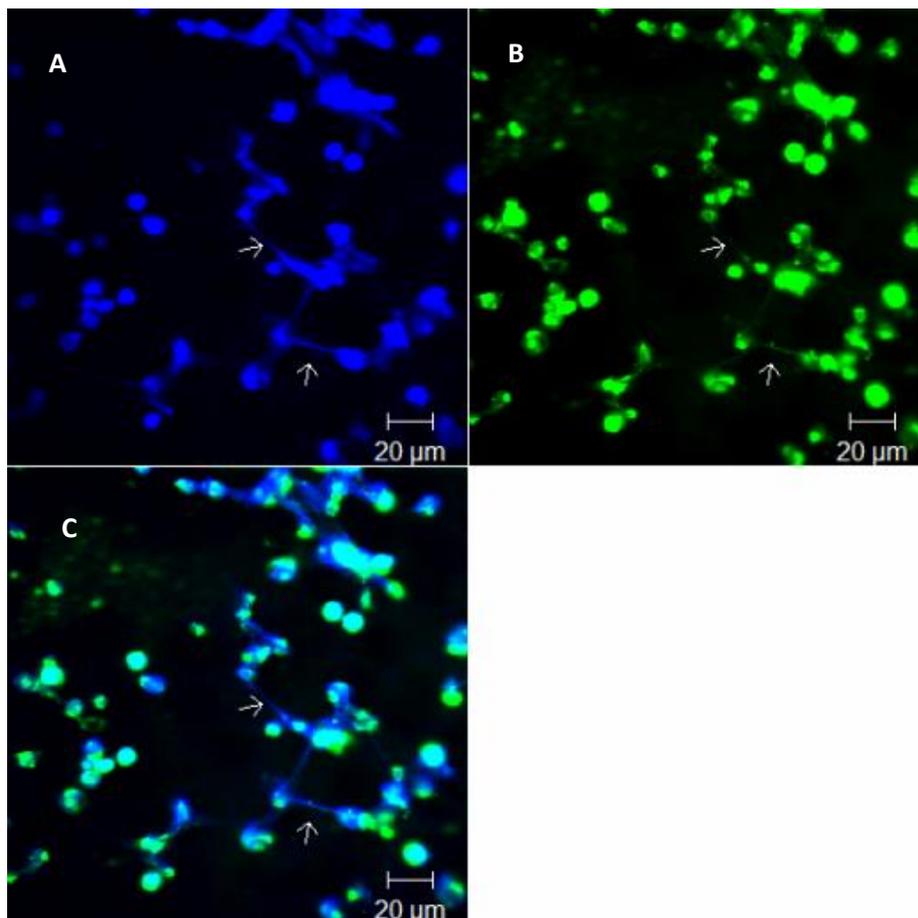


Figura 15: Caracterização das redes extracelulares de linfócitos TCD8⁺ por microscopia de imunofluorescência. Linfócitos TCD8⁺ foram marcados com CFSE (B) e plaqueados 1×10^5 por poço e estimulados com anti-CD3/CD28 (2µg/1µg por mL) por 48 horas a 37°C 5%CO₂. Após o estímulo as células foram fixadas com paraformaldeído 2% incubadas com DAPI (A). Em C sobreposição das imagens A e B. Setas = estruturas caracterizando a presença das redes.

3.4. Avaliação da liberação de redes extracelulares por linfócitos T CD8⁺ humanos por microscopia eletrônica de varredura.

Pela técnica de microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar a existência de redes finas, evidenciadas pelas setas finas, na cultura de linfócitos TCD8⁺, após 48 horas, na presença e na ausência de estímulos (figura 16). Na figura 16A é possível observar que, mesmo na ausência de estímulo, os linfócitos conseguem realizar etose. É possível ver a presença de inúmeras redes, extremamente finas conectando uma célula a outra. Na figura 16B, ainda no grupo controle, é possível observar um detalhe da interação dessas redes com as células, ainda é possível observar a presença de domínios globulares anexos às redes (setas grossas). Na figura 16C e D são

imagens referentes ao estímulo com anti CD3/CD28. Nessas imagens é possível ver a presença de redes evidenciando a ligação entre uma célula e outra. É possível ver como a membrana da célula envolvida no processo de etose (figura 16D) não está íntegra enquanto, no mesmo campo, observamos uma célula em que isso não ocorre. Observa-se claramente a diferença entre as redes formadas nas culturas controle e nas culturas estimuladas: enquanto as primeiras mostram redes finas e muito numerosas, as estimuladas mostram redes aparentemente direcionadas e bem menos numerosas.

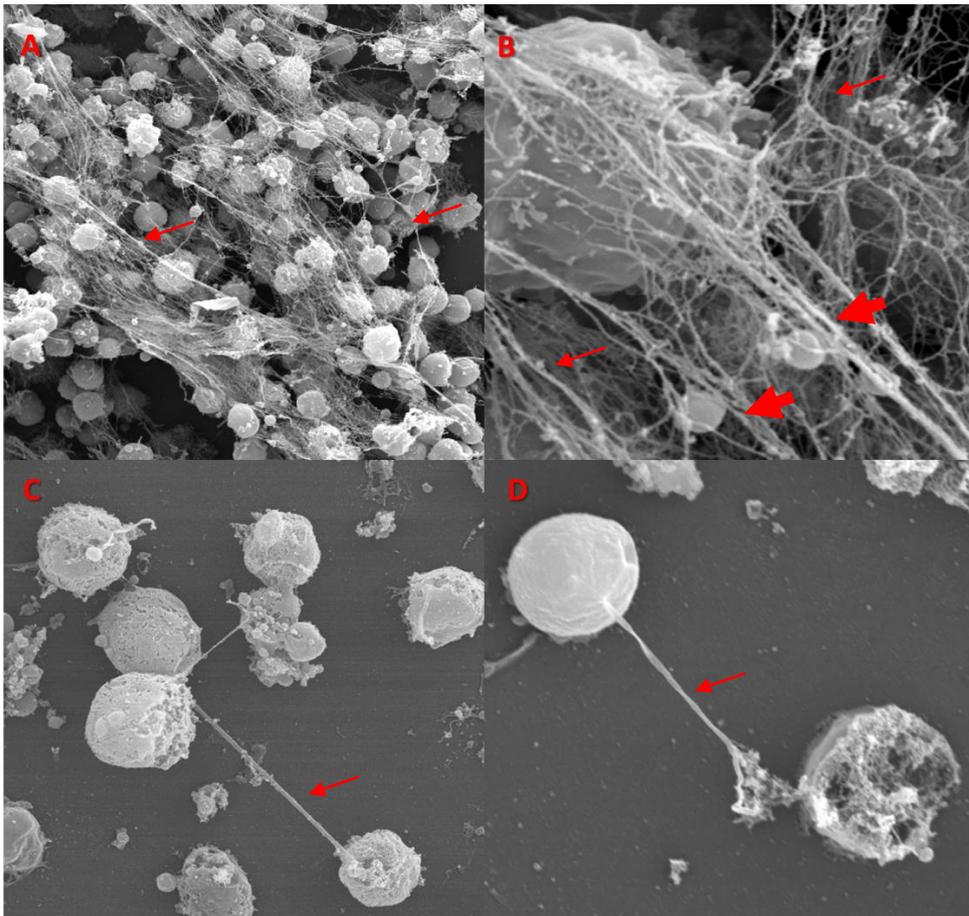


Figura 16: Caracterização das redes extracelulares de linfócitos TCD8⁺ por microscopia eletrônica de varredura. Linfócitos TCD8⁺ foram plaqueados 5×10^5 por poço e estimulados com anti-CD3/CD28 ($2 \mu\text{g}/1 \mu\text{g}$ por mL) por 48 horas a 37°C $5\% \text{CO}_2$. Após o estímulo as células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em cacodilado 0,2M. As lamínulas foram processadas para microscopia eletrônica de varredura e as imagens foram adquiridas. **(A)** Controle – 3000x e **(B)** controle – 10000x. **(C)** Células estimuladas – 3000x e **(D)** Células estimuladas -5000x. Setas finas = estruturas caracterizando a presença das redes. Setas grossas = Domínios globulares presos às redes.

3.5. Quantificação de DNA em sobrenadantes das culturas linfócitos TCD8⁺ humanos.

Uma vez caracterizada a produção de redes extracelulares por linfócitos TCD8⁺, resolvemos quantificar DNA no sobrenadante das culturas sob estímulo ou não de anti-CD3/CD28, em diferentes tempos de incubação. Na figura 17, podemos observar que praticamente não houve diferença entre o grupo estimulado e o controle no tempo de 16 horas. Já com 24 horas, o grupo controle parece apresentar uma concentração maior de DNA no sobrenadante da cultura quando comparado ao grupo estimulado. De forma similar, o grupo controle e estimulado após 24 parecem apresentar valores mais elevados de DNA do que o grupo controle e estimulado por 16 horas. Aparentemente, o grupo com incubação por 36 horas, apresentam valores próximos aos apresentados para o tempo de 16 horas. O tempo de 48 horas, tanto para o grupo controle quanto para o estimulado, aparentemente, apresentam os maiores valores. O grupo estimulado tendeu a aumentar quando comparado ao controle. Nosso dados indicam que o uso DNase resultou na redução da quantificação de DNA. Os grupos tratados com DNase parecem apresentar valores de DNA próximos, independentemente do tempo de estímulo e da concentração inicial de DNA antes do tratamento com a DNase.

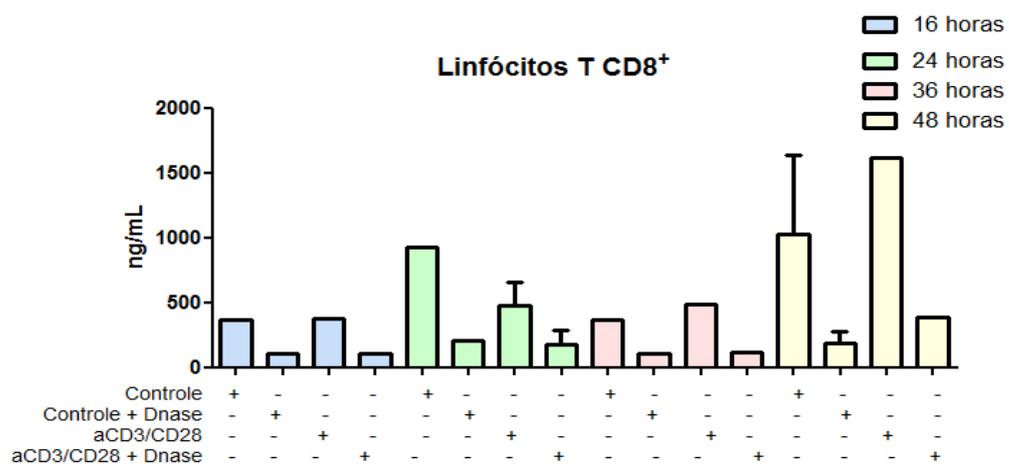


Figura 17: Quantificação de DNA no sobrenadante de culturas de linfócitos TCD8⁺. Linfócitos TCD8⁺ (1×10^6 por poço) foram estimulados ou não com anti-CD3/CD28 ($2 \mu\text{g}/1 \mu\text{g}$ por mL) por 16, 24 e 48 horas, 37°C $5\% \text{CO}_2$. Em seguida, as células foram centrifugadas e o sobrenadante coletado para dosagem de DNA por *Picogreen*. O DNA foi medido na ausência ou presença de estímulo e DNase (símbolos – e + indicam ausência ou presença, respectivamente). As barras representam a média dos experimentos realizados.

Discussão

Ao observar estruturas afiladas, semelhantes à redes extracelulares em algumas imagens de lesões de pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa, marcadas com DAPI, provenientes do banco de imagens do nosso grupo, surgiu a curiosidade de estudar melhor o que seriam essas estruturas. Dessa forma, procuramos quantificar a produção dessas redes nessas lesões, utilizando o *software Image J*. Entretanto, não foi possível o processamento desses dados uma vez que a intensidade do DAPI durante a aquisição das imagens foi alterada de imagem para imagem e a quantificação é realizada através do parâmetro intensidade média de fluorescência por área. Além disso, essas estruturas não eram o objetivo do trabalho no momento da captura das imagens. Dessa forma, a qualidade das imagens para essa análise não estava adequada. Diante desta impossibilidade, limitamo-nos, neste trabalho, a avaliar qualitativamente as imagens, procurando identificar lesões em que tais estruturas fossem evidentes e que as pudéssemos utilizar para a confirmação de sua natureza. Assim, após exame qualitativo, selecionamos algumas lesões e realizamos a marcação com anticorpo monoclonal anti-histona. O objetivo desta análise foi avaliar se as estruturas observadas como sendo redes extracelulares apresentavam marcação positiva para outro componente das redes, além do DNA corado pelo DAPI. As histonas são o segundo componente mais frequente das redes extracelulares, possuem ação microbicida e são capazes de matar a *Leishmania* (Guimarães-Costa et al., 2009; Gabriel et al., 2010). Decidimos estudar a presença das redes em lesões de pacientes com duas manifestações clínicas (cutânea ou mucosa) pois, de forma similar, nessas lesões é incomum a presença do parasito (Lessa et al, 2001) e, além disso, as lesões podem se agravar tornando-se desfigurantes. Como foi observado na figura 4, referente à lesão cutânea, e na figura 5, referente à mucosa, existe a presença da marcação com DAPI e anti-histona e sua co-localização. Sendo assim, concluímos que as lesões estudadas apresentavam estruturas cuja marcação positiva para DAPI e anti-histona indicam que sejam, de fato, redes extracelulares. Sendo assim, experimentos futuros serão realizados a fim de quantificar as redes nas lesões de pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa, aumentando o número de lesões

analisadas e quantificando a expressão dos componentes nas lesões de pacientes com diferentes formas clínicas. Acreditamos que várias perguntas importantes poderão ser respondidas com estes estudos, envolvendo a formação de redes nas lesões e a participação dessas estruturas na imunopatologia da leishmaniose tegumentar americana. Após quantificar as redes, poderemos associá-las à parâmetros clínicos, como o tamanho da lesão, intensidade do infiltrado inflamatório, produção de citocinas, dentre outros parâmetros clínicos e laboratoriais.

Guimarães-Costa e colaboradores evidenciaram em 2009 a presença das redes em lesões de pacientes infectados por *L. amazonensis*. Além da presença de DNA e histona foi observada também a presença de elastase, que é uma proteína específica do grânulo de neutrófilos indicando a origem neutrofílica da rede. Entretanto, trabalhos anteriores do nosso grupo (Faria et al., 2005; 2009) demonstraram o predomínio do infiltrado mononuclear das lesões de pacientes com LC e LM. De fato, mesmo em lesões cutâneas iniciais, a frequência de células polimorfonucleares é de apenas 2%, enquanto que linfócitos perfazem mais de 70% do infiltrado de lesões cutâneas ou mucosas (Faria et al., 2005, 2009). Dessa forma, acreditamos que os linfócitos são fortes candidatos a liberar as redes, contribuindo para a eliminação do parasito e imunopatologia da lesão. Além disso, espécies diferentes de parasitos podem estimular, de formas diferentes, as células presentes no infiltrado inflamatório induzindo a produção de rede por células diferentes. No trabalho de Guimarães-Costa, a espécie envolvida era *L. amazonensis* e a rede era de origem neutrofílica, enquanto que, na nossa hipótese, as redes liberadas nas lesões dos pacientes são de origem linfocitária e a espécie envolvida é *L. braziliensis*. Curiosamente, até os dias atuais, apenas células da resposta imune inata foram descritas como produtoras de ETs, como neutrófilos e macrófagos, tendo sido descrita a importância desse evento na contenção do patógeno e ação microbicida (Brinkmann, et al., 2004). A possibilidade de células do sistema imune adaptativo, como linfócitos T, também fazerem redes extracelulares nos permite expandir possibilidades sobre questões ainda não esclarecidas envolvidas na imunopatologia de diversas doenças e mesmo na função dessas células em condições fisiológicas. No caso da leishmaniose, não podemos afirmar que as redes observadas nos nossos resultados são as

responsáveis pela eliminação do parasito. Entretanto, acreditamos que essas estruturas são provenientes de linfócitos, podem ter ação leishmanicida e poderão ser responsáveis pelo perfil inflamatório no microambiente das lesões, levando à destruição tecidual. O trabalho de Marques e colaboradores, em 2014, demonstram que, em lesões hepáticas induzidas por drogas, ocorre a necrose oncótica que é a liberação e reconhecimento do conteúdo intracelular, amplificando a inflamação de lesões no fígado. Dentre estas moléculas, auto-DNA tem sido amplamente demonstrado como responsável por desencadear doenças inflamatórias e auto-imunes. De forma pioneira, Marques e colaboradores demonstrou a liberação de DNA por hepatócitos por um mecanismo diferente de necrose.

Alguns artigos já destacaram o papel nocivo das NETs na sepse e vasculite (Clarck et al., 2007). Em modelo murino de pneumonia pelo vírus da influenza, foi relatado que as redes extracelulares proveniente de neutrófilos contribuem para o agravamento da injúria pulmonar (Narasaraju et al., 2011). Dessa forma, mais estudos deverão ser feitos para comprovar o papel leishmanicida das redes extracelulares produzidas por linfócitos (lymphocytes extracellular traps- LETs) e seu papel prejudicial na progressão das lesões por parasitas como a *Leishmania*.

Diante dessa hipótese, decidimos estudar se os linfócitos, uma população majoritária, aproximadamente 2/3 das células nas lesões (Faria et al, 2005;2009), poderiam ser responsáveis pela produção das redes. Para isso, decidimos separar os linfócitos humanos da população total de células mononucleares utilizando gradiente de densidade. Uma vez obtidas as mononucleares, realizamos aderência para separar as células aderentes (em sua grande maioria monócitos e linfócitos B) das não aderentes (em sua maioria linfócitos T). Os monócitos são células capazes de realizar a adesão às placas e os linfócitos o fazem de forma muito menos eficiente. Dessa forma, obtivemos uma cultura rica em linfócitos. Para verificar o grau de pureza em nossa cultura, realizamos a marcação desses linfócitos com anticorpos monoclonais anti-CD3, marcador para linfócitos T e anti-CD14, que é uma molécula presente em grande quantidade na superfície de monócitos e em menor frequência na de neutrófilos (ausentes em nossa preparação de mononucleares). Pelos nossos resultados obtidos, pudemos verificar que 93%

das nossas células não aderentes provenientes da cultura eram linfócitos T. Os 7% remanescentes eram compostos por aproximadamente 1,5% de monócitos que não aderiram e o restante, provavelmente linfócitos B (figura 6). Após a verificação da pureza das nossas culturas, decidimos plaquear os linfócitos e estimulá-los com diferentes estímulos (Figura 7) como anti-CD3/CD28, PMA, e SEB.

Através da marcação com coloração histológica foi possível observar, em todas as culturas, fios finos que nos sugeriam a presença da rede, inclusive no grupo sem estímulo, embora em frequência muito menor do que nas culturas estimuladas. De forma bastante curiosa, a estrutura das “redes” apresentavam-se bastante distintas em culturas com os diferentes estímulos. As estruturas afiladas parecem conectar uma célula a outra, principalmente no estímulo SEB. Outra forma de rede parece ocorrer em forma dispersa ou “em nuvem” que são mais frequentes nos estímulos anti-CD3/CD28 e, principalmente PMA, comparando-se com o SEB, onde o predomínio foi das estruturas afiladas. Isso pode estar ocorrendo em função da natureza e especificidade dos estímulos: enquanto que o anti-CD3/CD28 estimula todos os linfócitos T (Azuma et al., 1993), o SEB estimula apenas linfócitos que expressam determinadas regiões Vbeta em seu TCR (Marrack et al., 1990) e o PMA estimula não apenas linfócitos mas também outras células presentes nas culturas (Picker et al., 1995). Além disso, não podemos descartar a participação de linfócitos B na possibilidade de realizar etose e na sua participação na apresentação de antígenos (Gray et al., 2007). Para certificar de que as redes, vistas pela coloração histológica, eram compostas por DNA, decidimos plaquear os linfócitos, e estimulá-los (Fig 8), processando as imagens para fluorescência utilizando dois corantes específicos para DNA (DAPI e PI).

Observando a figura 8 é possível constatar que os linfócitos, estimulados com LPS, são capazes de produzir redes extracelulares de DNA uma vez que a marcação para DNA, utilizando dois corantes diferentes, marcaram estruturas afiladas e alongadas, de tal forma que a sobreposição das duas marcações foi total. Nossos resultados estão de acordo com os resultados obtidos por outros autores na caracterização do evento de etose por diversos outros tipos celulares, que tem como principal componente da rede o DNA (Brinkmann, et

al., 2004; Yousefi et al., 2008; von Köckritz-Blickwede et al., 2008; Chow et al., 2010).

Esse DNA que é liberado para o meio extracelular em forma de rede é passível de ser quantificado. Essa forma de medida de “EtsDNA” (DNA proveniente das redes) é utilizada em diversos estudos (Brinkmann et al., 2004; Fuchs et al., 2007; Chow et al., 2010). Sendo assim, associado à evidência da presença de redes por imagens, realizamos a quantificação do DNA presente em sobrenadantes de culturas de linfócitos estimulados com LPS nos tempos de 24, 48 e 72 horas (fig 9). É possível observar que o LPS, além de estimular a produção de rede conforme observado pela coloração específica, leva à liberação de DNA para o meio. Esta liberação de DNA não aumentou com o crescente tempo de estímulo. Foi também possível detectar DNA no sobrenadante das culturas não estimuladas por 24hs. A quantificação de DNA no grupo controle foi alta, comprovando que, mesmo sem estímulo, os linfócitos são capazes de produzir redes. Uma possível explicação é a hipótese de que células em apoptose ou necrose existentes de forma “natural” sejam capazes de estimular os linfócitos a fazerem etose. Apesar de não mostrados nesta dissertação, experimentos utilizando diferentes concentrações de estaurosporina (droga indutora de apoptose) mostrou que a quantificação de DNA nessas culturas foi alta. Além disso, mesmo no grupo sem o tratamento com essa droga, foi possível ver que aproximadamente 5% das células estavam em apoptose (recente ou tardia). Isso fortalece nossa hipótese que estas células estariam sendo capazes de estimular o restante das células a fazerem LETs. Em virtude da grande quantidade de células necessária para realizar a quantificação de DNA, temos apenas o controle sem estímulo, no tempo de 24 horas. Mais experimentos serão feitos para acrescentar mais amostras ao estudo incluindo grupos sem estímulo para os demais tempos de estímulo.

Para avaliar se as populações CD4⁺ e CD8⁺ de linfócito T são capazes de fazer etose, realizamos a separação dessas populações por duas técnicas diferentes: citometria de fluxo (*sorting*) e seleção positiva por coluna magnética. Para avaliar o grau de pureza da separação pela seleção positiva, uma alíquota das culturas foi adquirida no FACS. Foi possível constatar que a separação utilizando-se coluna magnética levou a uma pureza significativa, uma vez que

obtivemos culturas enriquecidas com TCD4⁺ (mais de 90%) e com TCD8⁺ (mais de 80%) (figura 10). As células separadas por *sorting* foram utilizadas para realizar culturas que dariam origem às imagens produzidas por microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura. Essa técnica de separação nos garantiu que praticamente 100% das células são CD4⁺ ou CD8⁺. Pela figura 11, podemos observar que linfócitos TCD4⁺ separados por *sorting*, estimulados com anti CD3/CD28 foram capazes de emitir redes. Pode-se observar que a marcação com CFSE apresenta uma co-localização com o DAPI. A célula é permeável ao corante CFSE que, dentro das células tem seus grupos carboxilas clivados por esterases, o que torna o CFSE fluorescente e impermeável, de tal forma que permanece dentro da célula (Lyons e Parish, 1994). As ETs são formadas por um esqueleto de DNA e podem ser compostas por proteínas citoplasmáticas. Em alguns casos, os eosinófilos emitem redes de DNA mitocondrial, com ausência de proteínas citoplasmáticas, não ocasionando a morte da célula (Yousefi et al., 2008) e mecanismo similar pode ocorrer com neutrófilos (Yousefi et al., 2009, Pilsczek et al., 2010). A co-localização do corante CFSE e DAPI nas redes observadas em nosso estudo sugere que o conteúdo citoplasmático da célula passa a compor as redes o que nos permite concluir que ocorre a morte celular e as LETs são similares às descritas pela primeira vez em neutrófilos por Brinkmann em 2004, em mastócitos por von Köckritz-Blickwede, 2008 e em monócitos e macrófagos por Chow em 2010.

Através da análise por microscopia eletrônica de varredura de culturas de linfócitos TCD4⁺ (figura 12), separados por *sorting*, estimulados ou não com anti CD3/CD28, por 24 horas, foi possível observar a emissão das redes nos controles e no grupo estimulado. Podemos demonstrar a presença de redes extremamente finas, saindo de algumas células e que, às vezes, se conectam a outras células. No caso do grupo estimulado, podemos observar a ocorrência de redes dispersas, tipo “nuvens”. A microscopia eletrônica de varredura foi uma técnica importante na primeira descrição do evento de etose (Brinkmann et al., 2004). Nossos resultados são compatíveis e semelhantes aos dos demais trabalhos sobre etose (Brinkmann et al., 2004; von Köckritz-Blickwede et al., 2008), mostrando estruturas similares. Interessante observar que a “estrutura” das redes observadas no controle parece diferente daquelas

observadas nas culturas estimuladas. Pensamos na possibilidade de que, em linfócitos TCD4⁺, o estímulo realizado por linfócitos em apoptose estimule a produção de um tipo de rede em forma de fios, enquanto, na presença de anti CD3/CD28 ocorra a produção de redes em forma de “nuvens”. Mais estudos precisam ser realizados para avaliar a razão dessas diferenças.

A quantificação de DNA presente nos sobrenadantes das culturas de linfócito TCD4⁺ (figura 13), separadas por coluna magnética, indicou que o uso da DNase reduziu a quantificação de DNA nos grupos 24 horas estimulado e nos grupos controle e estimulado por 48 horas, além disso, houve diferença estatística ao comparar o grupo estimulado por 48 horas com o estimulado por 24 horas. Apesar de não ser estatisticamente significativa, a liberação de DNA parece aumentar com o aumento do tempo de estímulo (exceto para o tempo de 36 horas). Novos experimentos serão feitos para afirmar se ocorre um aumento na produção de redes em virtude do tempo de incubação e se existe alguma diferença para o grupo sem estímulo.

De formar similar ao TCD4⁺, linfócitos TCD8⁺ foram separados por *sorting*, plaqueados e estimulados com anti CD3/CD28. Pela figura 14 é possível observar que existe marcação para DNA (DAPI), a presença do corante CFSE e histona H3, de tal forma que fica demonstrado que linfócitos CD8⁺ também fazem etose aos serem estimulados com anti CD3/CD28 por 24 horas. A co-localização das marcações com DAPI, CFSE e histona H3 é muito interessante e nos permite concluir que as redes são de DNA, com histonas H3 presente na rede e que, além disso, há a presença de conteúdo citoplasmático associado à rede, como também observado em culturas de células CD4⁺. A marcação para histona H3 nos sugere que as redes formadas são com DNA nuclear, uma vez que DNA de origem mitocondrial é circular e não contém histonas participando do empacotamento do DNA (Binni, 2003; Yakes; Van Outen, 1997; Alvarez et al., 1997). Além disso, pela figura 15 é possível observar que linfócitos TCD8⁺ são capazes de produzir redes após 48 de estímulo com anti CD3/CD28. Nossos dados corroboram com outros trabalhos que descreveram as redes em outros tipos celulares (Brinkmann et al., 2004; Fuchs et al., 2007; Urban e Zychlinsky, 2007; von Kockritz-Blickwede e Nizet, 2009). Nossas imagens de microscopia eletrônica de varredura de linfócitos TCD8⁺ demonstram também que, na ausência de estímulo, os linfócitos CD8⁺

fazem etose. Além disso, podemos observar que as redes parecem conectar uma célula a outra. Observa-se também que a célula que emite a rede parece morfológicamente diferente da que recebe (figura 16). Nossos resultados são compatíveis e semelhantes aos dos demais trabalhos sobre etose (Brinkmann et al., 2004; von Köckritz-Blickwede et al., 2008). Comparando-se o tipo de rede observado nas culturas de células TCD4⁺ as de células TCD8⁺ purificadas, observa-se que a presença de redes do tipo “nuvens” são mais frequentes em linfócitos TCD4⁺ estimulados do que em linfócitos TCD8⁺ estimulados, no qual é mais comum redes ligando uma célula à outra. Este é um achado interessante que nos remete a uma importante pergunta: teriam essas redes funções diferentes? A quantificação do DNA no sobrenadante das culturas de células TCD8⁺ demonstrou a existência de DNA (figura 17) e o uso de DNase reduziu essa quantificação. Mais experimentos precisam ser feitos para aumentar o número de amostras quantificadas para que assim possamos de fato saber se existe diferença entre os tempos de incubação e se o estímulo é capaz de aumentar a produção de ETs. Dessa forma, poderemos também realizar comparações entre as quantificações de DNA liberados em redes por TCD4⁺ e TCD8⁺.

Nossos achados sugerem, pela primeira vez, que linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ humanos são capazes de produzir redes extracelulares de DNA. Muitos estudos, a partir daqui, serão realizados para compreender o papel dessas redes em processos fisiológicos e patológicos.

Do ponto de vista da leishmaniose, acreditamos que elas sejam um importante fator no controle do parasito na lesão causada pela infecção com *L. braziliensis* e que possam contribuir de forma significativa para a imunopatologia da doença, alimentando a inflamação. Considerando-se que células TCD4⁺ e TCD8⁺ estão presentes no infiltrado inflamatório das lesões, cabe avaliar se suas redes tem funções diferentes ou se comportam-se de forma diferente em lesões cutâneas *versus* mucosas. Transcendendo à leishmaniose, pretendemos investigar o papel destas estruturas, os mecanismos de seu surgimento e de sua liberação em estudos futuros.

Resumo dos resultados e Conclusão

Nosso achados demonstram que:

- É possível observar a presença de ETs em lesões de pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa através da marcação com DAPI e histona H3.
- Linfócitos humanos purificados de sangue periférico de indivíduos saudáveis são capazes de produzir redes extracelulares comprovado através da marcação com DAPI, PI e quantificação de DNA no sobrenadante das culturas.
- Linfócitos TCD4⁺ são capazes de fazer LETs evidenciados pela marcação com CFSE e DAPI, microscopia eletrônica de varredura, e quantificação de DNA no sobrenadante das culturas.
- Linfócitos TCD8⁺ são capazes de fazer LETs demonstrado através das marcações com CFSE, DAPI, Histona H3 e pela quantificação de DNA no sobrenadante das culturas.

Como conclusão geral, nosso trabalho mostra que linfócitos T humanos podem liberar redes extracelulares.

Referências

- ALTINCICEK, B., STOTZEL, S., WYGRECKA, M., PREISSNER, K. T., AND VILCINSKAS, A. Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects. **J. Immunol.** 181, 2705–2712, 2008.
- ALVAREZ, J.C. Characterization of human control region sequences for Spanish individuals in a forensic mtDNA data set. **Legal Medicine**, v.9, n.6, p.293-304, jul. 2007.
- AMATO, VS; ANDRADE, JRHF; DUARTE, MI. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. **Acta Trop**; 85: 39–49, 2003.
- ASSCHE, T.V.; DESCHACHT, M.; DA LUZ, R.A. I.; MAES, L.; COS, P. Leishmania–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology & Medicine**. 51: 337–351. 2011.
- AVERHOFF, P., M. KOLBE, A. ZYCHLINSKY, e Y. WEINRAUCH. Single residue determines the specificity of neutrophil elastase for *Shigella* virulence factors. **J. Mol. Biol.** 377:1053–1066, 2008.
- AZEREDO-COUTINHO, R.B.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, A.; CUPOLILLO, E.; QUINTELLA, L.P.; MADEIRA, M.F.; PACHECO, R.S.; VALETE-ROSALINO, C.M.; MENDONÇA, S.C. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 101, n. 7, p. 735-737, Julho. 2007.
- AULIK, N. A., HELLENBRAND, K. M., KISIELA, D., AND CZUPRYNSKI, C.J. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin binds cyclophilin D on bovine neutrophil mitochondria. **Microb. Pathog.** 50, 168–178, 2011.
- AULIK, N. A., HELLENBRAND, K. M., AND CZUPRYNSKI, C. J. *Mannheimia haemolytica* and its leukotoxin cause macrophage extracellular trap formation by bovine macrophages. **Infect. Immun.** 80,1923–1933, 2012.
- AZUMA M, ITO D, YAGITA H, OKUMURA K, PHILLIPS JH, LANIER LL, SOMOZA C. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. **Nature.** 4;366(6450):76-9. Nov 1993.
- BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; RIBEIRO DE JESUS, A.; DUTRA, W.O.; GOLLOB, K.J.; CARVALHO, E.M. Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. **Infect Immun**, v. 70, n. 12, p. 6734-6740, Dez. 2002.
- BARRAL, A; JESUS, AR; ALMEIDA, RP, *et al.* Evaluation of T-cell subsets in the lesion infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.**; 9: 487–97, 1987.
- BEITER, K., F. WARTHA, B. ALBIGER, S. NORMARK, A. ZYCHLINSKY, AND B. HENRIQUES- NORMARK.. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. **Curr. Biol.** 16:401–407, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2006.01.056>
- BERENDS, E.T.M., A.R. HORSWILL, N.M. HASTE, M. MONESTIER, V. NIZET, AND M. VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. **J. Innate Immun.** 2:576–586, 2010. <http://dx.doi.org/10.1159/000319909>
- BIANCHI, M., HAKKIM, A., BRINKMANN, V., SILER, U., SEGER, R. A., ZYCHLINSKY, A., *et al.* Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. **Blood**, 114, 2619–2622, 2009.

- BIANCHI, M., M.J. NIEMIEC, U. SILER, C.F. URBAN, AND J. REICHENBACH. Restoration of anti-*Aspergillus* defense by neutrophil extracellular traps in human chronic granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-independent. **J. Allergy Clin. Immunol.** 127:1243–1252.e7, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2011.01.021>
- BINNI, C. et al. Population data of mitochondrial DNA region HVII in individuals from Bologna (Italy). **International Congress Series**, v.1239, p.457-465, 2003.
- BRANITZKI-HEINEMANN, K., OKUMURA, C. Y., VOLLGER, L., KAWAKAMI, Y., KAWAKAMI, T., NAIM, H. Y., et al. A novel role for the transcription factor HIF-1alpha in the formation of mast cell extracellular traps. **Biochem. J.** 446, 159–163, 2012.
- BRINKMANN, V., U. REICHARD, C. GOOSMANN, B. FAULER, Y. UHLEMANN, D.S. WEISS, Y. WEINRAUCH, AND A. ZYCHLINSKY. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science.** 303:1532–1535, 2004. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1092385>
- BRUNS, S., KNIEMEYER, O., HASENBERG, M., AIMANIANDA, V., NIETZSCHE, S., THYWISSEN, A., et al. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* *in vitro* and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. **PLoS Pathog.** 6:e1000873, 2010. doi: 10.1371/journal.ppat.1000873
- BUCHANAN, J.T., A.J. SIMPSON, R.K. AZIZ, G.Y. LIU, S.A. KRISTIAN, M. KOTB, J. FERAMISCO, AND V. NIZET. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. **Curr. Biol.** 16:396–400, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/>
- CARVALHO, E. M. et al. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. **The Journal of infectious diseases**, v. 165, n. 3, p. 535-40, mar. 1992.
- CARVALHO, L.P.; PASSOS, S.; BACELLAR, O.; LESSA, M.; ALMEIDA, R.P.; MAGALHÃES, A.; DUTRA, W.O.; GOLLOBO, K.J.; MACHADO, P.; RIBEIRO DE JESUS, A. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis 2007. **Parasite Immunol**, v. 29, n. 5, p. 251-258, Mai. 2007.
- CASTES, M., AGNELLI, A. & RONDÓN, A.J. Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. **Clin. exp. Immunol.** v. 57, n. 2, p. 279-286. Ago 1984.
- CHOW, O.A., VON KOCKRITZ-BLICKWEDE, M., BRIGHT, A. T., HENSLER, M. E., ZINKERNAGEL, A. S., COGEN, A. L., et al. Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps. **Cell Host Microbe** 8, 445–454, 2010.
- CRAMER, T., YAMANISHI, Y., CLAUSEN, B. E., FORSTER, I., PAWLINSKI, R., MACKMAN, N., et al. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. **Cell** 112, 645–657, 2003.
- CHUAMMITRI P., OSTOJIC J., ANDREASEN C. B., REDMOND S. B., LAMONT S. J., PALIC D. Chicken heterophil extracellular traps (HETs): novel defense mechanism of chicken heterophils. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 129 126–131, 2009.
- DA-CRUZ, A.M.; BITTAR, R.; MATTOS M.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; NOGUEIRA, R.; PINHO-RIBEIRO, V.; AZEREDO-COUTINHO, R.B.; COUTINHO, S.G. T-Cell-Mediated Immune Responses in Patients with Cutaneous or Mucosal Leishmaniasis: Long-Term Evaluation after Therapy. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, n. 2, p. 251-256, Mar. 2002.
- DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 139-146, 2007

DE OLIVEIRA-NETO, M.P.; MATTOS, M.S.; PEREZ, M.A.; DA-CRUZ, A.M.; FERNANDES, O.; MOREIRA, J.; GONÇALVES-COSTA, S.C.; BRAHIN, L.R.; MENEZES, C.R.; PIRMEZ, C. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. **Int J Dermatol**, v. 39, n. 7, p. 506-514, Jul. 2000.

DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis** 27: 305-318, 2004.

FADEEL, B., AHLIN, A., HENTER, J. I., ORRENIUS, S., AND HAMPTON, M. B. Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. **Blood** 92, 4808–4818, 1998.

FARIA, D.R.; GOLLOB, K.J.; BARBOSA, J.Jr.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.R.; LESSA, H.; CARVALHO, L.P.; ROMANO-SILVA, M.A.; DE JESUS, A.R.; CARVALHO, E.M.; DUTRA, W.O. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infect Immun**, v. 73, n. 12, p. 7853-7859, Dez. 2005.

FARIA, D.R.; SOUZA, P.E.; DURÃES, F.V.; CARVALHO, E.M.; GOLLOB, K.J.; MACHADO, P.R.; DUTRA, W.O. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v. 31, n. 8, p. 432-439, Ago. 2009.

FAN, Z.; ZANG, Q. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity. **Cell Mol Immunol**, v. 2, n. 4, p. 259-264, Ago. 2005.

FEITOSA, M. M. Leishmaniose visceral: um desafio crescente. Boletim informativo

FUCHS TA, ABED U, GOOSMANN C, HURWITZ R, SCHULZE I, WAHN V et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **J Cell Biol**; 176: 231–241, 2007.

FURTADO T. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Machado- Pinto J(ed), **Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas**. Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro. p.319-328,1994.

GABRIEL, C., MCMASTER, W. R., GIRARD, D., AND DESCOTEAUX, A. *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. **J. Immunol.** 185, 4319–4327, 2010.

GUIMARAES-COSTA, A. B., NASCIMENTO, M. T., FROMENT, G. S., SOARES, R. P., MORGADO, F. N., CONCEICAO-SILVA, F., et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 106, 6748–6753, 2009.

GRAHAM BROGDENA, TANJA KRIMMLINGA, MIKOŁAJ ADAMEKA, HASSAN Y. NAIMB, DIETER STEINHAGENA, MAREN VON KÖCKRITZ-BLICKWEDEB. The effect of β -glucan on formation and functionality of neutrophil extracellular traps in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Dev Comp Immunol**. 44(2):280-5. doi: 10.1016/j.dci.2014.01.003. Jun, 2014.

GRAY, P.M.; REINER, S.L.; SMITH, D.F.; KAYE, P.M.; SCOTT, P. Antigen-experienced T cells limit the priming of naive T cells during infection with *Leishmania major*. **J Immunol**, v. 177, n. 2, p. 925-933, Jul 2006.

GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O.; COFFMAN, R.L. Early message expression of interleukin-4 and interferon-gamma, but not of interleukin-2 and interleukin-10, reflects later polarization of primary CD4+ T cell cultures. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 7, p. 1565-1570, Jul, 1996.

GOLLOB, K.J.; ANTONELLI, L.R.; FARIA, D.R.; KEESEN, T.S.; DUTRA, W.O. Immunoregulatory mechanisms and CD4⁺CD8⁻ (double negative) T cell subpopulations in

human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. **Int Immunopharmacol**, v. 8, n. 10, p. 1338-1343, Oct. 2008.

HAILU A, BAARLE D, KNOL GJ, BERHE N, MIEDEMA F, KAGER PA. T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and symptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. **Clin Immunol**, 117, 182-191, 2005.

HAMPTON, M. B., STAMENKOVIC, I., AND WINTERBOURN, C. C. Interaction with substrate sensitises caspase- 3 to inactivation by hydrogen peroxide. **FEBS Lett.** 517, 229–232, 2002.

HAWES, M.C.; CURLANGO-RIVERA, G.; WEN, F.; WHITE, G.J.; VENETTEN, H.D.; XIONG, Z. Extracellular DNA: the tip of root defenses? **Plant science: an international journal of experimental plant biology**. v. 180, (6), p. 741 – 745, 2011.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, Oct. 1999.

JONES, T.C.; JOHNSON, W.D.Jr.; BARRETTO, A.C.; LAGO, E.; BADARO, R.; CERF, B.; REED, S.G.; NETTO, E.M.; TADA, M.S.; FRANCA, T.F. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **J Infect Dis**, v. 156, n. 1, p. 73-83, Jul. 1987.

KAPUSCINSKI J. DAPI: a HAWES, M. C., CURLANGO-RIVERA, G., WEN, F., WHITE, G. J., VANETTEN, H. D., AND XIONG, Z. Extracellular DNA: the tip of root defenses? **Plant Sci.** 180, 741–745, 2011 DNA-specific fluorescent probe. **Biotech Histochem.** 70(5):220-33, set. 1995.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 8, p. 604-615, Jul. 2011.

KILLICK-KENDRICK R. The biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In: **Biology of Kinetoplastida**, vol.II (eds W.H.R. Lumsden & D. A. Evans) Academic Press, London/New York, 395-460, 1979.)

KILLICK-KENDRICK R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special references to the form infective to the vertebrate host. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée** 65 (suppl. 1): 37-42, 1990.

KILLICK-KENDRICK R, RIOUX JA. Intravectorial cycle of *Leishmania* in the sandflies. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée** 66 (suppl. 1): 71-74, 1991.

LAINSON R, SHAW JJ. New World Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* Species. In FEG Cox, JP Kreier, D Wakelin (eds), Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9th ed., Vol. 5 **Parasitology**, Arnold, London, p. 242-266, 1998.

LESSA, H.A.; MACHADO, P.; LIMA, F.; CRUZ, A.A.; BACELLAR, O.; GUERREIRO, J.; CARVALHO, E.M. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, n. 2, p. 87-89, Ago. 2001.

LESSA, M.M.; LESSA, H.A.; CASTRO, T.W.; OLIVEIRA, A.; SCHERIFER, A.; MACHADO, P.; CARVALHO, E.M. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 73, n. 6, p. 843-847, Nov. 2007.

LIEBERMAN, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 5, p. 361-370, Mai. 2003.

LIMA, HC; VASCONCELOS, AW; DAVID, JR, *et al.* American cutaneous leishmaniasis: *in situ* characterization of the cellular immune response with time. **Am J Trop Med Hyg**; 50: 743–7, 1994.

- LIN, A. M., RUBIN, C. J., KHANDPUR, R., WANG, J. Y., RIBLETT, M., YALAVARTHI, S., et al. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. **J. Immunol.** 187, 490–500, 2011.
- LJ PICKER , MK SINGH , Z ZDRAVESKI , JR TREER , SL WALDROP , PR BERGSTRESSER, VC MAINO. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry **Blood Aug** 86 (4) 1408-1419; 1995.
- LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. **Clin Immunol**, v. 114, n. 3, p. 256-265, Mar. 2005.
- LYONS, A.B. e PARISH, C.R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. **J. Immunol. Methods** 171:131-137, 1994.
- M. BARTNECK, H. A. KEUL, Z. K. GABRIELE, AND J. GROLL, "PHAGOCYTOSIS INDEPENDENT EXTRACELLULAR NANOPARTICLE CLEARANCE BY HUMAN IMMUNE CELLS," **Nano Letters**, vol. 10, no. 1, pp. 59–64, 2010.
- MARRACK, P.; KAPPLER, J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. **Science.** 248, 705–711. 1990
- MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L(V)b in Três Braços, Bahia-Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 27, n. 2, p. 93-101, Abr-Mai. 1994.
- MARTINOD K, FUCHS TA, ZITOMERSKY NL, WONG SL, DEMERS M, GALLANT M, WANG Y, WAGNER DD. PAD4-deficiency does not affect bacteremia in polymicrobial sepsis and ameliorates endotoxemic shock. **Blood.** 26. pii: blood-2014-07-587709. Jan, 2015.
- MAROOF, A.; BEATTIE, L.; KIRBY, A.; COLES, M.; KAYE, P.M. Dendritic cells matured by inflammation induce CD86-dependent priming of naive CD8⁺ T cells in the absence of their cognate peptide antigen. **J Immunol**, V. 183, N. 11, P. 7095-7103, Dez 2009.
- MCCORMICK, A., HEESEMANN, L., WAGENER, J., MARCOS, V., HARTL, D., LOEFFLER, J., et al. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. **Microbes Infect.** 12, 928–936, 2010.
- METZLER, K. D., FUCHS, T. A., NAUSEEF, W. M., REUMAUX, D., ROESLER, J., SCHULZE, I., et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. **Blood** 117, 953–959, 2011.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana, Diagnóstico Clínico e diferencial, primeira edição. Brasília-DF, 2006.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, segunda edição. Brasília-DF, 2007.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/lta/bases/ltabrnet.def>> Acesso em: 20 de dezembro de 2014.
- MOROS ZC, TAPIA FJ. Participación de los linfócitos T en la Leishmaniasis cutánea. **Dermatol Venez;** 25:19-28, 1987.
- MURRAY HW, BERMAN JD, DAVIES CR, SARAVIA NG. Advances in leishmaniasis. **Lancet** 366: 1561-1577. 2005.
- NARASARAJU, T.; YANG, E.; SAMY, R.P.; HIAN NG, H.; POH, W.P.; LIEW, A.; PHOON, M.C.; VAN ROOIJEN, N.; CHOW, V.T. Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular

Traps Contribute to Acute Lung Injury of Influenza Pneumonitis. **The American Journal of pathology**. v. 179, (1), p.199 – 210, 2011.

NEELI, I., KHAN, S. N., AND RADIC, M. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. **J. Immunol**. 180, 1895–1902, 2008.

NOVAIS FO, CARVALHO LP, GRAFF JW et al. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. **PLoS Pathog**. 9:e1003504. 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Epidemiology and control of Leishmaniasis. Technical Report Series. Geneva: WHO; 2010.

PARKER, H., A.M. ALBRETT, A.J. KETTLE, AND C.C. WINTERBOURN. Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. **J. Leukoc. Biol.** 91:369–376, 2012. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0711387>

PETERS, N.; SACKS, D. Immune privilege in sites of chronic infection: Leishmania and regulatory T cells. **Immunol Rev**, v. 213, p. 159-179, Oct. 2006.

PEYSSONNAUX, C., DATTA, V., CRAMER, T., DOEDENS, A., THEODORAKIS, E. A., GALLO, R. L., et al. HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. **J. Clin. Invest**. 115, 1806–1815, 2005.

PILSCZEK, F. H., SALINA, D., POON, K. K., FAHEY, C., YIPP, B. G., SIBLEY, C. D., et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. **J. Immunol**. 185, 7413–7425, 2010.

PINKOSKI, M.J.; GREEN, D.R. Granzyme A: the road less traveled. **Nat Immunol**, v. 4, n. 2, p. 106-108, Feb. 2003.

PIRMEZ, C; COOPER, C; PAES-OLIVEIRA, M, *et al*. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. **J Immunol**. 145: 3100–4, 1990.

PISCOPO TV, MALLIA AZZOPARDI C. Leishmaniasis. **Postgrad Med J** 83: 649-657. 2007.

PRATA, A.; SILVA, L. A. Calazar. In: COURA, J. R. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias, Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, v. 1, p. 713-732. 2005.

REITHINGER R, DUJARDIN JC, LOUZIR H, PIRMEZ C, ALEXANDER B, BROOKER S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**; 7:581-596, 2007.

RIBEIRO-DE-JESUS A, ALMEIDA RP, LESSA H, BACELLAR O, CARVALHO EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**. 31(1):143-8. Jan, 1998.

RITTIG MG, BOGDAN C. Leishmania – Host-Cell interaction: Complexities and alternative views. **Parasitol Today**, 16, 292-297, 2000.

ROSS, R. "Further notes on Leishman's bodies". **The British Medical Journal** 2 (2239) p. 1401, 1903.

SAITOH, T., KOMANO, J., SAITOH, Y., MISAWA, T., TAKAHAMA, M., KOZAKI, T., et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. **Cell Host Microbe** 12, 109–116, 2012.

SACKS, D. L. & PERKINS, IP. V. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sandflies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 34, 456-459. 1985.

SANTOS CDA S1, BOAVENTURA V, RIBEIRO CARDOSO C, TAVARES N, LORDELO MJ, NORONHA A, COSTA J, BORGES VM, DE OLIVEIRA CI, VAN WEYENBERGH J2, BARRAL A, BARRAL-NETTO M, BRODSKYN CI. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN γ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. **J Invest Dermatol.** 133, 1533-40. 2013.

SIMON, D., HOESLI, S., ROTH, N., STAEDLER, S., YOUSEFI, S., AND SIMON, H. U. Eosinophil extracellular DNA traps in skin diseases. **J. Allergy Clin. Immunol.** 127, 194–199, 2011.

SCHWARTZ, E.; HATZ, C.; BLUM, J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. **Lancet Infect Dis**, v. 6, n. 6, p. 342-349, Jun. 2006.

SES-MG. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.saude.mg.gov.br>> Acessado em 03 de janeiro de 2015.

SILVA, T. M. C. A resposta imuno-inflamatória na leishmaniose tegumentar humana. [S.l.] UFBA, 1999.

SOUZA, A.S.; GIUDICE, A.; PEREIRA, J.M.; GUIMARÃES, L.H.; RIBEIRO DE JESUS, A.; DE MOURA, T.R.; WILSON, M.E.; CARVALHO, E.M.; ALMEIDA, R.P. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF-alpha production. **BMC Infect Dis**, Jul. 2010.

TEIXEIRA, DIRCEU E.; BENCHIMOL, MARLENE; RODRIGUES, JULIANY C. F.; CREPALDI, PAULO H.; PIMENTA, PAULO F. P.; DE SOUZA, WANDERLEY. The Cell Biology of Leishmania: How to Teach Using Animations, **Plos Pathogens**, 9, (10), 2013. DOI : 10.1371/journal.ppat.1003594

URBAN, C., AND ZYCHLINSKY, A. Netting bacteria in sepsis. **Nat. Med.** 13, 403–404, 2007.

URBAN, C.F., D. ERMERT, M. SCHMID, U. ABU-ABED, C. GOOSMANN, W. NACKEN, V. BRINKMANN, P.R. JUNGBLUT, AND A. ZYCHLINSKY. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. **PLoS Pathog.** 5:e1000639. 2009. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000639>

VIANNIA G. Sobre uma espécie de Leishmania. **Brasil Médico** 25:411, 1912.

VIEIRA, MG; OLIVEIRA, F; ARRUDA, S *et al.* B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 97: 979–983, 2002.

VON KOCKRITZ-BLICKWEDE, M., GOLDMANN, O., THULIN, P., HEINEMANN, K., NORRBY-TEGLUND, A., ROHDE, M., et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. **Blood** 111, 3070–3080, 2008.

VON KOCKRITZ-BLICKWEDE, M., e NIZET, V. Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. **J. Mol. Med. (Berl.)** 87, 775–783, 2009.

XIN, L.; WANDERLEY, J.L.; WANG, Y.; VARGAS-INCHAUSTEGUI, D.A.; SOONG, L. The magnitude of CD4(+) T-cell activation rather than TCR diversity determines the outcome of *Leishmania* infection in mice. **Parasite Immunol**, v. 33, n. 3, p. 170-180, Mar. 2011.

YAKES, F.M.; VAN HOUTEN, B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persist longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.94, p.514-519, jan.1997.

YOUSEFI, S., GOLD, J. A., ANDINA, N., LEE, J. J., KELLY, A. M., KOZLOWSKI, E., et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. **Nat. Med.** 14, 949–953, 2008.

YOUSSEFI, S., MIHALACHE, C., KOZLOWSKI, E., SCHMID, I., AND SIMON, H. U. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. **Cell Death Differ.** 16, 1438–1444, 2009.

WALTERS LL. Leishmania differentiation in natural and unnatural sandfly host. **Journal of Eukaryotic Microbiology** 40: 1990. 196-206, 1993.

WANG, Y., LI, M., STADLER, S., CORRELL, S., LI, P., WANG, D., et al. Histone hypercitullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. **J. Cell Biol.** 184, 205–213, 2009.

WARDINI, A.B., GUIMARÃES-COSTA A.B., NASCIMENTO, M. T. C, et al., “Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus,” **Journal of General Virology**, vol. 91, no. 1, pp. 259–264, 2010.

WARTHA, F., K. BEITER, B. ALBIGER, J. FERNEBRO, A. ZYCHLINSKY, S. NORMARK, AND B. HENRIQUES-NORMARK. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. **Cell. Microbiol.** 9:1162–1171, 2007. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00857.x>

WEBSTER, S.J.; DAIGNEAULT, M.; BEWLEY, M.A.; PRESTON, J.A.; MARRIOTT; H.M.; . WALMSLEY, S.R.; READ, R.C.; WHYTE, M.K.B.; DOCKRELL, D.H. Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease. **Journal of Immunology**, v. 185 (5), p.2968 – 2979, 2010.

WEN, F., WHITE, G. J., VANETTEN, H. D., XIONG, Z., AND HAWES, M. C. (2009). Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection. **Plant Physiol.** 151, 820–829, 2009.

WHO – World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/disease/epidemiology/en/print.html>> Acessado em 10 de dezembro de 2014.