

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/02/2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Yohan Ricci Zonta

Ação da DNase produzida por *Paracoccidioides brasiliensis* em NETs (Neutrophil Extracellular Traps) liberadas por neutrófilos humanos em resposta ao fungo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio

Botucatu
2020

Yohan Ricci Zonta

Ação da DNase produzida por *Paracoccidioides brasiliensis* em NETs (Neutrophil Extracellular Traps) liberadas por neutrófilos humanos em resposta ao fungo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa.Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Zonta, Yohan Ricci.

Ação da DNase produzida por *Paracoccidioides brasiliensis* em NETs (Neutrophil Extracellular Traps) liberadas por neutrófilos humanos em resposta ao fungo / Yohan Ricci Zonta. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Luciane Alarcão Dias-Melicio

Capes: 21102007

1. *Paracoccidioidomicose*. 2. *Paracoccidioides brasiliensis*. 3. Neutrófilos. 4. Fungos. 5. Resposta imune.

Palavras-chave: DNase; NETs; Neutrófilos; *Paracoccidioides brasiliensis*; *Paracoccidioidomicose*.

Trabalho realizado no Laboratório de Imunopatologia e Agentes Infeciosos da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina, UNESP – Botucatu, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, que muitas vezes deixou seus sonhos de lado para acreditar nos meus.

A minha mãe e meu padrasto, Edilene e Luiz, por serem pessoas sensacionais e por me darem todo o suporte necessário para seguir meu caminho.

Aos meus avós, Rubens e Maria Zoraide, por estarem comigo sempre e me ensinarem a acreditar que tudo é possível.

Amo todos vocês.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por ter permitido que eu tivesse possibilidade de passar por diversas situações e aprender muito em cada uma delas.

À minha orientadora professora Luciane Alarcão Dias-Melicio, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa e por ter me proporcionado tantos momentos, podendo aprender em todos eles. Obrigado pela confiança, pelo respeito e por me incentivar sempre a seguir meus sonhos.

À toda minha família. Obrigado pela educação e pelo empenho em sempre me fazer seguir em frente, enfrentando meus medos e me dando a confiança para seguir em busca de meus objetivos.

À minha namorada, Lívia, por me ajudar sempre a superar os desafios e, principalmente, por entender os momentos de ausência devido à compromissos do Mestrado.

Aos meus amigos Lucas (Alterna), Eric (Japa), Yuri (Mosca) e Eric (Blastoise), pelo apoio e por todos os momentos de descontração que me ajudaram a passar pelos momentos difíceis.

Agradeço em especial ao Kaio (Bruce), por ter sido um irmão e companheiro de laboratório, me ajudando, ensinando e aprendendo comigo a cada momento. Obrigado por me ajudar todos os dias.

À minha amiga e ex-companheira de laboratório Amanda, por partilhar todo o seu conhecimento de trabalho e por mostrar que uma amizade pode ser tão forte em tão pouco tempo. Obrigado por toda a ajuda, dentro e fora do laboratório.

Às colegas de laboratório Larissa, Tati, Jessica, Gabrielly, Ana Laura e Carol por toda a ajuda e confiança. Obrigada pela convivência, sempre buscando a melhor oportunidade para aprender e partilhar experiências.

Ao professor Paul Kubes da University of Calgary, e seus alunos, em especial Rachel e Michelle, por serem sempre tão solícitos e dispostos a me ajudar sem medir esforços, compartilhando conhecimento e sabedoria.

À professora Márcia Guimarães da Silva e seus alunos, pela boa convivência e por todos os momentos de aprendizados e ensinamentos.

Ao professor Valdecir Farias Ximenes, por me receber em seu laboratório e me ajudar sempre tão solicitamente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia pelos momentos de aprendizado e ensinamentos.

À Vânia Soler, secretária do Programa de Pós-Graduação em Patologia, por me atender tão prontamente e sempre com tanta dedicação.

Aos funcionários que me auxiliaram em cada experimento, Carolina do Centro de Microscopia do Instituto de Biociências de Botucatu, Leandro e Igor da UNIPEX e aos funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, por permitirem sempre que eu pudesse ter as melhores oportunidades.

Aos voluntários que doaram sangue para o projeto, por permitirem que meu trabalho fosse realizado e a todos, que de alguma maneira, contribuíram para a realização desse projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo auxílio à pesquisa e bolsa de mestrado (Processos nº 2017/26230-3 e 2018/09706-7), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES. Esta bolsa foi concedida no âmbito do CONVÊNIO FAPESP/CAPES para a concessão de bolsas em instituições públicas e privadas sem fins lucrativos de ensino superior do Estado de São Paulo.

Resumo

Resumo

A paracoccidioidomicose é uma doença fúngica sistêmica, considerada endêmica na América Latina, principalmente no Brasil, Venezuela, Argentina e Colômbia. Seus agentes etiológicos, fungos do complexo *Paracoccidioides*, possuem habitat geográfico restrito, conídios como forma infectante e características termodimórficas. A infecção ocorre por inalação dos conídios infectantes, levando a uma resposta imune grave nos pulmões e, dependendo da forma clínica, disseminação para outros órgãos. Os neutrófilos (PMNs) são responsáveis por uma importante resposta de defesa, liberando NETs (armadilhas extracelulares de neutrófilos), que podem aprisionar e possivelmente destruir as leveduras. No entanto, foi descrito que alguns patógenos são capazes de escapar dessas estruturas de DNA liberando DNase como fator de virulência. Como diferentes padrões de NETs foram identificados em culturas de PMNs desafiadas com duas cepas de *Paracoccidioides brasiliensis*, procuramos avaliar se essas diferenças na conformação de NETs estariam relacionadas à capacidade de tais cepas produzirem DNase, ou uma proteína com atividade semelhante à DNase, que teria a capacidade de degradar as NETs. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi identificar se diferentes padrões de NETs liberados por PMNs humanos desafiados com cepas Pb18 (virulenta) e Pb265 (avirulenta) seriam correlacionados com a capacidade dos fungos em produzir DNase. Para este fim, os PMNs de indivíduos saudáveis foram isolados e desafiados *in vitro* com ambas as cepas de *P. brasiliensis*. A produção, liberação e conformação de NETs em resposta aos fungos foram avaliadas por Microscopia Confocal, Microscopia de Varredura e Imunoensaio para quantificação de NETs; a identificação de DNase fúngica foi avaliada por DNase TEST Agar e a expressão relativa de genes que codificariam proteínas hipotéticas identificadas no genoma dos fungos, foi investigada por RT-qPCR. Foi possível verificar a liberação de NETs pelos PMNs, mostrando diferentes conformações de NETs quando em contato com ambas as cepas do fungo. A cepa Pb18 induziu a liberação de NETs mais frouxas, maiores e com aspecto de uma rede aberta em comparação à cepa Pb265, que induziu a liberação de redes mais densas e compactas. Isto se dá, possivelmente, pela liberação de uma proteína semelhante à DNase pela cepa virulenta, fato confirmado pelo DNase Test Agar que demonstrou a capacidade de produção de enzima que causou a degradação do DNA do meio pela cepa virulenta, enquanto a cepa avirulenta não foi capaz de degradá-lo. Por fim, conseguimos identificar que os genes PADG_08528 e PADG_11161, que poderiam ser responsáveis por uma proteína DNase-like hipotética estavam sendo expressos nas culturas desafiadas com os fungos, sendo o gene PADG_08528 altamente expresso pela cepa virulenta, sugerindo que esse gene poderia ter uma contribuição maior para essa produção. Portanto, a cepa virulenta pode estar produzindo DNase como um importante mecanismo de escape do fungo para driblar ação das NETs, subvertendo assim esse importante mecanismo efetor de neutrófilos.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose; *Paracoccidioides brasiliensis*; Neutrófilos; NETs; DNase

Abstract

Abstract

Paracoccidioidomycosis is a systemic fungal disease, considered endemic in Latin America, mainly in Brazil, Venezuela, and Colombia. Its etiological agents, fungi of the *Paracoccidioides* complex, have restricted geographical habitat, conidia as an infectious form and thermodimorphic characteristics. The infection occurs by inhalation of infective conidia, leading to a severe immune response in the lungs and, depending on the clinical type, spread to other organs. Neutrophils (PMNs) are responsible for an important defense response, releasing NETs (Neutrophil Extracellular Traps), which can envelop and destroy yeasts. However, it has been reported that some pathogens can escape from these DNA structures by releasing DNase as a virulence factor. As different NET patterns were released in PMN cultures challenged with different *Paracoccidioides brasiliensis* strains, we sought to assess whether these differences in NETs would be related to the ability of such strains to produce DNase, or a protein with activity similar to DNase, which would have the ability to degrade NETs. Thus, the general objective of this study was to identify different patterns of NETs released by human PMNs challenged with Pb18 (virulent) and Pb265 (avirulent) strains and correlate this with the capacity of fungi to release DNase. To this end, isolated PMNs were isolated and challenged *in vitro* with both strains of *P. brasiliensis*. The production, release and configuration of NETs in response to fungi were evaluated by Confocal Microscopy, Scanning Microscopy and Immunoassay to quantify NETs; the identification of fungal DNase was evaluated by DNase TEST Agar and relative expression of genes encoding hypothetical proteins identified in the fungal genome, was investigated by RT-qPCR. It was possible to verify the release of NETs by PMNs, showing different forms of NETs when coming into contact with different strains of the fungus. A Pb18 strain induced the release of looser, larger NETs with the appearance of an open network compared to the Pb265 strain, which induced the release of denser and more compact NETs. Thus, it was identified that a virulent strain is possibly inducing looser and more degraded NETs, probably by releasing a DNase-like protein, a fact confirmed by the DNase Test Agar, which demonstrates the ability to produce enzymes that cause the degradation of DNA from the medium by the virulent strain, while an avirulent strain was not able to degrade it. Finally, we identified the expression of genes PADG_08528 and PADG_11161, probably involved with the production of hypothetical protein similar to DNase, being the gene PADG_08528 highly expressed in the virulent strain, suggesting that this gene could have a greater contribution to this production. Therefore, the virulent strain may be producing DNase as an important escape mechanism of the fungus to circumvent the action of NETs, thus subverting this important neutrophil effector mechanism.

Keywords: Paracoccidioidomycosis; *Paracoccidioides brasiliensis*; Neutrophils; NETs; DNase

Sumário

Capítulo I

1. Revisão Bibliográfica	2
1.1. Paracoccidioidomicose (PCM)	2
1.2. Neutrófilos e a Paracoccidioidomicose	6
1.3. Neutrophil Extracellular Traps (NETs).....	8
1.4. DNase.	14
2. Referências	18

Capítulo II

3. Manuscrito.....	30
Abstract	31
Introduction	32
Experimental Procedures	36
Results.....	40
Discussion	45
References.....	49
Figuras	53
4. Anexos	63

Capítulo 1

Revisão Bibliográfica

1. Revisão Bibliográfica

1.1 Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença fúngica sistêmica. É uma infecção considerada endêmica em toda a América Latina, com seus principais focos de infecção no Brasil, Venezuela e Colômbia, sendo uma importante causa de mortalidade e morbidade em suas regiões endêmicas, principalmente em áreas rurais¹⁻⁵. Os agentes etiológicos são fungos pertencentes ao Complexo de espécies *Paracoccidioides*. Anteriormente, este complexo de espécies era dividido em *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) e suas espécies crípticas S1, PS2, PS3 e PS4, e a espécie *Paracoccidioides lutzii* (*P. lutzii*), também chamado de Pb01-like, que recebeu este nome em homenagem ao médico Adolpho Lutz, que fez sua descrição em 1908⁶⁻⁸. Porém, mais recentemente, uma nova nomenclatura foi proposta, avaliando as diferenças morfológicas e genéticas entre as espécies, por meio de análises de polimorfismo molecular e reconstrução filogenética das leveduras e micélios das diferentes espécies crípticas, e propondo assim a divisão em cinco diferentes espécies, sendo elas *P. brasiliensis* (correspondente a antiga S1), *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3), *P. venezuelensis* (PS4) e *P. lutzii* (Pb01-like)⁹.

Por serem pertencentes à mesma família de outros agentes causadores de micoses sistêmicas, como *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*⁵, entre outros, as espécies de *Paracoccidioides* compartilham de características semelhantes a estes fungos, como o habitat geográfico restrito, a presença de conídios como forma infectante e sua característica termodimórfica^{3, 5}. O dimorfismo térmico se caracteriza pela capacidade do fungo em alterar sua morfologia de acordo com a temperatura a que está exposto, apresentando-se sob a forma de micélio quando exposto à temperatura ambiente (entre 4 e 28°C), e alterando sua morfologia para leveduras ao adentrar o corpo humano e ficar exposto a temperatura corporal (37°C). Este mecanismo serve como um importante fator de sobrevivência fúngica no meio ambiente^{3, 5,10}.

Um fato interessante, descrito por diversos artigos, é a identificação do fungo em diferentes espécies de animais, que serviriam como reservatórios naturais para o patógeno. Estudos já identificaram a presença de várias espécies de *Paracoccidioides* em tatus da espécie *Dasypus novemcinctus*, cães de áreas rurais, gado, e mais recentemente em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a espécie de peixe mais consumida nas regiões endêmicas de PCM no Brasil, entre outros animais¹¹⁻¹⁵.

A infecção por *Paracoccidioides spp* ocorre por meio da inalação dos conídios infectantes, produzidos pelos micélios em temperatura ambiente, presentes principalmente no solo^{10,16-20}. Os principais pacientes infectados são trabalhadores rurais, que devido à sua atividade laboral acabam ficando expostos aos micélios presentes no solo e, conseqüentemente, propensos à inalação dos conídios infectantes^{10,21}. Após a inalação, os conídios infectantes se direcionam aos pulmões, mais especificamente aos bronquíolos e alvéolos pulmonares, instalando-se nestes e transformando-se em leveduras, devido à temperatura corporal de 37°C, formando, assim, o chamado Complexo Pulmonar Primário^{21,22}. A partir da formação do complexo pulmonar, a infecção pode ser contida ou evoluir para as formas clínicas da doença. A PCM assintomática ou PCM infecção, trata-se de uma cura espontânea, na qual o sistema imune do paciente consegue eliminar o patógeno ou colocá-lo em estado de latência. Esta forma caracteriza-se pela ausência de sintomas e sinais clínicos da doença, porém pode ser identificada por meio de teste intradérmico realizado com antígeno paracoccidioidina, que identifica a resposta imune celular desenvolvida contra o fungo²³.

Caso a infecção não seja contida, ocorre progressão e disseminação do fungo por via linfo- hematogênica, atingindo outros órgãos, como baço, fígado e linfonodos, além de chegar à pele e mucosas, causando lesões graves, caracterizando, assim, a chamada PCM Doença¹⁰. Assim, é possível afirmar que a PCM pode variar desde uma forma assintomática até uma forma sintomática, grave, disseminada pelo organismo e potencialmente fatal^{4,5,16}.

A forma sintomática e disseminada ainda é dividida em duas formas clínicas, caracterizadas e diferenciadas de acordo com a faixa etária dos pacientes e dos tecidos e órgãos acometidos no organismo^{16,24}. A chamada Forma Aguda/Subaguda ou forma juvenil, é comum em pacientes mais jovens, principalmente crianças e jovens adultos, de ambos os sexos. Nesta forma, o fungo apresenta tropismo pelo sistema fagocítico-

mononuclear, atingindo fígado, baço e linfonodos, causando sintomas como linfonodomegalia e hepatoesplenomegalia, sendo considerada a forma mais grave da doença, atingindo, entretanto, apenas 5%-25% dos pacientes infectados¹⁶. Já a Forma Crônica apresenta uma progressão gradual e lenta, afetando 75%-95% dos pacientes infectados, principalmente adultos do sexo masculino, com duração prolongada, apresentando as lesões mais comumente em pulmões, mucosas e pele^{16,25,26}. Esta forma apresenta-se principalmente na forma de lesões crônicas nos pulmões, levando a uma fibrose pulmonar, que pode ser identificada por Tomografia Computadorizada de Alta Resolução (HRCT) como “Lesões em Vidro Fosco”²⁷. Além disso, podem ocorrer lesões em mucosas, principalmente nos lábios e gengivas, chamadas de Estomatite Muriforme²⁸. Em mulheres, este desenvolvimento da doença é raro, uma vez que a transformação dos conídios infectantes em leveduras é dificultada por um mecanismo baseado na ação de hormônios femininos como o estrógeno²⁹.

Nos pulmões, após formação do Complexo Pulmonar Primário, sob o ponto de vista histopatológico, ocorre a formação de granuloma, lesão caracterizada pela agregação de macrófagos diferenciados em células epitelióides e células gigantes de Langhans (multinucleadas), que aprisionam as leveduras, com o objetivo de impedir sua disseminação³⁰. Estas lesões podem ser encontradas em ambas as formas da doença, atingindo pulmões, mucosas e o sistema fagocítico-mononuclear (fígado, baço e linfonodos). Entretanto, as lesões pulmonares e mucosas são pouco comuns na forma Aguda/Subaguda^{16,25,26,31}.

Após a inalação dos conídios, a instalação, o desenvolvimento e a progressão da doença no organismo vão depender de diversos fatores, intrínsecos ao indivíduo e ao fungo. Os fatores relacionados ao paciente podem ser descritos como a idade, o sexo, os fatores genéticos e principalmente o comprometimento do sistema imunológico do indivíduo, enquanto os fatores intrínsecos ao fungo dependem principalmente dos fatores de virulência e de sua composição antigênica^{25,32,33}. Como a progressão clínica da doença depende diretamente da resposta imune do paciente, diversos estudos foram conduzidos para verificar os padrões de resposta. Sabemos, por exemplo, que o padrão de resposta de resistência ao *P. brasiliensis* é mediado quase que predominantemente por uma resposta T_H1 , enquanto o padrão de susceptibilidade à doença é mediado por um padrão de resposta predominante T_H2 ³⁴. Dessa forma, a resposta imune contra o *P. brasiliensis*

vem sendo avaliada por diversos estudos, com o objetivo de entender melhor como o sistema imune combate o processo infeccioso causado pelo fungo^{25,34,35,36}.

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do corpo contra a entrada de diversos microrganismos, como o *P. brasiliensis* por exemplo. Esta resposta é composta por diversos tipos celulares que compõe uma importante barreira contra as infecções, que por meio da expressão de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) são capazes de reconhecer os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), e assim, produzir e liberar citocinas pró e anti-inflamatórias. Assim, essas células são capazes de eliminar o patógeno invasor à partir da ativação de diversos mecanismos, como a fagocitose e o *burst* oxidativo, com liberação de metabólitos como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o óxido nítrico (NO), dentre outros³⁷.

Os neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, como células fagocíticas, desempenham um importante papel no combate aos fungos patogênicos que invadem o organismo. Além do processo de fagocitose, que demonstra-se extremamente importante no combate a estes fungos, a atividade fungicida e a modulação de resposta inflamatória também merecem destaque³⁸⁻⁴⁹. É importante ressaltar que, para que esta resposta inflamatória seja ativada de forma eficaz, é necessária a modulação da mesma pelas citocinas IFN- γ , TNF- α e GM-CSF⁴⁰⁻⁴⁷.

Outro fato interessante é a diferença entre as respostas imunológicas que levam à progressão da doença para fase Aguda/Subaguda e Crônica. Estudos demonstraram que a PCM-Infecção ou assintomática é caracterizada por um perfil de resposta T_h1³⁴, associado a altos níveis de IFN- γ e TNF- α , citocinas extremamente importantes na ativação de macrófagos para a promoção de uma resposta imune eficaz contra o fungo^{34,50,51}. A forma aguda/subaguda é caracterizada por um perfil de resposta T_h2 e T_h9, em adição a liberação de IL-4, IL-5, TGF- β , IL-9 e IL-21, ocorrendo um processo de eosinofilia e produção/liberação de anticorpos pelas células B (IgE e IgG4)^{34,52,53}. Por fim, a forma crônica se apresenta por meio de um perfil de resposta imunológica do tipo T_h17 e T_h22, associado a uma produção e liberação de IL-17 e IL-12. Este perfil, apesar de promover uma resistência parcial em um primeiro momento, leva a danos teciduais graves e fibrose tecidual, gerando os sintomas característicos desta forma da doença^{23,25,34}.

Desta forma, como os neutrófilos são uma das primeiras células da linha de defesa que atingem o sítio de infecção para combater o fungo quando este adentra o organismo, estudos recentes tem focado no papel destas células na PCM, tanto como células efetoras quanto moduladoras da resposta ao fungo, uma vez que tanto nas lesões quanto nos infiltrados inflamatórios presentes ao redor das lesões encontra-se uma grande concentração de células polimorfonucleares, o que demonstra um envolvimento intenso destas células no combate ao fungo^{35,48,49}.

1.2 Paracoccidioidomicose e neutrófilos

Neutrófilos, ou como também são conhecidos, granulócitos polimorfonucleares (PMNs), são células do sistema imune inato, conhecidas como a primeira linha de defesa do organismo contra a invasão de microrganismos. Suas características mais importantes são seu núcleo, que apresenta-se de forma multissegmentada, ou seja, dividida em lóbulos, e a presença de grânulos em seu citoplasma, que são divididos em primários, secundários e terciários, e diferem entre si devido ao seu conteúdo. São originados na medula óssea, a partir de células mielóides precursoras⁵⁴.

Cerca de 50 a 70% dos leucócitos circulantes no organismo são neutrófilos, e suas funções de proteção contra agentes patogênicos são efetuadas após seu recrutamento para o local da infecção. Este recrutamento se dá por meio da liberação de IL-8 e de *macrophage inflammatory protein-1-alpha* (MIP-1 α)^{37, 55,56}. Durante o processo infeccioso, ocorre a liberação de citocinas inflamatórias IL-1 e TNF- α , que induzem as células do endotélio vascular a expressarem moléculas de adesão em sua superfície, como as selectinas. Os neutrófilos circulantes na corrente sanguínea aderem ao endotélio e são atraídos ao local de interesse pelas quimiocinas secretadas. Para tanto, ocorre o processo de “rolamento celular” pela parede do vaso até o momento da adesão firme mediada pela ação das quimiocinas sobre a conformação de integrinas pelas células, e início de migração dos neutrófilos para o tecido alvo, processo este chamado de diapedese, pelo qual os neutrófilos passam através das junções das células endoteliais e atingem a área de infecção^{37,57-60}.

Ao atingir o local da infecção e entrar em contato com os microrganismos, os neutrófilos iniciam os processos de combate e eliminação dos patógenos por vários processos⁶¹. Um destes processos, sendo uma das principais funções dos neutrófilos, é a fagocitose. Ao entrar em contato com o patógeno e ter seus receptores de membrana ativados, os neutrófilos emitem prolongamentos de sua membrana, conhecidos por pseudópodes, que envolvem o agente agressor e formam vesículas intracelulares, chamadas de fagossomos. Em seguida, ocorre uma fusão das vesículas com os grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos, que liberam seus conteúdos no interior do fagossomo, formando assim o fagolisossomo, que levará a morte do microrganismo, mediada por mecanismos dependentes e independentes de oxigênio⁶²⁻⁶⁴.

Primeiramente, os mecanismos dependentes de oxigênio, muito importantes no processo de eliminação do patógeno, baseiam-se na produção e liberação de ânions superóxido (O_2^-). Este processo, mediado pela enzima NADPH oxidase, consiste na liberação destes ânions por neutrófilos ativados. Após a liberação, o ânion O_2^- transforma-se, quando em contato com água, em H_2O_2 e radical hidroxila ($OH^\cdot$), derivados tóxicos de oxigênio⁶⁵. Além disso, quando catalisada pela mieloperoxidase, um componente importante de grânulos citoplasmáticos de PMNs, nos fagolisossomos, os derivados de oxigênio formam ácido hipocloroso (HClO), sendo este também, um ácido importante no processo de morte dos microrganismos fagocitados⁶⁵⁻⁶⁷. Diversos estudos já demonstraram que os derivados de oxigênio são extremamente importantes no combate a microrganismos, dentre eles, o próprio *P. brasiliensis*⁶⁸⁻⁷¹.

Os mecanismos não dependentes de oxigênio baseiam-se na liberação dos conteúdos de grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos. Estes grânulos são divididos em primários, secundários e terciários, sendo que cada tipo possui em seu interior componentes diferentes, sendo enzimas e proteínas com atividades microbicidas. Os grânulos primários, também chamados de grânulos azurófilos, contêm mieloperoxidase (MPO), responsável pela conversão dos derivados de oxigênio em ácido hipocloroso, além de lisozimas, proteases (como a elastase) e peptídeos microbianos. Os secundários são compostos por collagenases e lactoferrina e os terciários, por gelatinases⁷².

Um dos primeiros estudos descrevendo o envolvimento de neutrófilos na resposta imune contra a infecção por *P. brasiliensis* demonstrou a presença de PMNs no sítio de infecção 24 horas após a inoculação do fungo. Isso demonstrou que os

neutrófilos são a primeira linha de defesa do organismo contra esta infecção, sendo as primeiras células do sistema imune a atingir o local e iniciar o processo de combate ao microrganismo⁷³. Após este estudo, diversos outros trabalhos demonstraram a presença de neutrófilos no sítio de inflamação e em granulomas, tanto em modelos experimentais quanto em humanos^{35,74,75}.

Com o tempo, reconhecendo-se a provável importância dessas células na PCM, diversos estudos tiveram por objetivo avaliar os mecanismos de morte fúngica intracelular comandada pelos neutrófilos. O *killing* induzido por mecanismos dependentes ou não de oxigênio são extremamente importantes para o processo de combate à infecção por *P. brasiliensis* no organismo. Porém, como as leveduras do fungo apresentam um tamanho significativamente maior que os neutrófilos⁷⁶, o processo de fagocitose que precede este tipo de morte celular acaba sendo dificultado. Um estudo já descreveu que, quando um microrganismo apresenta tamanho muito elevado, os neutrófilos encontram outra forma de combatê-los. Este outro mecanismo de combate a agentes patogênicos é conhecido como NETose, um processo que consiste na liberação de Redes Extracelulares de Neutrófilos, ou como foi primeiramente descrita, Neutrophil Extracellular Traps (NETs)^{77,78}.

1.3 Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

Como foi citado anteriormente, em 2004 foi descrito um novo processo de combate a microrganismos por parte dos neutrófilos. Este processo foi entendido inicialmente como sendo um processo de morte dos PMNs, seguida da liberação de redes extracelulares, formadas por cromatina descondensada e componentes granulares, as quais foram chamadas de Neutrophil Extracellular Traps (NETs)⁷⁷. O processo de liberação dessas redes, chamado de NETose, consiste em um processo no qual os neutrófilos são ativados e liberam redes para o meio extracelular, compostas de seu conteúdo nuclear (cromatina descondensada e histonas) conjugadas aos componentes de grânulos citoplasmáticos (Mieloperoxidase, elastase e catepsina G, por exemplo). Estas redes têm por função aprisionar os microrganismos e matá-los, por meio das proteínas

granulares presentes nelas, ou simplesmente capturá-los para impedir a disseminação e permitir que outras células do sistema imune possam atuar⁷⁷.

Estas NETs são estruturas frágeis, formadas por fibras de 15 a 17nm de diâmetro de DNA, com domínios globulares de 25nm, agrupadas em forma de rede. Este processo foi descrito como sendo desencadeado por diversos estímulos, como IL-8, bactérias gram-positivas e negativas e fungos, além do PMA (Phorbol Myristate Acetate), um forte ativador de resposta imune⁷⁷⁻⁷⁹. Com a descoberta das NETs, diversos estudos iniciaram a busca por estas estruturas em culturas de neutrófilos desafiadas com outros microrganismos, além de outros possíveis estimuladores de sua liberação⁷⁸⁻⁸².

Além de estudos envolvendo humanos, as NETs já foram identificadas em camundongos, gatos, bovinos, cavalos e peixes. Um estudo recente descreveu, inclusive, a produção e liberação de NETs em seres invertebrados, mostrando que a liberação das redes é um mecanismo evolutivo importante para a sobrevivência das espécies, sendo conservado ao longo de vários anos pelos neutrófilos⁷⁸⁻⁸⁵.

Apesar de ter sido inicialmente descrita em neutrófilos, surgindo disso o nome NETs, a liberação das redes extracelulares, eu simplesmente ETs, foram descritas em diversas células do sistema imune, tais como monócitos, macrófagos, eosinófilos, basófilos e mastócitos⁸⁶⁻⁹².

O processo de formação e liberação das NETs conta com o envolvimento de conteúdos nucleares e granulares. Os conteúdos nucleares são basicamente histonas associadas a cromatina descondensada. Já os conteúdos granulares são, basicamente, elastase, mieloperoxidase (MPO), calprotectina e outras proteínas do citoesqueleto, citosol, pentraxina-3 (PTX-3), catalase e enzimas glicolíticas^{77,93-97}. Dentre todas as enzimas e proteínas pertencentes aos componentes granulares, a elastase e MPO desempenham um papel importante na deflagração do processo de Netose. Ambas são extremamente importantes no processo de citrunilação das histonas e descondensação da cromatina, uma vez que degradam a ligação entre as histonas e iniciam o processo de formação das redes^{95,96,98}. Estudos indicam que os receptores envolvidos no processo de Netose são, principalmente, dos tipos Fc e TLRs (Toll Like Receptors), além de contar com o envolvimento de citocinas^{99,100}.

O processo de liberação das NETs, descrito por Brinkmann et al, 2004 e Fuchs et al, 2007, consiste em alguns passos que ocorrem no interior da célula. Primeiramente, ocorre a estimulação de receptores de membrana dos neutrófilos pelos agentes patogênicos. Com o estímulo, a célula sofre achatamento e adesão ao substrato. Após esta estimulação, se inicia o processo de citrunilação das histonas, mediado pela MPO e elastase. Este processo consiste na perda estrutural e funcional das histonas, levando ao início do processo de descondensação da cromatina. Com a descondensação, a célula perde seu aspecto multinuclear e passa a ter apenas um núcleo, ao mesmo tempo em que os grânulos citoplasmáticos começam a se degradar. Por fim, o núcleo começa a se desfazer em forma de vesículas, que se fundem aos grânulos citoplasmáticos e se direcionam à membrana celular, onde, com a degradação da membrana e formação de poros na mesma, estas vesículas serão eliminadas do interior da célula e, no exterior, formarão as chamadas NETs^{77,99}.

O processo de Netose, em suas primeiras descrições, era tomado como um processo de morte celular, uma vez que o núcleo dos neutrófilos era totalmente desfeito e sua membrana celular, degradada. Um dos primeiros estudos envolvendo NETs verificou que, após a ativação dos PMNs com *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), observou-se diversas alterações no núcleo, citoplasma e membrana dos neutrófilos, sendo que estas alterações eram incompatíveis com a sobrevivência da célula. Além disso, este mesmo estudo demonstrou as diferenças entre este processo e outros processos de morte celular⁹⁹. Um fato importante é que o processo de Netose diferencia-se dos outros processos de morte celular, como apoptose e necrose. A diferença em relação à apoptose dá-se pelas ausências da fragmentação do DNA e da exposição de fosfatidilserina, enquanto a diferença em relação à necrose dá-se pela ausência da manutenção da integridade do envelope nuclear, que não ocorre na Netose⁹⁹⁻¹⁰⁰.

Entretanto, um estudo publicado em 2013 chamou a atenção em relação às NETs demonstrando resultados interessantes¹⁰¹. Este estudo mostrava que o processo de Netose, até então conhecido como um processo de morte celular, poderia não envolver necessariamente a morte dos neutrófilos. Yipp e Kubes (2013) demonstraram que o processo de liberação das redes extracelulares poderia ser dividido em dois processos diferenciados. O primeiro consistiria no processo descrito anteriormente por Fuchs et al. (2007), chamado agora de Netose Suicida⁹⁹, enquanto o novo processo, descrito por estes autores, seria chamado de Netose Vital. Este novo processo demonstrou a

capacidade dos neutrófilos que ao liberarem NETs, mantinham a integridade estrutural suficiente para exercer suas funções normais. Este processo dá-se pela formação de vesículas na membrana nuclear, contendo apenas parte do conteúdo nuclear. Estas vesículas direcionam-se à membrana e sofrem processo de extrusão para o meio extracelular, sem que ocorra a degradação da membrana, o que causaria a morte celular^{101,102}. Um estudo, publicado em 2009, demonstrou a capacidade dos neutrófilos em liberarem NETs a partir de conteúdo genético mitocondrial, corroborando, assim, os resultados publicados em 2013¹⁰³.

Um indutor conhecido da formação e liberação das NETs é o PMA (Phorbol Miristato Acetato), uma molécula sintética responsável pela ativação da Proteína C Quinase (PKC). Desde o primeiro estudo sobre NETs, publicado em 2004, o PMA já foi descrito como um estimulador do sistema imune e indutor da liberação destas redes⁷⁶. Após este artigo, diversos outros autores vêm utilizando PMA como controle positivo para seus experimentos envolvendo as redes extracelulares^{49,94,95}. O mecanismo de liberação de NETs induzido pelo PMA está ligado diretamente à produção de EROs (Espécies Reativas de Oxigênio), que são essenciais para o processo de produção e liberação das redes^{104,105}.

A atividade de EROs no processo de liberação de redes extracelulares já foi descrito por diversos trabalhos. Um dos estudos demonstrou que pacientes com deficiência na produção da enzima NADPH oxidase apresentavam uma capacidade diminuída na produção e liberação de NETs quando em contato com o agente patogênico *Aspergillus nidulans*¹⁰⁶. Outro estudo demonstrou que a capacidade de eliminar agentes patogênicos das NETs era ampliada quando em contato com H₂O¹⁰⁷.

Em 15 anos de estudos, diversos microrganismos foram descritos como capazes de induzir a liberação de redes extracelulares por células do sistema imune. Dentre os organismos, podemos citar *S. aureus*, *Candida albicans*, *Leishmania amazonensis*, entre outros^{77,94,108}. A função principal das redes, de eliminar os patógenos, foi demonstrada por diversos mecanismos, como a atuação das histonas e elastase presentes nas NETs, além da atuação de outros mecanismos mediados por proteínas granulares, como a calprotectina, que apresenta atividade antifúngica^{94,109}.

A função secundária das NETs, de aprisionar os microrganismos, foi foco de diversos estudos, que demonstraram esta ação contra diversos agentes patogênicos,

como: *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), *S. aureus*, *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) e *P. brasiliensis*, entre outros^{48,49,77,110-113}. Como estes microrganismos apresentam mecanismos de escape das redes, a função das NETs fica restrito apenas ao aprisionamento, permitindo que outras células do sistema imune possam chegar ao local e desenvolver sua atividade microbicida¹¹².

Um fato importante é que, até pouco tempo, as NETs apresentavam-se como um mecanismo benéfico, ajudando no controle e eliminação de agentes patogênicos do organismo, e funcionando como um mecanismo eficaz do sistema imune no combate às infecções. Porém, estudos recentes identificaram a presença de redes extracelulares em diversas condições patológicas humanas. Fuchs et al, em 2010, demonstraram que as NETs têm capacidade de promover uma adesão e agregação plaquetária, causada principalmente pelas histonas presentes nas redes, além de servir como uma região de depósito de fibrina, promovendo a organização de um trombo e iniciando, assim, um processo de trombose¹¹⁴. Somado a isso, outro estudo identificou a presença de DNA extracelular livre no plasma em casos de Trombose Venosa Profunda (TVP)^{114,115}.

Em relação às doenças autoimunes, as NETs já foram identificadas como causadoras ou intensificadoras, participando da patogenia de algumas doenças bem como da etiologia. Isso ocorre, uma vez que alguns componentes das redes podem ser identificados pelo organismo como componente estranho, iniciando assim uma resposta autoimune. Este mecanismo já foi identificado em estudos de Psoríase, Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLE) e, mais recentemente, em Hidradenite Supurativa (HS). Nos estudos de SLE, foram encontrados anticorpos contra antígenos nucleares, como DNA de dupla fita e histonas. Como estes são os principais componentes das NETs, somados ao elevado nível de proteínas granulares no sangue, a presença de NETs nas lesões teciduais era grande, o que causava um aumento significativo no dano causado ao tecido^{116,117}. Outro estudo demonstrou que pacientes que sofriam de Psoríase, apresentavam um grande número de PMNs e mastócitos nas áreas de lesão, associado ao aumento de IL-17 nas lesões. A presença de IL-17 já foi descrita como um fator agravante em doenças autoimunes, contribuindo para o aumento da resposta imune no local das lesões¹¹⁸. Por fim, recentemente foi publicado um estudo avaliando o papel das NETs na Hidradenite Supurativa, uma doença autoimune incapacitante que causa lesões de pele semelhante a abscessos. Neste estudo, publicado em 2019, a presença de inúmeros neutrófilos foi identificada na área das lesões, além de uma grande quantidade

de NETs. Um fato interessante descrito pelo artigo foi que os neutrófilos de sangue periférico de pacientes que sofrem de HS apresentam uma tendência muito maior de liberar NETs ao menor estímulo, quando comparados com neutrófilos de pacientes saudáveis¹¹⁹.

Focando um pouco na relação das NETs com o fungo *P. brasiliensis*, estudos sobre esse processo iniciaram-se recentemente, uma vez que existem diversos artigos avaliando a interação entre as redes extracelulares e fungos patogênicos, como a interação das NETs com *C. albicans*¹⁰⁵, *Aspergillus fumigatus*¹⁰⁶ e *Cryptococcus neoformans*¹²⁰, entre outros.

Os estudos sobre a capacidade dos fungos do complexo *Paracoccidioides* induzirem a liberação de NETs começaram a serem publicados em 2015, com Mejía et al¹²¹. Os autores demonstraram que o fungo *P. brasiliensis* possui capacidade de induzir a liberação de redes extracelulares por neutrófilos humanos saudáveis. Outro resultado importante é que a formação de NETs em resposta aos conídios infectantes do fungo demonstrou ser independente da produção de EROs, enquanto a resposta à levedura foi inteiramente dependente da ativação de NADPH oxidase. O artigo também demonstrou que as NETs não tem por função primária eliminar o fungo, mas sim aprisioná-lo, o que foi demonstrado pela ativação da NADPH oxidase, provavelmente como um mecanismo futuro de eliminação do patógeno¹²¹.

No mesmo ano de publicação do trabalho citado anteriormente, mais dois artigos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, avaliando o processo de produção e liberação das redes em resposta ao *P. brasiliensis* foram publicados. Della Coletta et al. (2015) avaliaram a presença de NETs em lesões tegumentares de pacientes acometidos por PCM. Foram também avaliadas culturas de neutrófilos desafiados por duas cepas de *P. brasiliensis*, sendo elas Pb18, a cepa mais virulenta, e Pb265, a cepa avirulenta. As lesões foram avaliadas por Microscopia Confocal, com marcação de anticorpos para elastase e histona, além da marcação do DNA com DAPI. Os resultados deste estudo demonstraram a presença de NETs nas lesões cutâneas, além de um resultado muito importante: uma diferença no padrão das redes liberadas em resposta a cada cepa. A cepa virulenta induziu a liberação de NETs mais frouxas, amplas e delicadas, enquanto a cepa avirulenta induziu a liberação de redes mais densas e compactas. Estes resultados foram confirmados por microscopia de varredura, utilizando-se neutrófilos desafiados

com ambas as cepas. Após a avaliação destes resultados, os autores lançaram a hipótese de que a cepa virulenta poderia estar causando a degradação do DNA presente nas redes pela liberação de uma proteína DNase-like, que serviria como mecanismo de defesa do fungo, para promover uma forma de escape das NETs e sobreviver ao processo⁴⁹.

Bachiega et al. (2016) também demonstraram que a liberação de NETs em resposta ao fungo era dependente da ativação principal dos receptores Dectina-1. Este estudo também utilizou a cepa virulenta de *P. brasiliensis*, a Pb18. Outro resultado importante demonstrado foi que as NETs também contribuem para o processo de morte fúngica, uma vez que a atividade fungicida detectada antes e após a ativação de neutrófilos com TNF- α , IFN- γ e GM-CSF foi inibida significativamente pelo tratamento das culturas com DNase, degradando assim as redes e diminuindo a eficácia na eliminação do fungo⁴⁸.

1.4 DNase

A DNase é uma enzima pertencente ao grupo das desoxiribonucleases, que tem por principal função a degradação do esqueleto de fosfodiéster presente na estrutura do DNA. São proteínas presentes em grande parte das células eucariotas, e desempenham diversas funções no metabolismo celular. Existem diversos tipos de DNase, e cada tipo atua de maneira diferente ao executar sua função. Existem tipos de DNase que clivam qualquer lugar da cadeia de DNA, sendo chamadas de endodeoxirribonuclease, enquanto outros tipos clivam apenas as extremidades (exodeoxirribonuclease)¹¹⁸. Existem também os tipos que clivam apenas DNA de fita dupla, enquanto outros tipos são específicas para moléculas de fita simples e, ainda, outros são funcionais em relação a ambos¹²².

Além de serem moléculas intrínsecas às células de organismos eucariotos, importante para diversas funções celulares, a função das DNases como fator de virulência de diversos microrganismos tem sido também descrita. Diversos estudos têm demonstrado a capacidade de patógenos liberarem DNase para sobreviver ao sistema imune. Um estudo recente descreveu a capacidade de cepas de *S. aureus* liberarem DNase para escapar da resposta imune. Ao entrar em contato com os neutrófilos, a

proteína A presente na parede bacteriana, além de impedir a fagocitose, estimula neutrófilos a iniciarem um processo de netose suicida, liberando NETs para aprisionar a bactéria. Porém, após a liberação das NETs, a bactéria escapa destas redes por meio da liberação de endonucleases como, por exemplo, pela produção de DNase^{123,124}.

Gondara et al. (2017) demonstraram a capacidade do *Mycoplasma bovis*, um agente extremamente importante na medicina veterinária, de escapar das NETs e sobreviver ao sistema imune¹²⁵. Esta bactéria é responsável por causar mastite, artrite e pneumonia em bovinos, e foi demonstrado sua capacidade de induzir a liberação das redes extracelulares quando em contato com neutrófilos destes animais. Além desta capacidade de indução das redes, foi demonstrado também que a bactéria apresenta a capacidade de liberar uma DNase, que estaria degradando o DNA presente nas NETs e atuando como um mecanismo de escape da resposta imune, sendo um importante fator de virulência, garantindo assim, a sobrevivência do microrganismo¹²⁵.

A capacidade de liberação de endonucleases como forma de subverter o sistema imune tem sido descrito desde 2006, quando Buchanan et al. descreveu a capacidade de espécies de *Streptococcus pneumoniae* liberarem DNase para escapar do sistema imune e das NETs. Outro artigo também descreveu a bactéria *S. Suis* como sendo capaz de liberar DNase SSnA para evadir o sistema antimicrobiano mediado por NETs^{126,127}.

Além destes estudos envolvendo a capacidade de liberação de endonucleases por bactérias, existem diversos estudos envolvendo esta capacidade de liberação por fungos. As doenças fúngicas são extremamente importantes no meio médico e, como vários estudos demonstram a capacidade de diversas espécies fúngicas em induzir a liberação de NETs, a busca pela identificação da liberação de endonucleases por estes microrganismos é de extrema importância.

Dentre os fungos mais relevantes na prática médica, encontra-se a *C. albicans*. Diversos estudos têm demonstrado a interação deste microrganismo com o sistema imune, inclusive mostrando a capacidade desse fungo em induzir a liberação de NETs por neutrófilos humanos, tanto por sua forma de levedura quanto a de hifa¹⁰⁹. Com a descrição desta liberação de redes em resposta ao fungo, foi verificado também, a capacidade do próprio de escapar destas redes. Assim, as leveduras e hifas de *C. albicans* são capazes de liberar DNase e outras endonucleases para escapar das

NETs¹²⁸⁻¹³⁰. Um fato interessante demonstrado por um dos estudos é que as cepas de *C. albicans* que colonizam os indivíduos HIV positivos têm maior potencial de atividade da DNase, em comparação com aquelas isoladas de casos sem HIV^{129,131}.

Além dos artigos envolvendo *Candida*, outros fungos foram estudados e suas capacidades de liberarem DNase também foi demonstrada, como pode ser identificado para os fungos *C. neoformans* e *C. gattii*¹³². Já Bentubo et al. (2014), descreveram este mecanismo de escape e sobrevivência em diversas espécies do fungo *Trichosporon*¹³³. Estes estudos demonstram que os fungos, assim como outros microrganismos, liberam DNase extracelular para escapar da resposta do hospedeiro representada pelas redes extracelulares, e dessa forma manter sua sobrevivência.

Como já dito anteriormente, foi demonstrado que o *P. brasiliensis* possui capacidade de induzir NETs^{48,49,121}. Entretanto, um fato interessante demonstrado em um dos trabalhos, foi a identificação de que a cepa virulenta do fungo (Pb18) poderia estar induzindo NETs mais frouxas e delicadas, quando comparadas à cepa avirulenta (Pb265). Foi lançada então, a hipótese de que a cepa virulenta poderia estar liberando uma DNase-like, como mecanismo de escape da defesa do hospedeiro. Esta proteína degradaria o DNA presente nas redes, permitindo a sobrevivência do fungo nos tecidos⁴⁵.

Desjardins et al. (2011) utilizando análises genéticas e técnicas de sequenciamento, conseguiram realizar o sequenciamento de todo o genoma do Pb18 e do *P. lutzi*, que estão presentes no genbank sob identificação ABKI000000000.2, e ABKH000000000.2 respectivamente¹³⁴. Buscando possíveis genes que pudessem estar envolvidos com a produção de deoxiribonucleases pelo fungo, foi identificado possíveis regiões codificadoras de duas proteínas hipotéticas (PADG_11161 - Gene ID: 22587058 e PADG_08285 - Gene ID: 22586608) com atividade de DNase no genoma do fungo Pb 18 (ABKI000000000.2), e do *P. lutzi* (ABKH000000000.2), pertencente ao complexo de espécies *Paracoccidioides*, um gene de desoxiribonuclease hipotética (PAAG_07587 – Gene ID: 9093585)^{49,134}.

Sabendo-se que a PCM é uma doença pulmonar de extrema gravidade e importância clínica em nosso país, e que o mecanismo de escape das NETs por meio da produção de DNase seria importante para a sobrevivência do fungo no organismo, estudos para identificar esta proteína e seu papel no mecanismo de escape

das NETs são fundamentais para a melhor compreensão dessa interação do patógeno com o hospedeiro.

2. Referências

1. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin Microbiol Rev. 1993; 6(2):89-117.
2. Coutinho ZF, Silva Dd, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). Cad Saude Publica. 2002; 18(5):1441-54.
3. Restrepo A, Tobón, AM. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Principles and practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Elsevier; 2005 p.3062-8.
4. Bocca AL, Amaral AC, Teixeira MM, Sato PK, Shikanai-Yasuda MA, Soares Felipe MS. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. Future Microbiol. 2013; 8(9):1177-91.
5. Marques SA. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. An Bras Dermatol. 2013; 88(5):700-11.
6. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. Mol Biol Evol. 2006;23:65–73
7. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. Mol Phylogenet Evol. 2009;52:273–83.
8. Lutz A. Uma mycose pseudococcidica localisada na boca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. Bras Med. 1908; 22:21-4.
9. Turissini DA, Gomez OM, Teixeira MM, McEwen JG, Matute DR. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. Fungal Genet Biol. 2017; 106:9-25.
10. Franco M. Host–parasite relationship in paracoccidioidomycosis. J Med Vet Mycol. 1987; 25:5–18.
11. Farias MR, Condas LAZ, Ribeiro MG, Bosco SMG, Muro MD, Werner J, Theodoro RC, Bagagli E, Marques SA, Franco M. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. Mycopathologia. 2011; 172: 147-152
12. Silveira LH, Paes RCS, Medeiros EV, Itano EM, Camargo ZP, Ono MA. Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. Mycopathologia. 2008; 165: 367-371.

13. Fernandes GF, Deps P, Tomimori-Yamashita J, Camargo ZP. IgM and IgG antibody response to *Paracoccidioides brasiliensis* in naturally infected wild armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *Med Mycol.* 2004; 42: 363-368.
14. Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Griesse J, Theodoro RC, Macoris SAG, da Silva RJ, Barrozo L, Tavares PMS, Zancopé-Oliveira RM, Bagagli E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol.* 2008; 46: 35–40.
15. Suguiura IMS, Macagnan R, Omori AM, Buck EL, Scarpassa JA, Pretto-Giordano LG, Vilas-Boas LA, de Camargo ZP, Itano EN, Ono MA. First report of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in fish. *Med Mycol.* 2019; 0:1–7.
16. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AR, Moretti MA. II Consenso de paracoccidioidomicose. *Epidemiol. Serv. Saúde.* 2018;27: e0500001.
17. Franco M, Bagagli E, Scapolio S, da Silva Lacaz C. A critical analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med Mycol.* 2000; 38(3):185-91.
18. Theodoro RC, Candeias JM, Araújo JP Jr, Bosco Sde M, Macoris SA, Padula LO, et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol.* 2005; 43(8):725-9.
19. Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Theodoro RC, Bosco Sde M, Macoris SA, et al. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol.* 2007; 7:92.
20. da Silva Neto BR, Carvalho PF, Bailão AM, Martins WS, Soares CM, Pereira M. Transcriptional profile of *Paracoccidioides spp.* In response to itraconazole. *BMC Genomics.* 2014;15:254.
21. Wanke B, Aidê MA. Capítulo 6 - Paracoccidioidomicose. *J Bras Pneumol.* 2009;35(12)
22. San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol.* 2002; 40(3):225-42.
23. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Blotta MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparisons with infected and non-infected controls. *Microbes Infect.* 2002; 4:139-144.
24. Canteros CE. PARACOCIDIOIDOMICOSIS: CRÓNICA DE UNA ENFERMEDAD OLVIDADA. *MEDICINA (Buenos Aires)* 2018; 78: 180-184.
25. Armstrong-James D, Brown GD, Netea MG et al. Immunotherapeutic approaches to treatment of fungal diseases. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17:393–402.

26. Mendes RP, de Souza Cavalcante R, Marques SA et al. Paracoccidioidomycosis: current perspectives from Brazil. *Open Microbiol J.* 2017; 11:224– 282.
27. Funari M, Kavakama J, Shikanai-Yasuda MA, et al. Chronic pulmonary paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis): high-resolution CT findings in 41 patients. *AJR.* 1999;173:59– 64.
28. Azenha MR, Caliento R, Brentegani LG, de Lacerda SA. A retrospective study of oral manifestations in patients with paracoccidioidomycosis. *Braz Dent J.* 2012; 23(6): 753-757
29. Martinez R. Paracoccidioidomicose. In: Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004;204-21.
30. Martinez, R., & Moya, M. J. Complexo primário da paracoccidioidomicose e hipereosinofilia. *Jornal Brasileiro de Pneumologia.* 2009; 35(12):1259–1262.
31. Mendes RP. Quadro Clínico. In: Veronesi R, Focaccia R. *Tratado de Infectologia 5ª Edição.* Rio de Janeiro: Atheneu; 2015 p.1695.
32. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibits mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* 1984; 46(2):346-53.
33. Peraçoli MTS, Soares AMVC. Imunologia da paracoccidioidomicose. In: Tosta CE. *Imunologia das infecções.* Uberaba: FUNEPU; 1992 p.15-36.
34. de Castro LF, Ferreira MC, da Silva RM, Blotta MH, Longhi LN, Mamoni RL. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. *J Infect.* 2013;67(5):470-85.
35. Singulani, JL, Galeane MC, Ramos MD, Gomes PC, dos Santos CT, de Souza BM, et al. Antifungal Activity, Toxicity, and Membranolytic Action of a Mastoparan Analog Peptide. *Frontiers in Cel and Infec Microb.* 2019; 9(419):1-11.
36. Marcos CM, Tamer G, de Oliveira HC, Assato PA, Scorzoni L, Santos CT, de Lacorte Singulani J, de Fátima da Silva J, de Almeida R, de Paula E Silva ACA, et al. Down-regulation of TUFM impairs host cell interaction and virulence by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sci Rep.* 2019;9(1):17206.
37. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai, S. *Imunologia celular e molecular – 9ª ed.* Rio de Janeiro: Elsevier. 2019.
38. do Nascimento MP, de Campos Soares AM, Dias-Melicio LA, Parise-Fortes MR, Martins RA, Nakaira ET, et al. Fungicidal activity of human monocyte-derived multinucleated giant cells induced in vitro by *Paracoccidioides brasiliensis* antigen. *Mycopathologia.* 2008;166(1):25-33.

39. Moreira AP, Dias-Melicio LA, Soares AMVC. Interleukin-10 but not Transforming Growth Factor beta inhibits murine activated macrophages *Paracoccidioides brasiliensis* killing: effect of H₂O₂ and NO production. *Cell Immunol.* 2010;263(2):196-203.
40. Bordon-Graciani AP, Dias-Melicio LA, Acorci-Valério MJ, Araujo JP Jr, de Campos Soares AM. Inhibitory effect of PGE 2 on the killing of *Paracoccidioides brasiliensis* by human monocytes can be reversed by cellular activation with cytokines. *Med Mycol.* 2012;50:726–34.
41. Rodrigues DR, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MT, Soares AM. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med Mycol.* 2007 Feb;45(1):27-33.
42. Nicola AM, Casadevall A, Goldman DL. Fungal killing by mammalian phagocytic cells. *Curr Opin Microbiol.* 2008;1:313-7.
43. Gardizani TP, Della Coletta AM, Romagnoli GG, Puccia R, Serezani APM, de Campos Soares AMV, Dias-Melicio LA. 43 kDa Glycoprotein (gp43) from *Paracoccidioides brasiliensis* Induced IL-17A and PGE2 Production by Human Polymorphonuclear Neutrophils: Involvement of TLR2 and TLR4. *J Immunol Res.* 2019; 2019:1790908.
44. Moreira AP, Dias-Melicio LA, Peraçoli MT, Calvi SA, Victoriano de Campos Soares AM. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN-gamma and TNF-alpha activated murine peritoneal macrophages: evidence of H₂O₂ (2) and NO effector mechanisms. *Mycopathol.* 2008;166(1):17-23.
45. Carmo JP, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MT, Soares AM. TNF-alpha activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. *Med Mycol.* 2006; 44(4):363-8.
46. Calvi SA, Peraçoli MT, Mendes RP, Marcondes-Machado J, Fecchio D, Marques SA, Soares AM. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect.* 2003;5(2):107-13.
47. Soares AM1, Calvi SA, Peraçoli MT, Fernandez AC, Dias LA, Dos Anjos AR. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology.* 2001 Apr;102(4):480-5.
48. Bachiega TF, Dias-Melicio LA, Fernandes RK, de Almeida Balderramas H, Rodrigues DR, Ximenes VF, de Campos Soares AM. Participation of dectin-1 receptor on NETs release against *Paracoccidioides brasiliensis*: Role on extracellular killing. *Immunobiology.* 2016;221(2):228-35.
49. Della Coletta, A.M., Bachiega, T.F., Silva, J.C.Q., Soares, A.M.V.C., De Faveri, J., Marque, S.A., et al. Neutrophil extracellular traps identification in tegumentar lesions of patients with paracoccidioidomycosis and different patterns of NETs generation in vitro. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015;9 (9), e0004037.

50. Romagnolo AG, de Quaglia E Silva JC, Della Coletta AM, Gardizani TP, Martins ATL, Romagnoli GG, Kaneno R, de Campos Soares AMV, De Faveri J, Dias-Melicio LA. Role of Dectin-1 receptor on cytokine production by human monocytes challenged with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycoses*. 2018;61(4):222-230.
51. Calich VL, da Costa TA, Felonato M, Arruda C, Bernardino S, Loures FV, et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia*. 2008;165(4-5):223-36.
52. Mamoni RL, Nouér SA, Oliveira SJ, Musatti CC, Rossi CL, Camargo ZP, et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2002;40(2):153-9.
53. Pereira RM, Bucarechi F, Barison Ede M, Hessel G, Tresoldi AT. Paracoccidioidomycosis in children: clinical presentation, follow-up and outcome. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2004;46(3):127-31.
54. Silva IC. Neutrophils: classical aspects, plasticity and new immunoregulatory Functions. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*. 2015; 7:35-46.
55. Souto JT, Aliberti JC, Campanelli AP, Livonesi MC, Maffei CM, Ferreira BR, et al. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis* infect mice is modulated by interferon-gamma. *Am J Pathol*. 2003;163:583-90.
56. Phillipson M, Kubes P. The Healing Power of Neutrophils *Trends in Immunol*. 2019; 40(7):635-647.
57. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2010;10 (6):427-39.
58. Castanheira FVS, Kubes P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood*. 2019;133(20):2178-2185..
59. Liew PX, Kubes P. The neutrophil's role during health and Disease. *Physiol Rev*. 2019;99: 1223–1248.
60. Liu H, Pope RM. Phagocytes: mechanisms of inflammation and tissue destruction. *Rheum Dis Clin North Am*. 2004;30(1):19-39.
61. Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med*. 2011;17(11):1381-90.
62. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:173-82.
63. Timár CI, Lőrincz AM, Ligeti E. Changing world of neutrophils. *Pflugers Arch*. 2013;465(11):1521-33.
64. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol*. 2014;15(7):602-11.
65. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 1998;92(9):3007-17.

66. Parker H, Winterbourn CC. Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Front Immunol.* 2013;3:424.
67. Winterbourn CC, Kettle AJ. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(6):642-60.
68. Bordon AP, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Calvi SA, Serrão Peraçoli MT, Victoriano de Campos Soares AM. Prostaglandin E2 inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human monocytes. *Microbes Infect.* 2007;9(6):744-7.
69. Tavian EG, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Graciani AP, Peraçoli MT, Soares AMVC. Interleukin-15 increases *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human neutrophils. *Cytokine.* 2008;41(1):48-53.
70. Bannwart CF, Martins RA, Nakaira-Takahashi E, Dias-Melício LA, Soares AM, Peraçoli MT. Interleukin-15 augments oxidative metabolism and fungicidal activity of human monocytes against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105(7):866-72.
71. Rodrigues DR, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MT, Soares AMVC. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med Mycol.* 2007;45:27-33.
72. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:181-218.
73. Iabuki K, Montenegro MR. Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology, ultrastructure and correlation of the lesions with presence of specific antigens and serum levels of antibodies. *Mycopathologia.* 1979;67:131-41.
74. Defaveri J, Rezkallah-Iwasso MT, Franco MF. Pulmonary paracoccidioidomycosis in immunized mice. *Mycopathologia.* 1992;119:1-9.
75. Defaveri J, Coelho KIR, Rezkallah-Iwasso MT, Franco MF. Hypersensitivity pneumonitis to *Paracoccidioides brasiliensis* antigens in mice. *J Med Vet Mycol.* 1989;27:3-104.
76. Svidzinski; T.I.; Estivalet, M.N.; Hubner, M.; Santana, R.G., Fischman O.; Colombo A. L.. *Paracoccidioides brasilienses* isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. *Rev. Inst. Med. trop.* 1999; 41(5): 279-283.
77. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-5.
78. Urban CF, Nett JE. Neutrophil Extracellular Traps in fungal infection. *Seminars in cell and Develop Biol.* 2019; 89:47-57.
79. Ermert D, Urban CF, Laube B, Goosmann C, Zychlinsky A, Brinkmann V. Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *J Innate Immun.* 2009;1(3):181-93.
80. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, et al. Neutrophil sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol.* 2014;15(11):1017-25.

81. Lippolis JD, Reinhardt TA, Goff JP, Horst RL. Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006;113(1-2):248–55.
82. Palić D, Andreasen CB, Ostojić J, Tell RM, Roth JA. Zebrafish (*Danio rerio*) whole kidney assays to measure neutrophil extracellular trap release and degranulation of primary granules. *J Immunol Methods*. 2007;319(1-2):87-97.
83. Wardini AB, Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Nadaes NR, Danelli MG, Mazur C, et al. Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. *J Gen Virol*. 2010;91(Pt 1):259-64.

- 84.** Chuammitri P, Ostojić J, Andreasen CB, Redmond SB, Lamont SJ, Palić D. Chicken heterophil extracellular traps (HETs): novel defense mechanism of chicken heterophils. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;129(1-2):126-31.
- 85.** Robb CT, Dyrynda EA, Gray RD, Rossi AG, Smith VJ. Invertebrate extracellular phagocyte traps show that chromatin is an ancient defence weapon. *Nat Commun.* 2014;5:4627.
- 86.** von Köckritz-Blickwede M, Nizet V. Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. *J Mol Med (Berl).* 2009;87(8):775-83.
- 87.** Webster SJ, Daigneault M, Bewley MA, Preston JA, Marriott HM, Walmsley SR, et al. Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease. *J Immunol.* 2010;185(5):2968-79.
- 88.** Bartneck M, Keul HA, Zwadlo-Klarwasser G, Groll J. Phagocytosis independent extracellular nanoparticle clearance by human immune cells. *Nano Lett.* 2010;10(1):59-63.
- 89.** Dworski R, Simon HU, Hoskins A, Yousefi S. Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(5):1260-6.
- 90.** Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Wardini AB, Pinto-da-Silva LH, Saraiva EM. ETosis: a microbial mechanism beyond cell death. *J Parasitol Res.* 2012;2012:ID929743.
- 91.** Goldmann O, Medina E. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. *Front Immunol.* 2013;3:420.
- 92.** Scheb-Wetzel M, Rohde M, Bravo A, Goldmann O. New insights into the antimicrobial effect of mast cells against *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun.* 2014;82(11):4496-507.
- 93.** Jaillon S, Peri G, Delneste Y, Frémaux I, Doni A, Moalli F, et al. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med.* 2007;204(4):793-804.
- 94.** Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):e1000639.
- 95.** Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010;191(3):677-91.

96. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood*. 2011;117(3):953-9.
97. Zawrotniak M, Rapala-Kozik M. Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta Biochim Pol*. 2013;60(3):277-84.
98. Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep*. 2014;8(3):883-96.
99. 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*. 2007;176(2):231-41.
100. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 2007;13(4):463-9.
101. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood*. 2013;122(16):2784-94.
102. Pilsczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*. 2010;185(12):7413-25.
103. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*. 2009;16(11):1438-44.
104. Gray RD, Lucas CD, Mackellar A, Li F, Hiersemenzel K, Haslett C, et al. Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the generation of neutrophil extracellular traps. *J Inflamm (Lond)*. 2013;10(1):12.
105. Keshari RS, Verma A, Barthwal MK, Dikshit M. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *J Cell Biochem*. 2013;114(3):532-40.
106. Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*. 2009;114(13):2619-22.
107. Parker H, Albrett AM, Kettle AJ, Winterbourn CC. Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. *J Leukoc Biol*. 2012;91(3):369-76.
108. Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceição-Silva F, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(16):6748-53.

109. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.* 2006;8(4):668-76.
110. Morita C, Sumioka R, Nakata M, Okahashi N, Wada S, Yamashiro T, et al. Cell-wall anchored nuclease of *Streptococcus sanguinis* contributes to escape from neutrophil extracellular trap-mediated bacteriocidal activity. *PLoS One.* 2014;9(8):e103125.
111. Ramos-Kichik V, Mondragón-Flores R, Mondragón-Castelán M, Gonzalez-Pozos S, Muñiz-Hernandez S, Rojas-Espinosa O, et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb).* 2009;89(1):29-37.
112. 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.* 2010;12(12-13):928-36.
113. Malachowa N1, Kobayashi SD, Freedman B, Dorward DW, DeLeo FR. *Staphylococcus aureus* leukotoxin GH promotes formation of neutrophil extracellular traps. *J Immunol.* 2013;191(12):6022-9.
114. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD Jr, et al. Extracellular DNA traps promotes thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(36):15880-5.
115. Diaz JA, Fuchs TA, Jackson TO, Kremer Hovinga JA, Lämmle B, Henke PK, et al. Plasma DNA is elevated in patients with deep vein thrombosis. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord.* 2013;1(4). doi: 10.1016/j.jvsv.2012.12.002.
116. Yu Y, Su K. Neutrophil extracellular traps and Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Cell Immunol.* 2013;4.pii:139.
117. Leffler J, Martin M, Gullstrand B, Tydén H, Lood C, Truedsson L, et al. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol.* 2012;188(7):3522-31.
118. Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, Wang JY, Riblett M, Yalavarthi S, et al. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol.* 2011;187(1):490-500.
119. Byrd AS, Carmona-Rivera C, O'Neil LJ, Carlucci PM, Cisar C, et al. Neutrophil extracellular traps, B cells, and type I interferons contribute to immune dysregulation in hidradenitis suppurativa. *Sci Transl Med.* 2019;4;11(508).
120. Rocha JD, Nascimento MT, Decote-Ricardo D, Côte-Real S, et al. Capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* modulate production of neutrophil extracellular traps (NETs) by human neutrophils. *Sci Rep.* 2015;26;5:8008.

121. Mejía SP, Cano LE, López JA, Hernandez O, González Á. Human neutrophils produce extracellular traps against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology*. 2015;161(5):1008-17.
122. Nishino T, Morikawa K. Structure and function of nucleases in DNA repair: shape, grip and blade of the DNA scissors. *Nature Oncogene*. 2002; 21:9022-9032.
123. Hoppenbrouwers T, Sultan AR, Abraham TE, et al. Staphylococcal Protein A is a key factor in Neutrophil Extracellular Traps formation. *Front Immunol*. 2018;9:165.
124. Berends ET, Horswill AR, Haste NM, Monestier M, Nizet V, von Köckritz-Blickwede M. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J. Innate Immun*. 2010;2:576–586.
125. Gondara S, Higuchi H, Nishi K, Iwano H, Nagahata H. *Mycoplasma bovis* escapes bovine neutrophil extracellular traps. *Veterinary Microbiology*. 2017;199:68-73.
126. de Buhr N, Neumann A, Jerjomiceva N, von Köckritz-Blickwede M, Baums CG.. *Streptococcus suis* DNase SsnA contributes to degradation of neutrophil extracellular traps (NETs) and evasion of NET-mediated antimicrobial activity. *Microbiology*. 2014; 160:385–395.
127. Buchanan JT et al. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Current biology*. 2006; 16:396–400.
128. Zhang X, Zhao S, Sun L, Li W, Wei Q, Ashban RB, Hu Y. Different virulence of *Candida albicans* is attributed to the ability of escape from neutrophil extracellular traps by secretion of DNase. *Am J Transl Res*. 2017;9(1):50-62.
129. Menezes RP, Riceto EBM, Borges AS, Roder DVDB, Pedroso RS. Evaluation of virulence factors of *Candida albicans* isolated from HIV-positive individuals using HAART. *Archives of Oral Biology*. 2016;66:61–65.
130. Pakshir K, Zomorodian K, Karamitalab M, Jafari M, Taraz H, Ebrahimi H. Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida spp.* isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions. *Journal de Mycologie Médicale*. 2013;23(2):113-118.
131. Campos-Garcia L, Jimenez-Valdes RJ, Hernandez-Bello R, Palma-Nicolas J, Gonzalez GM, Sanchez-Gonzalezocio A. *Candida albicans* and non-albicans Isolates from Bloodstream Have Different Capacities to Induce Neutrophil Extracellular Traps. *J Fungi (Basel)*. 2019;5(2).
132. Sánchez M, Colom F. Extracellular DNase activity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2010;27:10-13.

133. Bentubo HDL, Gompertz OF. Effects of temperature and incubation time on the in vitro expression of proteases, phospholipases, lipases and DNases by different species of *Trichosporon*. Springer Plus. 2014;3:377.
134. Desjardins CA, Champion MD, Holder JW, Muszewska A, Goldberg J, Bailão AM, et al. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. PLoS Genet. 2011;7(10):1-16.