



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

Amanda Manoel Della Coletta

Identificação de Neutrophil Extracellular Traps em lesões tegumentares de pacientes com Paracoccidioidomicose e análise da formação de NETs *in vitro* por neutrófilos humanos desafiados com *Paracoccidioides brasiliensis*

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

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio

Botucatu
2014

Amanda Manoel Della Coletta

Identificação de Neutrophil Extracellular Traps em lesões tegumentares de pacientes com Paracoccidioidomicose e análise da formação de NETs *in vitro* por neutrófilos humanos desafiados com *Paracoccidioides brasiliensis*

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

Orientadora: Profa.Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio

Botucatu
2014

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

Coletta, Amanda Manoel Della.

Identificação de Neutrophil extracellular Traps em lesões tegumentares de pacientes com Paracoccidioidomicose e análise da formação de NETs in vitro por neutrófilos humanos desafiados com Paracoccidioides brasiliensis / Amanda Manoel Della Coletta. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Luciane Alarcão Dias-Melicio
Capes: 21104000

1. Pele - Ferimentos e lesões. 2. Paracoccidioides brasiliensis. 3. Microscopia confocal. 4. Neutrófilos. 5. Microscopia eletrônica de varredura. 6. Histopatologia.

Palavras-chave: Lesões tegumentares; Microscopia confocal; NETs (Neutrophil Extracellular Traps); Neutrófilos; Paracoccidioides brasiliensis.

Trabalho realizado no Laboratório de Imunopatologia da Paracoccidiodomicose do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina, UNESP – Botucatu, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e FUNDUNESP.

Dedicatória

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

Aos meus pais, Luiz Antônio e Silvana, por serem pessoas sensacionais e por me darem todo o suporte necessário para seguir meu caminho.

Às minhas irmãs, Isabela e Renata, por estarem comigo sempre e me ensinarem a acreditar que tudo é possível.

Amo todos vocês.

Agradecimientos

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, acima de tudo, por ser uma companheira, com a qual eu pude partilhar tantos momentos e aprender em todos eles. Obrigada pela confiança, pelo respeito e por me incentivar sempre a seguir meus sonhos.

À toda minha família, em especial meus pais e irmãs. Obrigada 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.

Aos meus amigos do coração e remanescentes em Botucatu, Juliana (Balsa), Ana Carolina (Passa), Cristiane (Dofa) e Marina (Hemacea), obrigada por me proporcionarem tantos momentos de diversão e companheirismo, mesmo com tão pouco tempo juntas. Em especial, aos eternos mosqueteiros, André (Qualy) e Carla (Caldo), obrigada por serem meus irmãos e meus anjos e por partilharem a vida de vocês comigo, me dando a certeza que eu estou no caminho certo.

Às minhas amigas, embora distantes, mas sempre tão presentes em minha vida, Larissa (Rasga) e minha irmã, Bianca (Peks). Obrigada por me mostrarem que a distância não é nada diante de um sentimento tão verdadeiro como a amizade. À Raíza, minha irmã de alma, por ser para sempre minha confidente e companheira.

Agradeço em especial à Tatiana Bachiega, por ter sido uma irmã mais velha, compreendendo minhas apreensões e me ensinando a cada momento. Obrigada por me ajudar a acreditar na minha capacidade e por partilhar todo o seu conhecimento comigo, sempre e para sempre.

À minha amiga e companheira de laboratório Juliana Carvalho (Tarra), por partilhar tantos momentos de trabalho e por mostrar que uma amizade pode ser tão forte em tão pouco tempo. Obrigada por mostrar que uma convivência pode ser tão prazerosa e valiosa e

também, por cada segundo de companheirismo, de diversão, de conversas sérias e por fazer parte da minha vida, mesmo distante.

Às colegas de laboratório Luciana e Isabella, por toda a ajuda e confiança. Obrigada pela convivência e por tantos momentos juntas, sempre buscando a melhor oportunidade para aprender e partilhar experiências.

À professora Ângela Maria Victoriano de Campos Soares e seus alunos Régis e Dani, 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 solícitamente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia e à coordenadora Professora Doutora Denise Fecchio, 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 do Centro de Microscopia do Instituto de Biociências de Botucatu, Ligia, Thiago e Shelly e aos funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, por permitirem sempre que eu pudesse ter as melhores oportunidades.

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

À FAPESP, pelo auxílio e bolsa de mestrado (Processo 2011/18855-7 e 2013/00788-7). Ao CNPq (480486/2011-5) e FUNDUNESP (00637/11-DFP) pelos auxílios concedidos.

Resumo

Resumo

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica, causada por fungo dimórfico do gênero *Paracoccidioides* (*Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*), sendo endêmica na América Latina. Nos últimos anos, estudos têm focado o papel dos neutrófilos (PMNs) na imunidade, uma vez que a literatura enfatiza o dinâmico envolvimento dessas células durante a defesa do hospedeiro contra diversos micro-organismos. Recentemente, foi demonstrado que neutrófilos podem utilizar uma nova estratégia para destruir patógenos chamada NETose, um tipo de morte celular diferente dos bem elucidados mecanismos de apoptose e necrose. Essa via envolve a liberação de redes extracelulares constituídas de conteúdo nuclear e granular por PMNs ativados. É proposto que as NETs destruam micro-organismos que não sejam fagocitados pelos neutrófilos, por possuírem tamanho ou morfologia maiores que as células, o que pode ocorrer com o Pb, uma vez que esse fungo assume essas características. Nesse contexto, os objetivos desse estudo foram identificar a presença das NETs tanto *in vivo* como *in vitro*, analisando lesões tegumentares de pacientes com PCM e culturas de PMNs do sangue periférico de pacientes e indivíduos saudáveis desafiados com diferentes cepas de *P. brasiliensis*. Fragmentos de biópsias foram marcados com anticorpos anti-histona (Texas-Red), anti-elastase (FITC), e corados com DAPI para avaliação por microscopia confocal, e com H&E para análise histopatológica. PMNs do sangue periférico de pacientes e indivíduos saudáveis foram isolados e desafiados com *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265) para avaliação de NETs por microscopia de varredura, microscopia confocal e quantificação dessas estruturas por Picogreen dsDNA kit. As imagens de microscopia confocal das biópsias revelaram a presença de constituintes das NETs, localização de DNA extracelular corado com DAPI, com co-

localização de histona e elastase, confirmadas pela sobreposição das três imagens. A análise histopatológica revelou no sítio das lesões a presença de Pb e infiltrado inflamatório com elevado número de neutrófilos, além de visualização de DNA extracelular hematoxilina positiva, indicando a formação de NETs. Na microscopia de varredura, foi detectada a presença das redes extracelulares com aprisionamento das leveduras do fungo. Além disso, a quantificação de DNA também permitiu evidenciar que as duas cepas do fungo foram capazes de induzir a formação de NETs por neutrófilos humanos. Dessa maneira, NETs foram encontradas tanto em lesões tegumentares quanto em cultura de PMNs do sangue periférico de pacientes com PCM quando desafiados com o fungo. Sendo assim, a presença das NETs tanto *in vivo* quanto *in vitro* abre novas perspectivas de estudo para a melhor compreensão da resposta imune do hospedeiro contra o *P. brasiliensis*.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, neutrófilos, NETs (Neutrophil Extracellular Traps), lesões tegumentares da Paracoccidioidomicose, microscopia confocal, microscopia de varredura.

Abstract

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM), an endemic systemic mycosis in Latin America, is caused by the thermodimorphic fungus of *Paracoccidioides* genus (*Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) and *Paracoccidioides lutzii*). Recently, works in PCM have focused the role of neutrophils (PMNs), since literature has demonstrated the dynamic involvement of these cells in host defense against microorganisms. Studies have shown that PMNs could use a novel strategy to destroy microorganisms (NETosis), a type of neutrophil death distinct from apoptosis and necrosis. This mechanism involves the release of extracellular traps by activated neutrophils, known as neutrophil extracellular traps (NETs). It has been proposed that NETs may destroy microorganisms that were not phagocytosed by neutrophils, and this could be proposed for Pb, since the fungus yeast can present different sizes. In this context, the objectives of this study were identify the presence of NETs *in vivo* and *in vitro*, analyzing samples of patients with PCM by different methodologies. Tissue sections from formalin-fixed biopsies were stained with DAPI, anti-elastase (FITC) and anti-histone (Texas-Red) for confocal immunofluorescence microscopy analysis, and with Hematoxylin-Eosin (H&E) for histopathology. Neutrophil cultures were challenged with two isolates of Pb (Pb18 and Pb265), analyzed by scanning electron microscopy and NETs were quantified by the Picogreen dsDNA kit. The images revealed the presence of NETs constituents, nuclear and extracellular localization of DNA, co-localization of elastase and histone, confirmed by the overlay of the three stains. Histopathology showed the presence of Pb and inflammatory infiltrate with high number of neutrophils on the site of the lesion and extracellular DNA (hematoxylin positive) indicating NETs. Both isolates were able to induce NET release *in vitro* in similar levels. Thus, *P. brasiliensis* (Pb18 and Pb265) is able to induce NETs formation by

human neutrophils. The presence of NETs components both *in vivo* and *in vitro* is important to better understand the host immune response during Paracoccidioidomycosis.

Keywords: Paracoccidioidomycosis, neutrophils, NETs (Neutrophil Extracellular Traps), tegumentary lesions, confocal laser microscopy, scanning electron microscopy.

Sumário

Capítulo I

1. Revisão Bibliográfica	5
1.1. Paracoccidiodomicose (PCM)	5
1.2. Neutrófilos e a Paracoccidiodomicose	9
1.3. Neutrophil Extracellular Traps (NETs)	15
2. Referências	27

Capítulo II

3. Manuscrito	47
Resumo	48
Sumário do autor	49
Introdução	51
Materiais e Métodos	53
Resultados	58
Discussão	61
Referências	65
Figuras.....	72
4. Anexos	80

Capítulo 1
Revisão Bibliográfica

1. Revisão Bibliográfica

Ação dos Neutrófilos e formação de Neutrophil Extracellular Traps (NETs) na Paracoccidioidomicose

1.1. Paracoccidioidomicose (PCM)

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma infecção fúngica sistêmica, considerada como importante causa de mortalidade e morbidade nas áreas rurais de regiões endêmicas na América Latina, com focos de infecção principalmente na Argentina, Brasil, Colômbia e Venezuela¹⁻⁵. Seu agente etiológico, o fungo do Complexo *Paracoccidioides*, representado pelas espécies crípticas S1, PS2 e PS3 de *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*)⁶ e *Paracoccidioides lutzii* (*P. lutzii*)⁷, e descrito pela primeira vez em 1908 por Adolpho Lutz⁸, é um fungo dimórfico da mesma família de *Histoplasma capsulatum* (*H. capsulatum*), *Blastomyces dermatitidis* (*B. dermatitidis*), *Coccidioides immitis* (*C. immitis*) e *Coccidioides posadasii* (*C. posadasii*)⁵. Possuem as mesmas formas infectantes (conídios), habitat geográfico restrito e as mesmas características termo-dimórficas, apresentando-se sob a forma de micélio em temperatura ambiente (4 a 28° C) e de levedura em temperaturas acima de 32° C^{3,5}.

A infecção pelo *P. brasiliensis* ocorre pela inalação dos propágulos infectantes, conídios produzidos por micélios presentes em água, plantas e solo, em temperatura ambiente⁹⁻¹⁴. Após a inalação, os conídios instalam-se nos pulmões, mais especificamente nos bronquíolos terminais e nos alvéolos pulmonares, transformam-se em leveduras e formam o complexo primário pulmonar^{15,16}. Desse estágio em diante, pode ocorrer cura espontânea ou a infecção pode tornar-se latente (PCM – infecção), identificada pela

ausência de sinais ou sintomas clínicos e evidenciada pelo teste intradérmico com paracoccidioidina, devido ao desenvolvimento de uma resposta específica contra o fungo¹⁷. O processo também pode progredir e disseminar-se para outros órgãos como fígado, baço e adrenais por via linfo-hematogênica caracterizando a PCM – doença⁹. Dessa forma, o espectro da doença pode variar desde o curso assintomático à doença disseminada potencialmente fatal⁴.

As formas clínicas da PCM são classificadas de acordo com as definições e relações estabelecidas entre aspectos clínicos e história natural da doença, propostas no *International Colloquium on PCM*, realizado em Medellín, Colômbia, em 1986¹⁸. Assim, as manifestações clínicas da micose podem ser agrupadas em dois padrões que definem as formas Aguda/Subaguda (Juvenil) e Crônica (Adulta) da doença. A PCM aguda/subaguda é considerada mais grave, afeta indivíduos jovens (maioria até 30 anos de idade) de ambos os sexos, apresenta evolução rápida, com tropismo fúngico para o sistema fagocítico-mononuclear (baço, fígado, linfonodos e medula-óssea). A PCM crônica é caracterizada por apresentar uma progressão mais lenta e gradual, e por afetar indivíduos do sexo masculino, predominantemente adultos (maioria acima de 40 anos), com manifestações clínicas uni (localizada) ou multifocal (envolvendo mais de um órgão ou sistema)^{19,20}. Sob o ponto de vista histopatológico, as lesões encontradas na PCM caracterizam-se por manifestações granulomatosas, com presença de fungos, células epitelióides, células gigantes multinucleadas do tipo Langhans e de células do sistema imune como plasmócitos, linfócitos, macrófagos e neutrófilos²¹. Essas lesões podem comprometer pulmões, órgãos do sistema fagocítico-mononuclear, mucosas e tegumento, sendo distribuídas de acordo com a forma clínica da doença, sendo a presença de lesões pulmonares e mucosas pouco frequente na PCM aguda/subaguda^{19,20}. Já a forma crônica da PCM apresenta quadro clínico de duração

prolongada, relacionada ao envolvimento de pulmões, mucosas e tegumento^{19,20,22}. A instauração da doença, sua progressão e gravidade dependem de fatores relacionados ao fungo, como sua virulência e composição antigênica, bem como os relacionados ao hospedeiro, como sexo, idade, estado nutricional, fatores genéticos e principalmente o comprometimento imunológico do indivíduo^{19,23-25}. As diferenças entre as respostas imunes dos hospedeiros são essenciais para a progressão clínica da doença. Sabe-se que a resistência ao *P. brasiliensis* é mediada predominantemente por um padrão de resposta tipo Th1, já a susceptibilidade envolve a participação da resposta tipo Th2²⁶. Assim, essa capacidade de desenvolver uma resposta imune adequada contra o *P. brasiliensis* vem sendo elucidada através de estudos clínicos e experimentais, nos quais essa interação entre o fungo e o sistema imune do hospedeiro é evidenciada através de mecanismos específicos e inespecíficos de defesa^{19,27-29}.

Recentemente foi proposto um novo modelo que explicaria os diferentes padrões de respostas imunes observadas nas diferentes formas clínicas da PCM²⁶. Esse estudo traz novas informações, que complementam a literatura e corroboram dados demonstrando que, a PCM-infecção é caracterizada predominantemente por uma resposta Th1, com aumento dos níveis de Interferon- γ (IFN- γ) e TNF- α , responsáveis pela ativação de macrófagos e cruciais na resistência ao fungo^{30,31}, e redução dos níveis de interleucinas 4, 5 e 10 (IL-4, IL-5 e IL-10). Já, a PCM aguda/subaguda, a forma mais grave da doença, é caracterizada por um padrão de resposta imune predominante do tipo Th2/Th9, com aumento dos níveis de IL-4 IL-5, TGF- β , IL-9 e IL-21, sendo IL-4 e IL-9 responsáveis pela indução da produção de anticorpos pelas células B (IgG4 e IgE), e IL-5 responsável pela eosinofilia presente na forma clínica^{26,32,33}. A PCM crônica apresenta um padrão de resposta imune mista, com predomínio de células Th17 e Th22, e com importante participação de

células Th1²⁶. Apresenta níveis elevados de IL-12 e produção de interleucina-17 (IL-17), com indução de resistência parcial; no entanto, ocorre também uma resposta inflamatória exacerbada com a indução de danos teciduais e fibrose, geralmente observados nesses indivíduos^{17,19,26}.

A imunidade inata é considerada a primeira linha de defesa do organismo contra os mais diversos tipos de micro-organismos. É composta por inúmeras células, dentre elas, as que possuem função de barreira física para impedir infecções, de expressão de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) capazes de reconhecer padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), de produção de citocinas inflamatórias e proteínas antivirais e por fim, de eliminação daqueles patógenos que ultrapassam as barreiras epiteliais através de mecanismos como fagocitose, produção de metabólitos dependentes e independentes de O₂, além de uma série de enzimas liberadas³⁴.

As células fagocitárias, com papel desempenhado por macrófagos e neutrófilos, têm função extremamente importante no combate a fungos patogênicos. Dentre os vários mecanismos envolvidos nessa resposta contra os fungos, a modulação da resposta inflamatória e a atividade fungicida merecem destaque³⁵⁻³⁸. No entanto, para que essas células desempenhem atividade eficiente, há necessidade de ativação fornecida por citocinas, particularmente o IFN- γ , TNF- α e GM-CSF^{37,39-47}.

Em relação aos mecanismos através dos quais os monócitos e macrófagos ativados exercem sua atividade fungicida contra o *P. brasiliensis*, estudos em nosso laboratório demonstraram que a atividade fungicida de monócitos humanos ativados com TNF- α envolve a geração de metabólitos do oxigênio como a H₂O₂⁴⁶. Para os macrófagos murinos, os trabalhos têm demonstrado que a atividade antifúngica de macrófagos ativados com IFN- γ independe do metabolismo oxidativo, ocorrendo a participação dos metabólitos do

nitrogênio como o NO⁴⁸. No entanto, trabalho recente em nosso laboratório demonstrou que tanto a H₂O₂ como o NO participam da atividade fungicida de macrófagos murinos ativados com TNF- α ou IFN- γ ⁴⁹.

Nesse contexto, estudos recentes vêm focando não somente o papel de macrófagos e monócitos, como também a atuação de neutrófilos durante a PCM, uma vez que os infiltrados inflamatórios encontrados nos granulomas característicos da doença²¹, bem como nas lesões detectadas nos diferentes modelos experimentais^{27,50-53}, são ricos em polimorfonucleares, o que demonstra o envolvimento dinâmico dessas células na defesa do hospedeiro contra o *P. brasiliensis*.

1.2. Neutrófilos e a Paracoccidiodomicose

Os neutrófilos, também conhecidos como granulócitos polimorfonucleares (PMNs), são células de meia-vida curta, caracterizados por possuírem núcleo segmentado e grânulos em seu citoplasma. São gerados continuamente na medula óssea a partir de precursores mielóides, processo controlado pelo fator estimulador de colônia de granulócito (G-CSF)^{54,55}. Constituem cerca de 50 a 70% dos leucócitos circulantes na corrente sanguínea e exercem suas funções após serem rapidamente recrutados para o local da infecção através da expressão de moléculas e sinais quimiotáticos como interleucina-8 (IL-8), *keratinocyte chemoattractant* (KC) e *macrophage inflammatory protein 1 alpha* (MIP-1 α)^{34,56,57}. As citocinas interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), secretadas durante um processo infeccioso, induzem células endoteliais a expressar moléculas de adesão como selectinas em sua superfície e a produzir quimiocinas. Os PMNs circulantes ligam-se a essas

moléculas de superfície através de integrinas expressas em sua membrana e respondem às quimiocinas com o recrutamento de mais células para o local. Ocorre então o processo de rolamento pela parede do vaso sanguíneo próximo ao sítio da infecção, seguida de sua adesão estável ao endotélio e migração para o tecido alvo através das junções entre as células endoteliais, em um processo conhecido como diapedese^{34,55,58-62}.

Uma vez no local de destino, os PMNs entram em contato com o micro-organismo e assim realizam suas funções, tendo a capacidade de eliminar os patógenos através de múltiplos mecanismos⁶². Uma das principais funções dos PMNs é a fagocitose. Quando em contato com o patógeno, os PMNs são capazes de emitir prolongamentos de sua membrana plasmática (pseudópodes) e englobar o micro-organismo em vesículas intracelulares conhecidas como fagossomos. Posteriormente, grânulos presentes no citoplasma dos PMNs se fundem a essa vesícula e liberam seu conteúdo enzimático no interior da mesma, dando origem ao fagolisossomo, estrutura na qual ocorrerá a morte do patógeno por meio de mecanismos dependentes e independentes de oxigênio⁶³⁻⁶⁵.

Os mecanismos dependentes de oxigênio são exercidos através da ação da enzima NADPH oxidase, a qual é responsável pela produção de ânions superóxido (O_2^-) em PMNs ativados. O O_2^- sofre dismutação quando ligado à água, levando à formação de derivados tóxicos de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot). A H_2O_2 também pode ser catalisada pela ação da enzima mieloperoxidase, gerando um potente oxidante que é o ácido hipocloroso (HOCl), considerado como um dos principais mediadores de morte de patógenos por mecanismos dependentes de oxigênio⁶⁶⁻⁶⁸. As espécies reativas de oxigênio, principalmente H_2O_2 , são essenciais para a morte do *P. brasiliensis*^{36,37,46,47,49,69-}

Já os mecanismos independentes de oxigênio ocorrem através da extrusão do conteúdo granular dos PMNs, os quais possuem proteínas e enzimas com atividades microbicidas. Os grânulos primários ou azurófilos contém mieloperoxidase (MPO), peptídeos microbianos como defensinas, lisozimas e proteases como a elastase. Grânulos secundários contém lactoferrina e colagenase e, por fim, os grânulos terciários contém gelatinase⁷².

Em relação ao envolvimento dinâmico de PMNs na resposta deflagrada contra o *P. brasiliensis*, um dos primeiros estudos demonstrando a presença de PMNs em sítios de infecção pelo fungo, foi descrito por Labuki & Montenegro⁵³. Os autores identificaram que, após 24 horas da inoculação de *P. brasiliensis* em hamsters sírios, os fungos presentes no local inoculado se apresentavam circundados por PMNs, demonstrando que essas células eram as primeiras a serem recrutadas no processo infeccioso por *P. brasiliensis*. Além disso, infiltrado neutrofílico tem sido encontrado em sítios inflamatórios observados em pacientes²¹ e em lesões detectadas em modelos experimentais^{27,50-52}.

Calich *et al.*, em 1985⁷³, demonstraram que PMNs eram atraídos quimiotaticamente para a cavidade peritoneal por peptídeos de baixo peso molecular detectados em sobrenadante de macrófagos peritoneais de camundongos incubados com *P. brasiliensis*, sugerindo que os macrófagos sejam os responsáveis pelo primeiro sinal para a quimiotaxia dos PMNs. Outros estudos identificaram a associação das quimiocinas KC e MIP-1 α com a infiltração de PMNs nos pulmões de camundongos durante a fase aguda da infecção por *P. brasiliensis*⁵⁶. Já Gonzalez *et al.* (2005)⁷⁴ demonstraram que o recrutamento de PMNs é mediado pela expressão de moléculas de adesão celular como molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular (V-CAM-1), CD18, antígeno de macrófagos 1 (MAC-1) e antígeno associado a função de linfócitos 1 (LFA-1), induzidas por

citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e TNF- α . Por fim, camundongos “knockout” para o receptor Toll Like 9 (TLR9) e infectados com *P. brasiliensis* demonstraram um influxo excessivo de PMNs atraídos pelo aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , proteína inflamatória de macrófagos-2 alfa (MIP-2) e interleucina-17 (IL-17) produzidas por células dos pulmões, fígado e da cavidade peritoneal. Esse fato pode resultar em uma resposta imune desregulada e em um aumento de danos aos órgãos devido à liberação de proteases e de metabólitos tóxicos de oxigênio⁷⁵.

Estudos recentes vêm destacando o papel dos PMNs humanos na eliminação do *P. brasiliensis*, demonstrando também a necessidade de um processo de ativação dessas células para destruição do fungo. Os primeiros estudos realizados, buscando avaliar a atividade fungicida de PMNs contra o fungo, conduzidos experimentalmente por McEwen *et al.* (1987)⁷⁶, demonstraram que PMNs de camundongos sensibilizados com *P. brasiliensis* e estimulados com o fungo morto por via intraperitoneal, apresentaram maior atividade fungicida *in vitro*. No entanto, outros estudos identificaram apenas atividade fungistática de PMNs humanos não ativados contra esse fungo⁴², sendo os efeitos antifúngicos significativamente aumentados após a ativação com IFN- γ , IL-1 e GM-CSF, não tendo TNF- α e IL-8, efeito sobre essas atividades^{42,43}. Trabalhos semelhantes realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que PMNs humanos não ativados não apresentavam atividade fungicida contra o *P. brasiliensis*, e que, somente após ativação com IFN- γ , TNF- α , GM-CSF ou interleucina-15 (IL-15), essas células passavam a apresentar atividade fungicida contra esse fungo, sendo os mecanismos envolvidos dependentes de metabólitos de oxigênio como H₂O₂ e ânion superóxido^{47,70}.

Essas funções dependeriam inicialmente do reconhecimento fúngico realizado pelos Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) presentes nessas células. Dessa forma, Bonfim *et al.* (2009)⁷⁷ avaliaram a expressão de TLR2 e TLR4 em monócitos e PMNs humanos após estimulação com *P. brasiliensis* e sugeriram a participação de ambos os receptores no reconhecimento, internalização e consequente ativação das células contra o fungo. Entretanto, estudos do nosso grupo de pesquisa, avaliando o papel desses receptores na atividade de PMNs humanos desafiados com a cepa 18 de *P. brasiliensis*, sugerem que a interação do fungo com TLRs pode ser considerada um mecanismo de patogenicidade, uma vez que esse fungo usa TLR2 e principalmente TLR4 como porta de entrada nas células, escapando de suas funções efetoras, através da produção de IL-8 e IL-10. Além disso, os mecanismos de defesa dos PMNs contra o fungo, como a produção de H₂O₂, não envolviam a participação desses receptores. Costa *et al.* (2007)⁷⁸ também mostraram que a incubação concomitante de PMNs com IFN- γ , uma potente citocina ativadora, e interleucina-10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória, era capaz de bloquear a ativação de IFN- γ , com consequente diminuição da atividade fungicida e liberação de H₂O₂ por essas células.

O IFN- γ é a principal citocina produzida durante a fase efetora da resposta imune adaptativa do tipo Th1, estando envolvida com o direcionamento dessa resposta durante a resposta imune inata^{79,80}. As principais células envolvidas com a produção de IFN- γ durante essa fase seriam as células NK, no entanto trabalhos sugerem que PMNs poderiam ser importantes fontes de produção dessa citocina⁸¹. Assim, Rodrigues *et al.* (2014)⁸² buscando identificar a participação de PMNs como possíveis fontes de IFN- γ durante a fase inicial de resposta ao fungo, observaram que o *P. brasiliensis* era capaz de induzir PMNs humanos a produzirem IFN- γ , provavelmente pela ligação a TLR4 e dectina-1 expressos por essas

células. Observaram também que a produção de IFN- γ era aumentada após a ativação dos PMNs com IL-8, IL-15 e IL-18 isoladamente ou com a combinação de duas dessas citocinas, sendo que IL-12 e IL-15 em conjunto tiveram o melhor resultado na produção de IFN- γ . Dessa forma, os autores conseguiram estabelecer a hipótese de que durante a infecção com *P. brasiliensis*, os PMNs podem modular a resposta imune adaptativa induzindo uma ação protetora mediada por células de padrão Th1, através da produção sustentada de IFN- γ .

Recentemente, trabalho visando aprofundar os estudos sobre os receptores de PMNs envolvidos no reconhecimento de diferentes cepas do *P. brasiliensis* e consequente modulação da resposta imune através da produção de citocinas e mediadores inflamatórios, demonstrou que PMNs humanos não foram capazes de produzir TNF- α em resposta às cepas Pb 18 (alta virulência) e Pb 265 (baixa virulência)⁸³. Entretanto, foi observado um aumento significativo de interleucina-12 (IL-12), principalmente em resposta ao Pb 265, sendo essa produção mediada pela ligação do fungo com TLR2 e dectina-1. Além disso, foi verificado que os PMNs produziam uma quantidade aumentada de IL-10 em contato com Pb 18 quando comparada com o Pb 265. Assim, os resultados indicam que a cepa de alta virulência escape mais efetivamente dos mecanismos de defesa dos PMNs, através da indução da produção de IL-10, uma potente citocina supressora. Os autores identificaram, dessa maneira, que a cepa Pb 265 induz uma resposta de padrão pró-inflamatório, enquanto que a cepa Pb 18 induz uma resposta de padrão anti-inflamatório. Assim, esse estudo demonstra que, além de suas funções como células efetoras da imunidade inata, os PMNs também têm a capacidade de modular a resposta imune inata e adaptativa contra o fungo através da produção de citocinas e mediadores lipídicos. Esta modulação pode ser em direção a um padrão pró ou anti-inflamatório na dependência da cepa de *P. brasiliensis* e PRRs envolvidos no reconhecimento do fungo por estas células.

1.3. Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

Em 2004, uma nova função efetora de neutrófilos foi descrita. Brinkmann *et al.*⁸⁴ identificaram um mecanismo de defesa contra micro-organismos através da morte de PMNs e liberação de redes extracelulares conhecidas como Neutrophil Extracellular Traps (NETs). A NETose, como foi denominada a liberação de NETs, é um processo no qual os PMNs ativados têm a capacidade de lançarem redes compostas de conteúdo nuclear (histonas e cromatina descondensada) e granular (proteínas dos grânulos primários, secundários e terciários) para o meio extracelular a fim de capturar micro-organismos ou mesmo matá-los. As NETs são estruturas frágeis compostas por fibras de 15 a 17 nm de diâmetro e domínios globulares de aproximadamente 25nm que se agrupam formando redes⁸⁴. Essas estruturas foram inicialmente identificadas ao serem induzidas por alguns estímulos como IL-8, Phorbol Myristate Acetate (PMA), lipopolissacarídeo (LPS) e bactérias gram-positivas e negativas⁸⁴, entretanto, diversos grupos de pesquisa visaram buscar novos indutores, ampliando o leque de ação das NETS.

O processo de NETose já foi identificado em várias espécies como camundongos, cavalos, bovinos, peixes, gatos e estruturas semelhantes também foram identificadas em aves. Mais recentemente, a liberação de redes extracelulares foi identificada em invertebrados, demonstrando que esse não é um mecanismo exclusivo de algumas espécies e que pode ser considerada uma estratégia evolutiva conservada ao longo dos anos pelos PMNs⁸⁵⁻⁹⁴.

A liberação de redes extracelulares foi primeiramente descrita em PMNs, o que justifica o nome NETs⁸⁴, porém, ao longo dos anos, outras células foram identificadas como

sendo capazes de lançar mão dessa estratégia microbicida, tais como eosinófilos, mastócitos e basófilos, em menor escala, monócitos e macrófagos, sendo esse mecanismo conhecido como ETs (Extracellular Traps)⁹⁵⁻¹⁰³.

O processo de formação das NETs envolve a participação tanto do conteúdo nuclear quanto do conteúdo granular dos PMNs. Essas estruturas são compostas por fibras de cromatina descondensada associadas à histona e a fatores antimicrobianos provenientes dos grânulos neutrofílicos. Dentre esses fatores estão elastase, mieloperoxidase, catepsina-G, pentraxina-3 (PTX-3), calprotectina e outras proteínas do citoesqueleto, citosol, catalase e enzimas glicolíticas^{84,104-108}. Elastase e mieloperoxidase têm papel fundamental na descondensação do DNA através da degradação das ligações das histonas (localizadas no núcleo), permitindo assim elas também participem do processo de formação de NETs^{106,107,109}. Estudos demonstram que apenas um terço dos PMNs é capaz de utilizar esse mecanismo de defesa e que ocorre o envolvimento de receptores Fc, TLRs, e citocinas durante a ativação dessa via^{84,110,111}.

Em 2007, Fuchs *et al.*¹¹⁰ descreveram o processo de formação de NETs como um processo de morte celular. Após a ativação dos PMNs por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), foram observadas diversas alterações morfológicas, tanto no núcleo quanto no citoplasma em diferentes períodos. Sessenta (60) minutos após a ativação, o núcleo começou a perder sua característica lobular e a cromatina tornou-se descondensada, enquanto a membrana nuclear permanecia intacta. Posteriormente, a membrana do núcleo passou a se desintegrar, permitindo o extravasamento do conteúdo nuclear para o citoplasma e a junção com o conteúdo granular, que já estava disperso. Por fim, poros na membrana celular permitiam a liberação desse material e a morte do PMN ocorria. Nesse mesmo trabalho, os autores identificaram a diferença entre os processos de Netose, Necrose e Apoptose.

Durante a Netose, características da morte celular por Apoptose, como a fragmentação de DNA e a exposição de fosfatidilserina, não ocorriam. Já a diferença entre Netose e Necrose foi evidenciada pela integridade do envelope nuclear, que é perdida durante a Netose. Recentemente, em 2013, Yipp¹¹² demonstrou que a Netose não é necessariamente um processo de morte celular, podendo ser diferenciada em Netose vital e Netose suicida, como foram nomeadas. A Netose vital é caracterizada pela liberação do material das NETs e ainda por permitir que os PMNs sejam capazes de exercer suas funções normais. Esse processo ocorre através da formação de vesículas na membrana nuclear e a consequente extrusão dessas vesículas para o meio extracelular, sem que ocorra a morte da célula envolvida¹¹³. Yousefi *et al.* (2009)¹¹⁴ demonstraram que, após ativação com LPS, GM-CSF e C5a, PMNs foram capazes de liberar NETs de origem mitocondrial, contribuindo para a ideia da Netose vital. A Netose suicida corrobora os dados previamente descritos por Fuchs *et al.*, (2007)¹¹⁰, os quais demonstram que o processo de liberação de NETs necessariamente envolve a morte celular¹¹².

A indução da formação de NETs vem sendo amplamente descrita nos últimos anos. O indutor mais importante e mais utilizado durante as pesquisas é o PMA. O estudo pioneiro de NETs em 2004⁸⁴ já demonstrou que o PMA é um potente indutor da liberação dessas redes, sendo inclusive utilizado como controle positivo por muitos pesquisadores^{90,105,106}. Essa molécula sintética é uma ativadora da proteína quinase C (PKC), a qual é responsável direta pela ativação da NADPH oxidase e pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), essenciais para a formação de NETs^{115,116}. EROS foram identificados como participantes na formação dessas redes, uma vez que pessoas com deficiência na enzima NADPH oxidase, como os pacientes com doença granulomatosa crônica (CGD), apresentavam capacidade de atividade microbicida reduzida e não eram capazes de formar

NETs quando em contato com *Aspergillus nidulans* (*A. nidulans*), sendo essa capacidade recuperada após terapia gênica dos pacientes¹¹⁷. Além disso, Parker *et al.* (2011)¹¹⁸ demonstraram que a atividade microbicida da mieloperoxidase associada às NETs era mais eficiente na presença de H₂O₂, sendo que somente o H₂O₂ não foi capaz de eliminar a bactéria *S. aureus* utilizada no estudo.

Diversos micro-organismos foram identificados como capazes de induzir a formação de NETs, entre eles *Leishmania amazonensis* (*L. amazonensis*), *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *Eimeria bovis* (*E. bovis*), vírus da leucemia felina (FeLV), vírus da imunodeficiência humana (HIV), *Influenza A*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), *S. aureus*, *Candida albicans* (*C. albicans*) entre outros de uma lista crescente de patógenos^{88,92,110,119-127}. Quando em contato com os mais diversos patógenos, as NETs dispõem de dois mecanismos de ação muito importantes: eliminação direta do patógeno aprisionado através da ação de componentes microbicidas presentes nas NETs ou aprisionamento do micro-organismo, a fim de evitar sua disseminação e permitir o recrutamento de outras células do sistema imune para o sítio da infecção.

A primeira função, ou seja, a eliminação direta do patógeno, foi descrita para diversos micro-organismos como *Shigella flexneri* (*S. flexneri*), *C. albicans*, *L. amazonensis* e *S. aureus*^{84,105,113,119,126}. Brinkmann *et al.* (2004)⁸⁴ demonstraram que histonas e elastase presentes nas NETs são as responsáveis pela morte de *S. flexneri* através da ação em fatores virulentos da bactéria (IpaB). Quando relacionadas à *C. albicans*, as NETs foram capazes de aprisionar e matar tanto hifas quanto leveduras, em um processo mediado por proteínas presentes nos grânulos dos PMNs, mais especificamente a calprotectina, uma proteína

constitutiva de PMNs relacionada com atividade antifúngica^{105,126}. NETs liberadas por PMNs ativadas com PMA e sem ativação foram capazes de aprisionar e matar formas promastigotas de *L. amazonensis*, através da ligação iônica dessas redes com a superfície carregada negativamente por lipofosfoglicano (LPG), expresso na membrana da forma promastigota do protozoário¹¹⁹. Por fim, quando em contato com *S. aureus*, as NETs foram liberadas em um mecanismo extremamente rápido que ocorre através da extrusão de vesículas carregadas de DNA nuclear para o meio extracelular, sem que ocorresse a morte dos PMNs e nem o envolvimento de espécies reativas de oxigênio, sendo, dessa forma, capaz de matar a bactéria¹¹³.

Já a segunda função das NETs envolve o aprisionamento dos patógenos e foi demonstrado ter essa ação contra muitos micro-organismos como *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*), *S. aureus*, *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*), entre outros¹²⁷⁻¹³¹. Esses patógenos foram identificados como detentores de mecanismos de evasão dessas redes, fazendo com que a função efetora das NETs ficasse limitada ao aprisionamento, o qual pode ser responsável por permitir o recrutamento das outras células do sistema imune que irão auxiliar no “clearance” da infecção ou mesmo inibir o crescimento do patógeno, como é evidenciado no estudo de McCormick *et al.* (2010)¹²⁹, o qual demonstra que as NETs induzidas por PMA inibem o crescimento de *A. fumigatus* num processo mediado pela quelação de zinco por calprotectina, um dos principais componentes das NETs. Ramos-Kichik *et al.* (2009)¹²⁸ demonstraram que duas formas de *Mycobacterium*, *M. tuberculosis* e *Mycobacterium canetti* (*M. canetti*), diferentes em sua virulência, foram capazes de induzir a formação de NETs de uma maneira semelhante ao PMA, IL-8 e outros micro-organismos, porém essas redes não foram capazes de matar a bactéria. Diferentemente do descrito pelo grupo de

pesquisa de Pilszczek¹¹³, foi demonstrado que *S. aureus* pode escapar da morte pelas NETs através da expressão de nucleases¹³². Outro estudo demonstrou que a leucotoxina GH, um fator de virulência expresso por essa bactéria, embora induza a formação de NETs, essas estruturas são somente capazes de realizar a captura do micro-organismo, permitindo possivelmente o aumento do “clearance” do patógeno *in vivo*¹³⁰. Por fim, Thammavongsa *et al.* (2013)¹³¹ identificaram que *S. aureus* escapa dos mecanismos de defesa do hospedeiro via degradação de NETs, através de sua conversão em desoxiadenosina, a qual, por sua vez, desencadeia a morte de outras células do sistema imune mediada por caspase-3. Em relação à bactéria *Streptococcus*, pesquisadores mostraram que *Streptococcus* do grupo A (GAS) expressam uma potente DNase (Sda1), a qual é suficiente para promover a resistência da bactéria em um modelo murino de fascite necrosante¹³³. Além disso, foi demonstrado que *S. sanguinis*, uma bactéria pertencente à flora da cavidade oral, é capaz de produzir uma molécula em sua superfície conhecida como nuclease ancorada na parede celular (SWAN), identificada como responsável pela degradação de NETs e assim permitir o escape da morte por esse mecanismo de defesa do hospedeiro¹²⁷. O papel de aprisionamento das NETs também foi demonstrado para o vírus HIV. Saitoh *et al.* (2012)¹²⁵ identificaram que as NETs, quando em contato com vírions de HIV, eram responsáveis pela captura dessas partículas mediada pela ação de mieloperoxidase e α -defensina, abundantes nessas estruturas em formato de rede e responsáveis pela redução da infecção do HIV. Entretanto, foi demonstrado que o vírus HIV é capaz de neutralizar esse mecanismo de resposta imune através da indução da produção de IL-10 dependente de lectina. A IL-10 suprime a liberação de NETs via EROS, permitindo a evasão do vírus.

Pensando exclusivamente na relação das NETs com fungos patogênicos, *C. albicans*, *A. fumigatus* e *Cryptococcus gattii* (*C. gattii*) foram identificados como capazes de induzir a

formação de NETs. As NETs foram responsáveis pelo aprisionamento e morte de hifas e leveduras de *C. albicans* em mecanismo dependente do conteúdo granular dos PMNs e independente de histonas¹²⁶. Pesquisadores do mesmo grupo identificaram, em 2009¹⁰⁵, que a ação microbicida das NETs estava ligada à calprotectina, uma proteína granular que foi considerada o principal componente antifúngico das NETs. O estudo ainda observou que, durante a infecção por *C. albicans in vivo*, a calprotectina foi essencial para o “clearance” do agente patogênico. Recentemente, Byrd *et al.* (2013)¹³⁴ demonstraram que, para que ocorra liberação de NETs durante infecções fúngicas em tecido, é necessário o contato com a matriz extracelular. Esse contato se dá através da interação da fibronectina, presente na MEC, e do reconhecimento da β -glucana na parede do fungo pelo receptor C3 do PMN, em um processo independente da produção de EROS, permitindo a minimização do dano tecidual causado por esses metabólitos tóxicos. A relação das NETs com *Aspergillus spp.* foi primeiramente descrita em pacientes com doença granulomatosa crônica (CGD)¹¹⁷. Pacientes com CDG apresentam deficiência na enzima NADPH oxidase, é a principal responsável pela produção de EROS, e como já mencionado anteriormente, são metabólitos importantes na formação de NETs. A aspergilose invasiva é considerada a principal causa de morte desses pacientes, uma vez que os mesmos não têm uma resposta adequada através da produção de espécies reativas de oxigênio, sendo então susceptíveis às infecções recorrentes e possivelmente fatais. Após terapia gênica, esses pacientes tiveram a reabilitação da atividade da enzima NADPH oxidase, tornando-se capazes de produzir NETs contra o fungo *A. nidulans*, em um mecanismo dependente de calprotectina, liberada juntamente com as NETs¹³⁵. Röhm *et al.* (2014)¹³⁶ identificaram que a NADPH oxidase é necessária para o “clearance” das hifas de *A. fumigatus* presentes no pulmão de camundongos e para a modulação da NETose e da apoptose de PMNs *in vivo*. A presença da

NADPH oxidase pode aumentar a defesa do hospedeiro contra o fungo através da indução de NETs, enquanto que a estimulação da apoptose promove a resolução da inflamação e evita maiores danos teciduais. Além disso, foi demonstrado que *A. fumigatus* também foi capaz de induzir a formação de NETs *in vitro*, entretanto, essas estruturas em formato de rede apenas aprisionaram o fungo e inibiram seu crescimento¹²⁹. Em estudo com *C. gattii*, as NETs não foram capazes de provocar a morte do fungo *in vitro*, muito provavelmente pelo lançamento de fibras extracelulares pelo fungo, caracterizando um fator de virulência e uma adaptação estrutural para a comunicação fungo-célula do hospedeiro¹³⁷. Por fim, nosso grupo de estudo também visou identificar a indução de NETs por mais um fungo patogênico, o *P. brasiliensis*. Foi identificado que a cepa virulenta do fungo, Pb 18, foi capaz de induzir a formação de NETs *in vitro* através principalmente, da ação do receptor Dectina-1 dos PMNs no reconhecimento de β -glucanas da parede do fungo¹³⁸. Os fungos, em geral, apresentam-se como um desafio para o sistema imune, uma vez que se desenvolvem tanto em pequenas leveduras quanto em formas muito grandes, o que impede sua fagocitose. Branzk *et al.* (2014)¹³⁹ demonstraram que a liberação de NETs depende da morfologia do fungo. Quando o PMN se depara com um micro-organismo muito grande para ser fagocitado, a elastase presente nos grânulos dos PMNs é liberada para o citoplasma devido à ausência de fagossomos. Essa elastase pode então migrar para o núcleo para auxiliar no processo de descondensação da cromatina e isso permite que as células fagocitárias diferenciem o tamanho dos patógenos. Os autores ainda demonstraram que os PMNs, ao serem recrutados para o sítio da infecção, são responsáveis por identificar o tamanho do patógeno e, a partir disso, dirigir a resposta imune para a eliminação dos micro-organismos maiores através da NETose ou minimizar os danos teciduais quando o agente patogênico pode ser morto através da fagocitose.

Até recentemente, as NETs estavam envolvidas apenas com efeitos benéficos ao hospedeiro, atuando de maneira significativa no combate aos mais diversos tipos de infecção. Entretanto, muitos estudos vêm identificando a presença dessas estruturas em outras condições humanas e correlacionando-as com as mais diversas patologias. Durante o exercício físico de alta intensidade, ocorre uma situação de estresse oxidativo, além de outras condições que induzem a mobilização e ativação de leucócitos, plaquetas e outras alterações trombóticas e fibrinolíticas, levando a um aumento dos níveis de DNA livre circulante. Beiter *et al.* (2014)¹⁴⁰ relacionaram a presença desse DNA livre no plasma, correlacionados à mieloperoxidase, com a formação de NETs, a qual é contrabalanceada, em indivíduos saudáveis, pelo aumento da atividade de DNase-1 sérica. Além disso, os autores concluíram que o monitoramento da relação DNA livre/DNase em resposta à atividade física intensa poderá ser uma ferramenta para identificar pessoas com risco aumentado de doenças cardiovasculares, autoimunidade e fadiga crônica.

Quando correlacionadas às patologias, as NETs têm seu envolvimento descrito através de seus principais componentes. Fuchs *et al.* (2010)¹⁴¹ demonstraram, em modelo experimental, que a presença das NETs induz a adesão e agregação plaquetária através da ação das histonas presentes nessas redes. Além disso, as NETs podem funcionar como depósitos para fibrina e eritrócitos, permitindo a organização e estabilização do trombo e assim, agravando ainda mais o processo de trombose. Já em humanos, a trombose venosa profunda foi associada com um aumento significativo de DNA extracelular livre no plasma, associado com outros biomarcadores como mieloperoxidase e fator de von Willebrand (VWF)¹⁴².

Em relação às doenças autoimunes, a participação do processo de NETose está ligado ao fato de que alguns componentes presentes nas NETs são reconhecidos como próprios e assim, induzem a autoimunidade¹⁴³, como ocorre no Lúpus Eritematoso Sistemico (SLE), na Psoríase e na Vasculite de Pequenos Vasos (SVV). Durante o lúpus, ocorre uma produção excessiva de auto-anticorpos contra uma variedade de antígenos nucleares como histonas e DNA dupla fita. Adicionado a esse fato, níveis elevados de várias proteínas granulares de PMNs e anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) foram encontrados no soro de pacientes com SLE. Uma vez que esses antígenos são os principais componentes das NETs, ocorre uma produção aberrante dessas redes nessa patologia e com isso, o agravamento do estado do paciente através de dano tecidual¹⁴⁴. Leffler *et al.*, em 2012¹⁴⁵, identificaram que pacientes com SLE ativa, possuíam níveis significativamente elevados de anticorpos contra histonas e DNA dupla fita. Além disso, esses pacientes apresentavam menor capacidade de degradar NETs através da ação de DNase sérica e a presença dessas redes não degradadas era responsável por ativar o sistema complemento via ligação DNA-C1q, o que induz a inflamação e modula a resposta imune adaptativa, gerando mais anticorpos NET-específicos e potencialmente exacerbando a doença. O número aumentado de PMNs e mastócitos nas lesões da psoríase, observado por Lin *et al.* em 2012¹⁴⁶, contribui para a liberação de IL-17 no local através da produção de redes extracelulares por esses dois tipos celulares. A IL-17 tem papel central nas doenças autoimunes, sendo relacionadas à gravidade das mesmas¹⁴⁶. Uma vez que essa citocina é liberada pelas principais células presentes nas lesões da psoríase durante a extrusão do material extracelular, o controle da liberação de NETs e (MCETs), por mastócitos, através de novas terapias torna-se uma importante ferramenta para o tratamento da psoríase¹⁴⁶. Já, a vasculite de pequenos vasos (SVV) é uma doença autoimune relacionada a presença de auto-anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos

(ANCA). Foi demonstrado que essas redes são formadas em resposta a esses auto-anticorpos, uma vez que esses ANCA são capazes de induzir a produção de EROS através da ligação com mieloperoxidase (MPO) e proteinase 3 (PR3), e que, estando presentes em rins de pacientes com SVV, são responsáveis pelo aumento do dano tecidual encontrado nesses indivíduos¹⁴⁷.

O papel das NETs também foi elucidado em uma das principais patologias gestacionais, a preeclâmpsia. Durante essa patologia, ocorre uma ativação exacerbada do sistema imune inato provocada pela liberação de micropartículas de sinciotrofoblasto (STBM) e por citocinas como IL-8. Esses dois componentes, por sua vez, foram capazes de induzir a formação de NETs, contribuindo para o aumento do DNA livre circulante detectado nessa doença e para a severidade da doença¹⁴⁸. Outro acontecimento importante durante a preeclâmpsia é a hipóxia. O mesmo grupo de pesquisa demonstrou que, durante a perfusão reduzida da placenta causada pela resistência das artérias uterinas, ocorre formação de espécies reativas de oxigênio e essas são as responsáveis pela ativação neutrofílica e formação de NETs. A presença dessas redes dificulta ainda mais a circulação sanguínea através do espaço interviloso, aumentando assim o grau de hipóxia e o estresse oxidativo na placenta¹⁴⁹.

Quando a NETose foi relacionada ao câncer, Cools-Lartigue *et al.* (2013)¹⁵⁰ demonstraram que a presença das NETs em pacientes com infecções sistêmicas pode ser responsável pelo aprisionamento de células tumorais circulantes e assim induzir metástase, levando esses pacientes à morte mais frequentemente quando comparado com aqueles pacientes com câncer e sem infecção.

O envolvimento das NETs também foi identificado na diabetes tipo 2. Pacientes e modelos experimentais demonstraram que a hiperglicemia induz alterações na quimiotaxia de PMNs, fagocitose e propriedades bactericidas, levando esses pacientes a uma maior suscetibilidade a infecções. Em altas concentrações de glicose, PMNs de pacientes diabéticos demonstraram uma baixa formação de NETs, assim como uma redução na atividade da elastase ligada a essas redes, mostrando dessa forma que a propriedade microbicida das NETs estava reduzida nesses indivíduos¹⁵¹.

Por fim, as NETs também foram relacionadas a doenças pulmonares, como síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e lesão pulmonar aguda (LPA), além de outras infecções que acometem o pulmão como a aspergilose. A SDRA e a LPA são caracterizadas por ativação e migração excessiva de PMNs para o pulmão¹⁵², sendo que a alta concentração dessas células em lavados broncoalveolares de pacientes com SDRA é relacionada com a gravidade da doença¹⁵³. Já a elevada presença de PMNs e de NETs contribui para a patologia da LPA através da indução da morte das células epiteliais pulmonares pelas redes extracelulares¹⁵⁴.

Considerando o fato das NETs possuírem ação em diversas patologias pulmonares e sendo a Paracoccidiodomicose uma doença de principal acometimento pulmonar, com formação de granulomas infiltrados de PMNs, torna-se extremamente importante a identificação das redes extracelulares nas lesões desses pacientes, bem como estudos adicionais para compreensão da real participação dessas estruturas durante a resposta imune do hospedeiro contra o *P. brasiliensis*.

2. Referências

1. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioomycosis: 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. Paracoccidioomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica.* 2002; 18(5):1441-54.
3. Restrepo A, Tobón, AM. *Paracoccidiooides 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. Paracoccidioomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. *Future Microbiol.* 2013; 8(9):1177-91.
5. Marques SA. Paracoccidioomycosis: 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 *Paracoccidiooides 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 *Paracoccidiooides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 2009;52:273–83.
8. Lutz A. Uma mycose pseudococcidica localisada na bocca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. *Bras Med.* 1908; 22:21-4.

9. Franco M. Host–parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 1987; 25:5–18.
10. Silva-Vergara ML, Martinez R, Chadu A, Madeira M, Freitas-Silva G, Leite Maffei CM. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol.* 1998; 36(1):37-42.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Severo LC, Geyer GR, Londero AT, Porto NS, Rizzon CF. The primary pulmonary lymph node complex in Paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 1979; 67(2):115-8.
16. 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.

17. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Blotta MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidiodomycosis: comparisons with infected and non-infected controls. *Microbes Infect.* 2002; 4:139-144.
18. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques AS, Dillon NL, Mota NGS. Paracoccidiodomycosis: a recently proposed classification of its clinical form. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1987;20(2):129-32.
19. Franco M, Peracoli MT, Soares A, Montenegro R, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidiodomycosis. *Curr Top Med Mycol.* 1993;5:115-49.
20. Mendes RP. The gamut of clinical manifestations. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. *Paracoccidiodomycosis.* Flórida, USA. Boca Raton: CRC Press;1994 p.233-58.
21. Franco M, Montenegro MRG. Anatomia Patológica. In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo AM. *Paracoccidiodomicose.* São Paulo: Sarvier-EDUSP;1982 p.97-117.
22. Mendes RP. Quadro Clínico. In: Veronesi R, Focaccia R. *Tratado de Infectologia.* Rio de Janeiro: Atheneu; 1997 p.1803.
23. 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 paracoccidiodomycosis. *Infect Immun.* 1984; 46(2):346-53.
24. Lacerda GB, Arce-Gomez B, Telles Filho FQ. Increased frequency of HLA-B40 in patients with paracoccidiodomycosis. *J Med Vet Mycol.* 1988;26(4):253-6.
25. Peraçoli MTS, Soares AMVC. Imunologia da paracoccidiodomicose. In: Tosta CE. *Imunologia das infecções.* Uberaba: FUNEPU; 1992 p.15-36.

26. de Castro LF, Ferreira MC, da Silva RM, Blotta MH, Longhi LN, Mamoni RL. Characterization of the immune response in human paracoccidiodomycosis. *J Infect.* 2013;67(5):470-85.
27. Calich VLG, Russo M, Vaz CAC, Burger E, Singer-Vermes LM. Resistance mechanism to experimental *Paracoccidiodes brasiliensis* infection. *Ciênc Cult.* 1994;46:455-61.
28. Musatti CC, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Rezkallah-Iwasso MT. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidiodomycosis. In: Fanco MF, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. *Paracoccidiodomycosis*. Flórida, USA. Boca Raton: CRC Press;1994. P.175-86.
29. Peraçoli MT, Fortes MR, Da Silva MF, Montenegro MR. Natural killer cell activity in experimental paracoccidiodomycosis of the Syrian hamster. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1995;37(2):129-36.
30. Calich VL, Vaz CA, Burger E. Immunity to *Paracoccidiodes brasiliensis* infection. *Res Immunol.* 1998;149(4-5):407-17; discussion 499-500.
31. Calich VL, da Costa TA, Felonato M, Arruda C, Bernardino S, Loures FV, et al. Innate immunity to *Paracoccidiodes brasiliensis* infection. *Mycopathologia.* 2008;165(4-5):223-36.
32. 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 paracoccidiodomycosis. *Med Mycol.* 2002;40(2):153-9.
33. Pereira RM, Bucarechi F, Barison Ede M, Hessel G, Tresoldi AT. Paracoccidiodomycosis in children: clinical presentation, follow-up and outcome. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004;46(3):127-31.

34. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai, S. *Imunologia celular e molecular* – 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2012.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. Nicola AM, Casadevall A, Goldman DL. Fungal killing by mammalian phagocytic cells. *Curr Opin Microbiol*. 2008;1:313-7.
39. Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA. In vivo and in vitro activation of pulmonar macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. *J Immunol*. 1988;140(8):2786-9.
40. Cano LE, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. Fate of conidia of *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokine-treated macrophages. *Infect Immun*. 1992;60(5):2096-100.

41. Moscardi-Bacchi M, Brummer E, Stevens DA. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. *J Med Microbiol.* 1994;40(3):159-64.
42. Kurita N, Oarada M, Ito E, Miyaji M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 1999;37:261-7.
43. Kurita N, Oarada M, Miyaji M, Ito E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2000;38:177-82.
44. Soares AM, 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;102(4):480-5.
45. Calvi SA, Soares AM, Peraçoli MT, Franco M, Ruiz RL Jr, Marcondes-Machado J, et al. Study of bronchoalveolar lavage fluid in paracoccidioidomycosis: cytopathology and alveolar macrophage function in response to gamma-interferon; comparison with blood monocytes. *Microbes Infect.* 2003;5(15):1373-9.
46. Carmo JP, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MT, Soares AM. TNF-alpha activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by a H₂O₂-dependent mechanism. *Med Mycol.* 2006;44(4):363-8.

47. 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.
48. Gonzalez A, de Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against Paracoccidioides brasiliensis conidia. Infect Immun. 2000;68(5):2546-52.
49. 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 and NO effector mechanisms. Mycopathologia. 2008;166(1):17-23.
50. Defaveri J, Rezkallah-Iwasso MT, Franco MF. Pulmonary paracoccidioidomycosis in immunized mice. Mycopathologia. 1992;119:1-9.
51. 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.
52. Kerr IB, Araripe PCO, Lenzl HL. Paracoccidioidomycosis in experimentally-infected rats. Ver Inst Med Trop São Paulo. 1988;30:336-50.
53. 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.

54. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, et al. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood*. 1994;84(6):1737-46.
55. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2010;10 (6):427-39.
56. 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.
57. Segal AW. How neutrophil kill microbes. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:197-223.
58. Dallegri F, Ottonello L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm Res*. 1997;46(10):382-91.
59. Kobayashi SD, Voyich JM, DeLeo FR. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect*. 2003;5(14):1337-44.
60. Liu H, Pope RM. Phagocytes: mechanisms of inflammation and tissue destruction. *Rheum Dis Clin North Am*. 2004;30(1):19-39.
61. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade update. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(9):678-89.
62. Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med*. 2011;17(11):1381-90.
63. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:173-82.

64. Timár CI, Lőrincz AM, Ligeti E. Changing world of neutrophils. *Pflugers Arch.* 2013;465(11):1521-33.
65. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol.* 2014;15(7):602-11.
66. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* 1998;92(9):3007-17.
67. Parker H, Winterbourn CC. Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Front Immunol.* 2013;3:424.
68. Winterbourn CC, Kettle AJ. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(6):642-60.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:181-218.
73. Calich VL, Coppi Vaz CA, Burger E. PMN chemotactic factor produced by glass-adherent cells in the acute inflammation caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br J Exp Pathol.* 1985;66(1):57-65.

74. Gonzalez A, Lenzi HL, Motta EM, Caputo L, Sahaza JH, Cock AM, et al. Expression of adhesion molecules in lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Microbes Infect.* 2005;7(4):666-73.
75. Menino JF, Saraiva M, Gomes-Alves AG, Lobo-Silva D, Sturme M, Gomes-Rezende J, et al. TLR9 activation dampens the early inflammatory response to *Paracoccidioides brasiliensis*, impacting host survival. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(7):e2317.
76. McEwen JG, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. Effect of murine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis* [corrected]. *Am J Trop Med Hyg.* 1987;36(3):603-8.
77. Bonfim CV, Mamoni RL, Blotta MH. TLR-2, TLR-4 and Dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2009;47(7):722-33.
78. Costa DL, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Bordon AP, Tavian EG, Peraçoli MT, et al. Effect of interleukin-10 on the *Paracoccidioides brasiliensis* killing by gamma-interferon activated human neutrophils. *Microbiol Immunol.* 2007;51(1):73-80.
79. Trinchieri G. Interleukin-12 and interferon-gamma. Do they always go together? *Am J Pathol.* 1995;147(6):1534-8.
80. Wysocka M, Kubin M, Vieira LQ, Ozmen L, Garotta G, Scott P, et al. Interleukin-12 is required for interferon-gamma production and lethality in lipopolysaccharide-induced shock in mice. *Eur J Immunol.* 1995;25(3):672-6.
81. Ethuin F, Delarche C, Benslama S, Gougerot-Pocidal MA, Jacob L, Chollet-Martin S. Interleukin-12 increases interleukin-8 production and release by human polymorphonuclear neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2001;70(3):439-46.

- 82.** Rodrigues DR, Fernandes RK, Balderramas Hde A, Penitenti M, Bachiega TF, Calvi SA, et al. Interferon-gamma production by human neutrophils upon stimulation by IL-12, IL-15 and IL-18 and challenge with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Cytokine*. 2014;69(1):102-9.
- 83.** Balderramas HA, Penitenti M, Rodrigues DR, Bachiega TF, Fernandes RK, Ikoma MR, et al. Human neutrophils produce IL-12, IL-10, PGE2 e LTB4 in response to *Paracoccidioides brasiliensis*. Involvement of TLR2, mannose receptor and dectin-1. *Cytokine*. 2014;67(1):36-43.
- 84.** 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.
- 85.** 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.
- 86.** Lim MB, Kuiper JW, Katchky A, Goldberg H, Glogauer M. Rac2 is required for the formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of Leukocyte Biology*. 2011;90(4):771-6.
- 87.** Alghamdi AS, Foster DN. Seminal Dnase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. *Biol Reprod*. 2005;73(6):1174-81.
- 88.** 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.
- 89.** Grinberg N, Elazar S, Rosenshine I, Shpigel NY. Beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2008;76(6):2802-7.

90. Aulik NA, Hellenbrand KM, Klos H, Czaprynski CJ. Mannheimia haemolytica and its leukotoxin cause neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils. *Infect Immun*. 2010;78(11):4454-66.
91. 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.
92. 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.
93. 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.
94. Robb CT, Dyrzynda EA, Gray RD, Rossi AG, Smith VJ. Invertebrate extracellular phagocyte traps show that chromatin is an ancient defence weapon. *Nat Commun*. 2014;5:4627.
95. 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.
96. Simon D, Hoesli S, Roth N, Staedler S, Yousefi S, Simon HU. Eosinophil extracellular DNA traps in skin diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(1):194-9.
97. 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.

98. 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.
99. 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.
100. 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.
101. Goldmann O, Medina E. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. *Front Immunol.* 2013;3:420.
102. 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.
103. Morshed M, Hlushchuk R, Simon D, Walls AF, Obata-Ninomiya K, Karasuyama H, et al. NADPH oxidase-independent formation of extracellular DNA traps by basophils. *J Immunol.* 2014;192(11):5314-23.
104. 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.
105. 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.

106. 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.
107. 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.
108. Zawrotniak M, Rapala-Kozik M. Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta Biochim Pol.* 2013;60(3):277-84.
109. 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.
110. 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.
111. 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.
112. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood.* 2013;122(16):2784-94.
113. 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.
114. 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.

115. 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.
116. 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.
117. 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.
118. 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.
119. 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.
120. Munafo DB, Johnson JL, Brzezinska AA, Ellis BA, Wood MR, Catz SD. DNase I inhibits a late phase of reactive oxygen species production in neutrophils. *J Innate Immun*. 2009;1(6):527-42.
121. Baker VS, Imade GE, Molta NB, Tawde P, Pam SD, Obadofin MO, et al. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age. *Malar J*. 2008;7:41.

122. Behrendt JH, Ruiz A, Zahner H, Taubert A, Hermosilla C. Neutrophil extracellular trap formation as innate immune reactions against the apicomplexan parasite *Eimeria bovis*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010;133(1):1-8.
123. Narasaraju T, Yang E, Samy RP, Ng HH, Poh WP, Liew AA, et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am J Pathol*. 2011;179(1):199-210.
124. Hakkim A, Fuchs TA, Martinez NE, Hess S, Prinz H, Zychlinsky A, et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol*. 2011;7(2):75-7.
125. 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*. 2012;12(1):109-16.
126. 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.
127. 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.
128. Ramos-Kichik V, Mondragón-Flores R, Mondragón-Castelán M, Gonzalez-Pozos S, Muñoz-Hernandez S, Rojas-Espinosa O, et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009;89(1):29-37.
129. 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.

- 130.** 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.
- 131.** Thammavongsa V, Missiakas DM, Schneewind O. Staphylococcus aureus degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. *Science.* 2013;342(6160):863-6.
- 132.** 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(6):576-86.
- 133.** Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, et al. DNase expression allows the pathogen group A Streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol.* 2006;16(4):396-400.
- 134.** Byrd AS, O'Brien XM, Johnson CM, Lavigne LM, Reichner JS. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *J Immunol.* 2013;190(8):4136-48.
- 135.** Bianchi M, Niemiec MJ, Siler U, Urban CF, Reichenbach J. Restoration of anti-*Aspergillus* defense by neutrophil extracellular traps in human chronic granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-dependent. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(5):1243-52.e7.
- 136.** Röhm M, Grimm MJ, D'Auria AC, Almyroudis NG, Segal BH, Urban CF. NADPH oxidase promotes neutrophil extracellular trap formation in pulmonary aspergillosis. *Infect Immun.* 2014;82(5):1766-77.

137. Springer DJ, Ren P, Raina R, Dong Y, Behr MJ, McEwen BF, et al. Extracellular fibrils of pathogenic yeast *Cryptococcus gattii* are important for ecological niche, murine virulence and human neutrophil interactions. *PLoS One*. 2010;5(6):e10978.
138. Bachiega TF, Fernandes RK, Rodrigues DR, Balderramas HA, Dias-Melicio LA, Soares AMVC. *Paracoccidioides brasiliensis* induces neutrophil extracellular traps in vitro. *Front. Immunol.* 2013 Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI).
139. 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.
140. Beiter T, Fragasso A, Hudemann J, Schild M, Steinacker J, Mooren FC, et al. Neutrophils release extracellular DNA traps in response to exercise. *J Appl Physiol* (1985). 2014;117(3):325-33.
141. 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.
142. 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.
143. Knight JS, Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Proteins derived from neutrophil extracellular traps may serve as self-antigens and mediate organ damage in autoimmune diseases. *Front Immunol*. 2012;3:380.
144. Yu Y, Su K. Neutrophil extracellular traps and Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Cell Immunol*. 2013;4.pii:139.

145. 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.
146. 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.
147. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*. 2009;15(6):623-5.
148. Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Gebhardt S, Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum Immunol*. 2005;66(11):1146-54.
149. Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Hahn S. Neutrophil NETs: a novel contributor to preeclampsia-associated placental hypoxia. *Semin Immunopathol*. 2007;29(2):163-7.
150. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest*. 2013.pii:67484.
151. Joshi MB, Lad A, Bharath Prasad AS, Balakrishnan A, Ramachandra L, Satyamoorthy K. High glucose modulates IL-6 mediated immune homeostasis through impeding neutrophil extracellular trap formation. *FEBS Lett*. 2013;587(14):2241-6.
152. Cheng OZ, Palaniyar N. NET balancing: a problem in inflammatory lung disease. *Front Immunol*. 2013;4:1.
153. Grommes J, Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med*. 2011;17(3-4):293-307.

- 154.** Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, et al. Neutrophil extracellular trap directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. PLoS One. 2012;7(2):e32366.

Capítulo 11

Manuscrito

IDENTIFICATION OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS (NETs) IN TEGUMENTARY LESIONS OF PATIENTS WITH PARACOCCIDIODOMYCOSIS AND NETs GENERATION *IN VITRO*

**Amanda Manoel Della Coletta¹, Tatiana Fernanda Bachiega², Juliana Carvalho de Quaglia e Silva¹,
Silvio Alencar Marques³, Mariângela Esther Alencar Marques¹, Julio DeFaveri¹, Valdecir Farias
Ximenes⁴, Ângela Maria Victoriano de Campos Soares², Luciane Alarcão Dias-Melicio^{1*}**

¹ UNESP – Univ Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Departamento de Patologia, Distrito de Rubião Junior S/N, Botucatu, SP, Brasil.² UNESP - Univ Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Distrito de Rubião Junior S/N, Botucatu, SP, Brasil.³ UNESP - Univ Estadual Paulista, FMB, Departamento de Dermatologia e Radioterapia, Distrito de Rubião Junior S/N, Botucatu, SP, Brasil.⁴UNESP - Univ Estadual Paulista, Faculdade de Ciências, Departamento de Química, Bauru, SP, Brasil.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2011/18855-7), CNPq 480486/2011-5 and Fundunesp 00637/11-DFP; FAPESP MS fellowship (AMDC - FAPESP 2013/00788-7). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: ladiasmelicio@fmb.unesp.br

Manuscrito redigido de acordo com as normas da revista Plos Neglected Tropical Diseases

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis, endemic in most Latin American countries, especially in Brazil. It is caused by the thermo-dimorphic fungus of the genus *Paracoccidioides* (*P. brasiliensis* and *P. lutzii*). Innate immune response plays a crucial role in host defense against fungal infections and neutrophils are able to combat microorganisms with three different mechanisms: phagocytosis, secretion of their granular proteins, which have antimicrobial properties, and the most recent described mechanism called NETosis. This new process, characterized by the release of net like structures composed by nuclear (decondensed DNA and histones) and granular material such as elastase, is called Neutrophil Extracellular Traps (NETs). Several microorganisms have the ability of inducing NETs formation, including gram-positive and gram-negative bacteria, viruses and some fungi. We proposed to identify NETs in tegumentary lesions of patients with Paracoccidioidomycosis, and to analyze the interaction between two strains of *P. brasiliensis* and human neutrophils by NETs formation *in vitro*. In this context, the presence of NETs *in vivo* was evidenced in tegumentary lesions of patients with Paracoccidioidomycosis by confocal spectrum analyzer. Furthermore, we showed that the high virulent *P. brasiliensis* strain 18 (Pb 18) and the lower virulent strain Pb 265 are able to induce NETs formation and release *in vitro*. The quantification of the extracellular DNA corroborates the idea of the ability of *P. brasiliensis* in inducing the NETs release. In conclusion, our data show for the first time the identification of NETs in lesions of patients with paracoccidioidomycosis and corroborate other data on the induction of NETs by the fungus. The presence of NETs components both *in vitro* and *in vivo* open new possibilities for the detailed investigation of pulmonary immunity in Paracoccidioidomycosis.

Author Summary

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a granulomatous infectious disease caused by fungi of the genus *Paracoccidioides* (*P. brasiliensis* and *P. lutzii*). PCM is endemic in Latin America, where about 10 million people are infected, and most Latin American countries report occurrence of the fungus, with a greater incidence in Brazil, Venezuela, Colombia, Ecuador and Argentina. Sporadic cases have been reported in the United States (USA), European countries, and Japan, in individuals coming from endemic areas. The disease may present in various forms, from localized and benign to disseminated, severe, and progressive, with fatal evolution. It is characterized by a polymorphism of lesion and can affect any organ, in particular, the lungs mainly, the skin, the lymph nodes, the oral, nasal and gastrointestinal mucous membranes, the suprarenal glands, and the central nervous system. Over the last years, studies are focusing on neutrophils actions against *P. brasiliensis*, due the capacity of these cells to develop different defense strategies against pathogens. The novel spectacular action mechanism of these cells was described as NETosis, an extracellular mechanism to kill microbes characterized by the neutrophil release of both granular and nuclear material, identified as Neutrophil Extracellular Traps (NETs). As *P. brasiliensis* yeasts present multi-budded and different size forms, we seek to identify whether this process would be an important mechanism triggered against the fungus. Therefore, we show for the first time the identification of NETs in tegumentary lesions of patients with PCM, by viewing the individual components of NETs by Confocal Laser Scanning Microscopy. Beyond that, we demonstrated the entrapment of *P. brasiliensis in vitro* by these structures released from human neutrophils of patients with PCM and healthy donors by Confocal Laser Scanning Microscopy and Scanning Electron Microscopy. Although it is still limited knowledge, our data provide

important new information regarding the immunity against the fungus, opening new avenues for the researches on immunity of PCM.

INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis considered an important cause of mortality and morbidity in most Latin American countries, especially in Brazil. It is caused by fungus of the genus *Paracoccidioides* (*P. brasiliensis* and *P. lutzii*) [1,2]. They share the same thermo-dimorphic features, developing as mycelium at room temperature and as yeast at body temperature [3,4]. *P. brasiliensis* infection occurs after propagules inhalation (conidia presented in water, soil and plants) [5,6], which are deposited in the lungs and transformed into yeast cells, establishing the disease. From this stage on, infection could become latent (PCM – infection), disseminate by lympho-haematogenic pathway to other organs, such as liver and spleen (PCM – disease), or heal spontaneously [7].

Innate immune response is essential during early stages of fungal infections. Phagocytic cells, such as neutrophils and macrophages, play crucial role in host defense, modulating the inflammatory response and fungicidal activity [8-11]. In this context, studies have focused on the role of neutrophils during PCM, since a massive infiltration of these cells is found in granulomas of the disease, after chemoattraction modulated by keratinocyte chemoattractant (KC) and macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 α) [5,12].

Neutrophils are short-lived cells that must be promptly recruited to the site of infection [13]. They can capture and kill microbes by oxygen dependent or independent mechanisms, by the action of NADPH enzyme or release of their granular components [14]. Reactive oxygen species (ROS), obtained by the action of NADPH enzyme are essential for the killing of fungi [9,10,16,15-18]. Previous studies demonstrated that non-activated neutrophils do not have fungicidal activity, just showing fungistatic activity against *P. brasiliensis* [19], with an increase in these functions after activation with cytokines like

interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), granulocyte monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-15 (IL -15) [19-22]. The studies also showed that the effector mechanisms of activated neutrophils against fungi involve superoxide anions and H₂O₂ participation.

Recently, a novel neutrophil mechanism of action has been described as NETosis, which is an extracellular mechanism to kill microbes characterized by the neutrophil release of both granular and nuclear material and identified as Neutrophil Extracellular Traps (NETs) [23]. These structures are composed by a decondensed DNA backbone associated with histones and others antimicrobial proteins such as elastase, permeability increasing protein (BPI) and myeloperoxidase [24,25]. NETs can be triggered by gram-positive and gram-negative bacteria, fungi and viruses, some particles like interleukin-8 (IL-8), Phorbol Myristate Acetate (PMA), lipopolysaccharide (LPS) and others cells as activated platelets [23,26-30].

Several microorganisms are able to induce NET formation. In some of them, NETs have antimicrobial activities, in others meanwhile, these structures have only temporary entrapment action, avoiding dissemination [23,27,29-33].

Therefore, the aims of this study were to identify the presence of NETs *in vivo*, analyzing tegumentary lesions of patients with Paracoccidioidomycosis, and *in vitro*, challenging human neutrophils with *P. brasiliensis* yeast cells.

MATERIALS AND METHODS

- Casuistics

A prospective study was conducted to analyze tegumentary lesions of seven male patients between 51 and 75 years old, attended at clinical dermatology of Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), *UNESP - Universidade Estadual Paulista*. All patients had the chronic form of PCM with lesions localized at head, nose, hand, knee, foot and back. The diagnosis was confirmed by histopathological analysis performed by the Pathology Service/FMB. Patients were selected before treatment, excluding the immunocompromised ones and the patients with secondary infections.

Neutrophils from peripheral blood of Paracoccidioidomycosis patients and healthy donors from FMB were also evaluated. Neutrophils from peripheral blood of patients with the chronic form of PCM and of five healthy donors between 20 and 30 years old were used in this study.

- Ethics Statement

This study was approved by the Research Ethics Committee of Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Universidade Estadual Paulista and informed consent was obtained from all participants (261/11 – CEP).

- Isolation, purification and culture of human peripheral blood neutrophils

Peripheral blood from patients and healthy donors was collected by venous puncture and neutrophils were separated by a density gradient centrifugation (Histopaque 1119 and 1083g/mL - Sigma–Aldrich, St. Louis, USA) at 460 g for 30 minutes followed by erythrocytes lysis with a hypotonic solution (NaCl 0,2%). Cellular viability was assessed by trypan blue dye exclusion test, and purified neutrophils ($\geq 95\%$ of the cells) were then resuspended in complete medium (RPMI medium 1640 supplemented with 10% inactivated fetal calf serum, both from Sigma–Aldrich) and placed on ice until use. Cell culture was adjusted for 2×10^6 cells/mL before all procedures.

- Fungi

Two different strains of *P. brasiliensis* were used throughout this study: *P. brasiliensis* strain 18 (Pb18, virulent one) and strain 265 (Pb265, avirulent one). The strains were submitted to weekly sub-cultivation on 2% glucose, 1% peptone, 0.5% yeast extract and 2% agar medium (GPY medium)(all reagents from DIFCO, Franklin Lakes, NJ, USA), and used on the sixth day of culture. For preparation of *P. brasiliensis* suspension, yeast cells were removed from the cultivation medium, transferred to a sterile test tube containing glass beads and homogenized in a Vortex homogenizer (two cycles of ten seconds). Yeast viability was determined by phase contrast microscopy and bright yeast cells were counted as viable while dark ones were considered as non-viable. Fungal suspensions containing more than 95% viable cells were used in the experiments. The yeast suspension was adjusted for 4×10^4 cells/mL before use.

- Histopathological Analysis

Tissue sections from biopsies of tegumentary lesions from seven Paracoccidioidomycosis patients were fixed with buffered formalin, dehydrated in 70% alcohol and embedded in paraffin. Samples (7µm thick) were deparaffinized and stained with hematoxylin and eosin (H & E) in the attempt to identify the extracellular DNA, representative of NETs [34].

- NETs analysis by Confocal Laser Scanning Microscopy

The same biopsies were analyzed by confocal laser scanning microscopy. Tissue sections (7µm thick) were deparaffinized in two baths of 100% xylene and three baths of ethanol decreasing concentrations (100%, 90% and 70%). Samples were washed for 5 minutes in dH₂O followed by nonspecific binding block for 30 minutes. Tissues were incubated with anti-elastase (Calbiochem - Merck Millipore - Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and anti-histone 1 (Millipore - Merck Millipore - Merck KGaA, Darmstadt, Germany) antibodies, followed by anti-rabbit-FITC (Millipore) and anti-mouse-Texas red (Calbiochem) antibodies, respectively. Slides were mounted using mounting medium for fluorescence with DAPI (Vectashield-Vector Labs, Burlingame, CA, USA).

Neutrophil cultures were analyzed by Confocal Laser Scanning Microscopy to identify the presence of NETs *in vitro*. Isolated neutrophils (2x10⁶ cells/mL) were adhered on coverslips treated with 0, 01% polylysine (Sigma-Aldrich) and, after adherence, some cocultures were pretreated with DNase – negative control (100U/mL – Fermentas Life Science) and/or PMA – positive control (100ng/mL - Sigma-Aldrich). Cultures were then

challenged with Pb18 and Pb 265 (4×10^4 cells/mL - 50:1 cells/fungi ratio), and incubated for two hours in 5% CO₂ at 37°C. After this time, coverslips were stained with anti-elastase (Calbiochem) and anti-histone 1 (Millipore) antibodies, followed by anti-rabbit-FITC (Millipore) and anti-mouse-Texas red (Calbiochem) antibodies, respectively. Slides were mounted using mounting medium for fluorescence with DAPI (Vectashield-Vector Labs).

Confocal images were taken in a Leica TCS SP5 microscope from the CME (Centro de Microscopia Eletrônica - Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu).

- NETs analysis by Scanning Electron Microscopy

Isolated neutrophils (2×10^6 cells/mL) from Paracoccidioidomycosis patients and healthy donors were adhered on coverslips treated with Poly-L-Lysine 0, 01% (Sigma-Aldrich) in 24-well flat-bottom plates (Nunc Life Tech., Inc., MD, USA). In some cocultures, after adherence, cells were pretreated with DNase (100U/mL – Fermentas Life Science– St. Leon-Rot, Germany) for 30 minutes and/or PMA (100ng/mL- Sigma–Aldrich) as a negative and positive control respectively, challenged with Pb18 and Pb 265 (4×10^4 cells/mL), using 50:1 cells/fungi ratio, and incubated for one or two hours in 5% CO₂ at 37°C. Cultures were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, postfixed with 1% osmium tetroxide, and dehydrated with an ascending ethanol series. After dehydration and critical-point drying, samples were coated with gold and analyzed in a FEI QUANTA 200 scanning electron microscope from the CME (Centro de Microscopia Eletrônica - Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu).

- Quantification of NETs release

Neutrophils (2×10^6 cells/mL) from five healthy donors were incubated with or without Pb 18 and Pb 265 for two hours. In some assays, cultures were pretreated with DNase – negative control (100U/mL – Fermentas Life Science) and/or PMA – positive control (100ng/mL - Sigma–Aldrich) and then challenged with Pb 18 and Pb 265. After incubation, supernatants were collected and treated with restriction enzymes (EcoR1 and HindIII, 15U/uL each; Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), according to the manufacturer's instructions. After, extracellular DNA amounts (NETs) were quantified using the Picogreen dsDNA kit (Invitrogen). The λ -DNA standard provided with the kit (100 μ g/mL) was diluted with Tris-EDTA (TE buffer) to the concentration of 1ng/mL for the high range curve and received the same treatment with restriction enzymes. Plates were incubated at room temperature in the dark for 5 minutes prior reading on a SpectraMax M2[®] (Molecular Devices) using an excitation wavelength of 480 nm and emission wavelength of 520 nm.

- Statistical Analysis

Quantification of extracellular DNA was analyzed using GraphPad Prism 5.01 Software (Graphpad Software Inc., CA, USA). Results were compared by Friedman's test followed by post-hoc Dunn's test with the level of significance set at $p < 0.05$.

RESULTS

- NETs identification by Histopathological analysis

In attempt to identify extracellular structures suggestive of NETs, histopathological analysis of tissue lesions of patients with Paracoccidioidomycosis was performed. In figures 1A and 1B, the images revealed basophilic material with characteristic extracellular filaments, indicating extracellular DNA (positive for hematoxylin), suggestive of the formation of NETs.

- Individual components of NETs visualization by Confocal Laser Scanning Microscopy

After identification of the extracellular material suggestive of NETs by histopathological analysis, we seek to identify the individual components of NETs in biopsies from tegumentary lesions of patients with Paracoccidioidomycosis (Figure 2). As expected, NETs were also visualized in these samples, and their constituents were evaluated individually. Decondensed DNA, the backbone of these structures, was identified after DAPI staining (Fig. 2A). Histones and elastase, other major NETs components, were identified combined with DNA after immunostaining with anti-histone and anti-elastase, primary antibodies, followed by Texas Red and FITC, secondary conjugated antibodies, as performed to evaluate the cultures *in vitro* (Figs. 2B and 2C). Interestingly, figure 2D is the overlay of these three images, confirming the co-existence of the three major components.

We also identified during the analysis in one of the sections (Fig. 3), two cells that appear to be early in the process of forming Nets. In the box (highlighted), we identified a nucleus labeled with DAPI (Fig. 3A), which had lost its normal format and had positive staining for elastase (Fig. 3B), demonstrating the colocalization of elastase with nuclear DNA. Elastase is transported to the nucleus, acting on histones to initiate the chromatin decondensation, even before it is released into the cytoplasm [37]. At the center of the field, we can observe a cell that appears to be releasing their decondensed DNA content (labeled with DAPI) (Fig. 3A), already bound to elastase (Fig. 3B), and the histone in nuclear region (Fig. 3C), indicating the mobilization of these compounds in the formation of NETs. In (Fig. 3D) the overlap of 3 images was observed. These images are very interesting as they have been identified in lesions of patients showing an active response of human neutrophils through NETs formation against *P. brasiliensis in vivo* for the first time.

In addition, it was also identified *in vitro*, the individual components of NETs in neutrophil cultures challenged with the fungus. In Figure 4, we can observe the individual marking of each component of NETs in neutrophil cultures challenged with Pb 18 *in vitro*, demonstrating the formation of NETs covering yeast. In this figure, we can identify in intense blue, a cell nuclei labeled with DAPI. At the tip of the white arrow, a neutrophil that shows a lobed nucleus intact is evidenced as well as, in left field, a cell already filled with nuclear material, stained with DAPI, which is more evident and NETs being released (highlighted area). In all the field spherical shaded areas (marked with star) are evidenced, which probably represent the location of the yeasts and were not labeled with fluorochromes. We note that these shaded areas are surrounded by NETs, evidenced by DAPI staining that indicate extracellular DNA, elastase is demonstrated by the staining in green and the red

marks represent histone, which is more discreet. Therefore, these areas would be the location of the yeasts that were covered by NETs. The figure shows the overlapping of the images (overlay).

- **NETs identification by Scanning Electron Microscopy**

To visualize NETs *in vitro* by scanning electron microscopy, neutrophils cultures from patients and healthy donors were challenged with two strains of *P. brasiliensis*: Pb 18 (high virulence strain) and Pb 265 (low virulence strain).

Non-treated neutrophils from healthy donors were not able to release NETs, but in the presence of PMA, these structures were formed and visible after 45 minutes of incubation (Fig. 5A).

Analyzing fungi-neutrophils interaction, Pb18 was able to trigger NET formation by healthy donors neutrophils in one and two hours of incubation (Figs.5B and 5C). Cultures with DNase-1 treatment have not shown any evidence of NETs structures confirming their nuclear composition (Fig. 5D). We also observed that patient's neutrophils when challenged with both strains of *P. brasiliensis* (Pb18 and Pb265) released NETs in attempt to entrap the fungi, demonstrating the process of NETosis that occurs during infection with *P. brasiliensis* (Figs. 6A and 6B).

- Quantification of NET release

To identify if different strains of *Pb* could induce different amounts of NETs formation and release, neutrophils from healthy donors were incubated for two hours with both strains of *P. brasiliensis* (Pb 18 and Pb 265) and the extracellular DNA were quantified with the Picogreen dsDNA kit (Invitrogen). Corroborating data shown in scanning electron microscopy, both Pb18 and Pb265 were able to induce release of these NETs in the extracellular environment. However, there was no statistical difference between the two strains of *P. brasiliensis*. Non-treated neutrophils released low levels of DNA (45 ng/mL) when compared to cultures treated with PMA (87 ng/mL), Pb 18 (95 ng/mL) and Pb 265 (126 ng/mL) ($p=0.0167$) (Fig. 7). DNase treated cultures showed low levels of free DNA, confirming the action of this enzyme over the released material (data not shown).

DISCUSSION

NETs action has been widely studied over the recent years. Several microorganisms are able to induce formation and release of these structures and in some cases, as in infections caused by *S. aureus*, *S. flexneri*, *S. pneumoniae*, *L. amazonensis*, *A. fumigatus*, *C. albicans*, *A. nidulans* and *P. brasiliensis*, these NETs have antimicrobial activities [23,27,30,33-35,37-39]. However, some pathogens have evasion mechanisms that make the entrapment only temporary, enabling the recruitment of other immune cells for the site or inhibiting the microorganisms' growth, as seen in infections with *S. pneumoniae* and *L. infantum* [29,31-33,37,40].

The interaction between NETs and *P. brasiliensis* is still been elucidated. In this study, we demonstrated for the first time NETs formation *in vivo* induced by *P. brasiliensis* yeast cells in tegumentary lesions of patients. Our results *in vitro* showed that yeasts are trapped by NETs, corroborating our previous study, in which were evidenced that *P. brasiliensis* yeast cells are able to induce NET formation by neutrophils and that these structures are involved in extracellular killing of the fungus. This process of NET release is mediated mainly by dectin-1 receptor, an important pattern recognition receptor (PRR) [35].

This study identified NETs components, such as histone and elastase, in both analyzes, in patient's tegumentary lesion and in neutrophil cultures, by confocal laser scanning microscopy. Furthermore, it was identified in some tissue sections, cells in the initial process of NETs formation, demonstrating the colocalization of nuclear DNA with elastase, which was transported to the nucleus and acts on histones to initiate the chromatin decondensation, even before it is released into the cytoplasm. Papayannopoulos *et al.* [36] showed that elastase is necessary for chromatin decondensation through degradation of histones, allowing NETs release for the extracellular environment. Interestingly, the decondensed nuclear material labeled with DAPI that appears to be released by cells in some images, still have certain conserved nuclear structure. This is consistent with what has been recently proposed by some authors, that NETs can be formed by viable neutrophils and that cell death can occur subsequently, once cell death is not a requirement for the formation of such structures [25,41-43].

Histopathological analysis was performed using HE staining and was included in this study in an attempt to identify structures that could indicate the presence of NETs, characterized by basophilic material with extracellular filaments, indicating extracellular DNA positive for hematoxylin. Urban *et al.* [34] also identified the presence of NETs in

histopathological analysis of mice challenged with *C. albicans*, evidencing the presence of extracellular DNA positive for hematoxylin, as seen in this study, corroborating once more our findings on the lesion analysis by confocal laser scanning microscopy. In this manner, the presence of NETs in tegumentary lesions strengthens the results obtained *in vitro*, proving that there is a release of these NETs against the fungus after neutrophils recruitment *in vivo*.

Scanning electron microscopy images showed similar structures as those first identified by Brinkmann *et al.* [23] and others [27,29,38]. In our images, the interaction between neutrophils and *P. brasiliensis* yeast cells from different strains was evidenced, with consequent release of NET like material, suggesting a role of NETs during Paracoccidioidomycosis. These structures were similar to those seen in other microbe-NETs interaction like *M. tuberculosis*, *L. amazonensis* and *P. brasiliensis* own [27,29,35] and to images presented in previous studies with other fungi as *C. albicans*, *A. fumigatus*, *A. nidulans* and *C. gattii* [27,33,34,38,39,44].

Our idea that different strains of Pb could induce different amounts of NETs, was not confirmed, since the quantification of extracellular DNA in cocultures challenged with Pb18 and Pb265 or activated with PMA did not differ between them, although the levels observed for Pb265 were slightly larger. This hypothesis was raised once the two strains used in the study have differences in the amount of β -glucans present in their walls [45], and it was detected that the dectin-1 receptor, an important PRRs that recognizes β -glucans, would be involved with the formation of NETs[35].

Although NETs have two important effector functions against microorganisms whether is only temporary imprisonment of the pathogen to prevent its spread or having a direct antimicrobial action on trapped microorganisms, studies have related NETs with several diseases, correlating them with pathological effects. Some reports show that antimicrobial

histones and peptides coating the NET-DNA have direct cytotoxic effect to tissue, and ineffective clearance of NETs is responsible for deleterious inflammation of host tissue in several disorders [46-55]. In acute respiratory distress syndrome (ARDS), there is a massive influx of neutrophils into the lungs causing neutrophilic inflammation and in acute lung injury (ALI), there is an excessive activation and migration of neutrophils into the lung. These cells are important contributors to the progression of ALI/ARDS, and higher neutrophil concentration in the BAL fluid of patients with ARDS is often associated with greater severity of the disease [55,56], while excessive neutrophils and NETs contribute to the pathology of ALI, where NETs can directly induce lung epithelial cell death[53].

Therefore, in Paracoccidioidomycosis, in which the lung is usually the first organ affected, characterized by the development of granulomatous lesions with the presence of neutrophils, the real participation of NETs in defense against *P. brasiliensis* or in disease pathogenesis needs to be further elucidated.

In conclusion, our data show the identification of NETs induced by *P. brasiliensis in vivo*, in tegumentary lesion of patients. Beyond that, both strains of *P. brasiliensis* (Pb 18 and Pb 265) are able to induce NETs formation and release by human neutrophils *in vitro*. The presence of NETs components both *in vitro* and *in vivo* open new possibilities for the detailed investigation of pulmonary immunity in Paracoccidioidomycosis.

References

1. Matute, DR, McEwen, JG, Puccia, R, Montes BA, San-Blas G, et al. (2006) Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* 23:65–73.
2. Teixeira, MM, Theodoro, RC, Carvalho, MJ, Fernandes L, Paes HC, et al. (2009) Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol* 52:273–283.
3. Restrepo, A and Tobón, AM. (2005) *Paracoccidioides brasiliensis* In: Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier 3062-3068.
4. Marques SA. (2013) Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. *An Bras Dermatol* 88:700-711.
5. Franco M. (1987) Host–parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 25:5–18.
6. Neto BRS, Carvalho PFZ, Bailão AM, Martins WS, Soares CMA, et al. (2014) Transcriptional profile of *Paracoccidioides* spp. In response to itraconazole. *BMC Genomics* 15:254.
7. Franco M, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Montenegro R, Mendes RP, et al. (1993) Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol* 5:115-149.
8. do Nascimento MP, de Campos Soares AM, Dias-Melicio LA, Parise-Fortes MR, Martins RA, et al. (2008) Fungicidal activity of human monocyte-derived multinucleated giant cells induced in vitro by *Paracoccidioides brasiliensis* antigen. *Mycopathologia* 166:25-33.

9. Moreira AP, Dias-Melicio LA, Soares AMVC. (2010) Interleukin-10 but not Transforming Growth Factor beta inhibits murine activated macrophages *Paracoccidioides brasiliensis* killing: effect on H₂O₂ and NO production. *Cell Immunol* 263:196–203.
10. Bordon-Graciani Ap, Dias-Melicio LA, Acorci-Valerio MJ, Araujo JP Jr, de Campos Soares AM. (2012) Inhibitory effect of PGE 2 on the killing of *Paracoccidioides brasiliensis* by human monocytes can be reversed by cellular activation with cytokines. *Med Mycol* 50:726–734.
11. Nicola AM, Casadevall A, Goldman DL. (2008) Fungal killing by mammalian phagocytic cells. *Curr Opin Microbiol* 11:313-317.
12. Souto JT, Aliberti JC, Campanelli AP, Livonesi MC, Maffei CM, et al. (2003) Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis* infect mice is modulated by interferon-gamma. *Am J Pathol* 163:583-590.
13. Segal AW. (2005) How Neutrophils Kill Microbes. *Annu Rev Immunol* 23:197–223.
14. Lehrer RI, Ganz T (1999) Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol* 11:23–27.
15. Moreira AP, Dias-Melicio LA, Peraçoli, MT, Calvi SA, Victoriano de Campos Soares AM.(2008) Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN-gamma and TNF-alpha activated murine peritoneal macrophages: evidence of H₂O₂ and NO effector mechanisms. *Mycopathologia* 166:17-23.
16. Carmo JP, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MT, Soares AM. (2006) TNF-alpha activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. *Med Mycol* 44:363-368.

17. Costa DL, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Bordon AP, Tavian EG, et al. (2007) Effect of interleukin-10 on the *Paracoccidioides brasiliensis* by gamma-interferon activated human neutrophils. *Microbiol Immunol* 73-80.
18. Bannwart CF, Martins RA, Nakaira-Takahashi E, Dias-Melicio LA, Soares AM, et al. (2010) Interleukin-15 augments oxidative metabolism and fungicidal activity of human monocytes against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105:866-872.
19. Kurita N, Oarada M, Ito E, Miyaji M. (1999) Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* 37:261-267.
20. Kurita N, Oarada M, Miyaji M, Ito E. (2000) Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* 38:177-182.
21. Rodrigues DR, Dias-Melicio LA, Calvi AS, Peraçoli MT, Soares AM. (2007) *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med Mycol* 45:27-33.
22. Tavian EG, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Graciani AP, Peraçoli MT et al. (2008) Interleukin-15 increases *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human neutrophils. *Cytokine* 41:48-53.
23. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, et al. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532–1535.
24. von Köckritz-Blickwede M, Nizet V. (2009) Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. *J Mol Med* 87:775–783.

25. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, et al. (2008) Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med* 14:949–953.
26. Martinelli S, Urosevic M, Daryadel A, Oberholzer PA, Baumann C, et al. (2004) Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation. *J Biol Chem* 279:44123-44132.
27. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. (2006) Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* 8:668-676.
28. Grinberg N, Elazar S, Rosenshine I, Shpigel NY. (2008) Beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 76:2802-2807.
29. Ramos-Kichik V, Mondragon-Flores R, Mondragon-Castelan M, Gonzalez-Pozos S, Muñiz-Hernandez S, et al. (2009) Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 89:29–37.
30. Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, et al. (2009) *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:6748-6753.
31. Menegazzi R, Decleva E, Dri P. (2012) Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? *Blood* 119:1214-1216.
32. Malachowa N, Kobayashi SD, Freedman B, Doward DW, DeLeo FR. (2013) *Staphylococcus aureus* Leukotoxin GH promotes formation of Neutrophil Extracellular Traps. *J Immunol* 191:6022-6029.

33. McCormick A, Heesemann L, Wagener J, Marcos V, Hartl D, et al. (2010) NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect* 12:928-936.
34. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, et al. (2009) Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 5:e1000639.
35. Bachiega TF, Fernandes, RK, Rodrigues, DR, Balderramas HA, Dias-Melicio LA, et al. (2013) *Paracoccidioides brasiliensis* induces neutrophil extracellular traps in vitro. *Front Immunol* doi:10.3389
36. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. (2010) Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 191:677-691.
37. Wartha F, Beiter K, Albiger B, Fernebro J, Zychlinsky A, et al. (2007) Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protects *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol* 9:1162-1171.
38. Bruns S, Kniemeyer O, Hasenberg M, Amanianda V, Nietzsche S, et al. (2010) 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
39. Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, et al. (2009) Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* 114:2619–2622.
40. Guimarães-Costa AB, De Souza-Vieira TS, Paletta-Silva R, Freitas-Mesquita AL, Meyer-Fernandes JR. (2014) 3'-nucleotidase/nuclease activity allows *Leishmania* parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps. *Infect Immun* 82:1732-1740.

41. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, et al. (2007) Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 13:463-469.
42. Pilsczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, et al. (2010) A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 185:7413-7425.
43. Simon D, Simon HU, Yousefi S. (2013) Extracellular DNA traps in allergic, infectious, and autoimmune diseases. *Allergy* 68:409-416.
44. Springer DJ, Chaturvedi V. (2010) Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. *Emerg Infect Dis* 16:14–20.
45. Figueiredo F, Alves LM, Silva CL. (1993) Tumour necrosis factor production in vivo and in vitro in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. *Clin Exp Immunol* 93:189-194.
46. Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, et al. (2009) Extracellular histones are major mediators of cell death in sepsis. *Nat Med* 15:1318-1321.
47. Döring Y, Manthey HD, Drechsler M, Lievens D, Megens RT, et al. (2012) Auto-antigenic protein-DNA complexes stimulate plasmacytoid dendritic cells to promote atherosclerosis. *Circulation* 125:1673-1683.
48. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemmarck U, Back W, Gross WL, et al. (2009) Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 15:623-625.
49. Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, et al. (2010) Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:9813-9818.

50. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, et al. (2011) Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 3:73ra19.
51. Leffler J, Martin M, Gullstrand B, Tydén H, Lood C, et al. (2012) Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol* 188:3522-3531.
52. Liu CL, Tangsombatvisit S, Rosenberg JM, Mandelbaum G, Gillespie EC, et al. (2012) Specific post-translational histone modifications of neutrophil extracellular traps as immunogens and potential targets of lupus autoantibodies. *Arthritis Res Ther* 14:R25.
53. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, et al. (2012) Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One* 7:e32366.
54. Rohrbach AS, Hemmers S, Arandjelovic S, Corr M, Mowen KA. (2012) PAD4 is not essential for disease in the K/BxN murine autoantibody-mediated model of arthritis. *Arthritis Res Ther* 14:R104.
55. Cheng OZ, Palaniyar N. (2013) NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases. *Front Immunol*.4:1.
56. Grommes J, Soehnlein O. (2011) Contributions of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med* 17:293-307.

Figures

Fig.1A

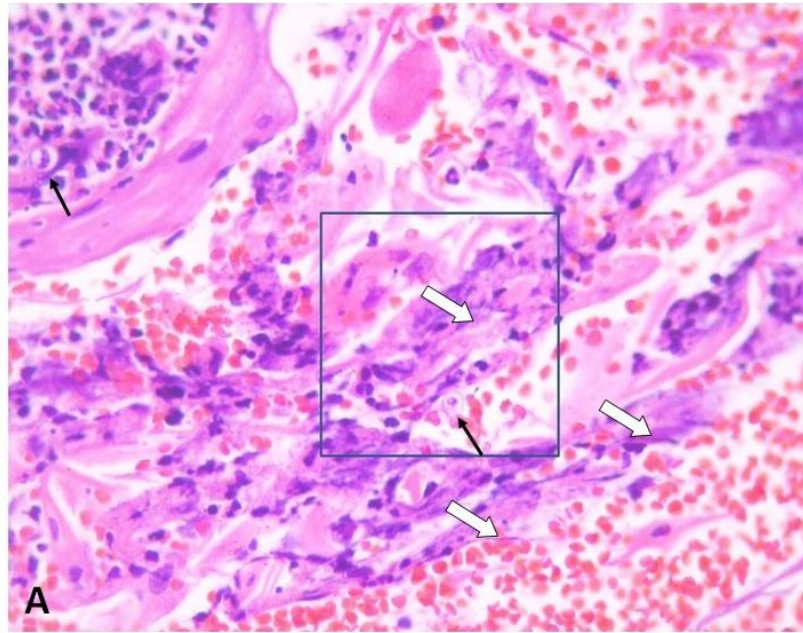


Fig.1B

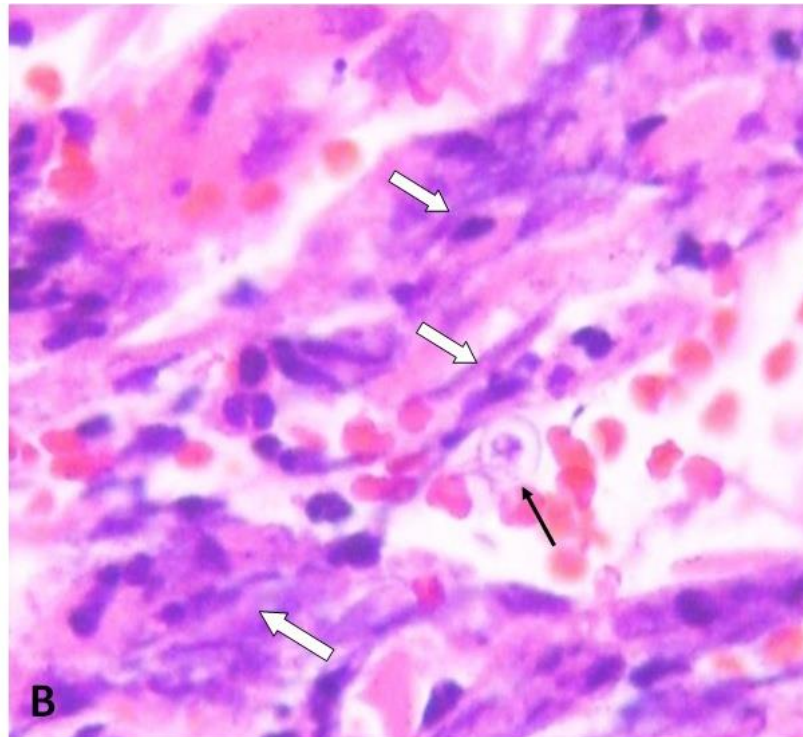


Figure 1: Histopathology of cutaneous lesions of patients with PCM showing Hematoxylin filamentous suggestive of NETs (demarcated area and white arrows) and presence of fungi (black arrows) 200x. (B) Details of the demarcated area showing hematoxylin filamentous suggestive of NETs (white arrows) and Pb yeast (black arrow).

Fig. 2

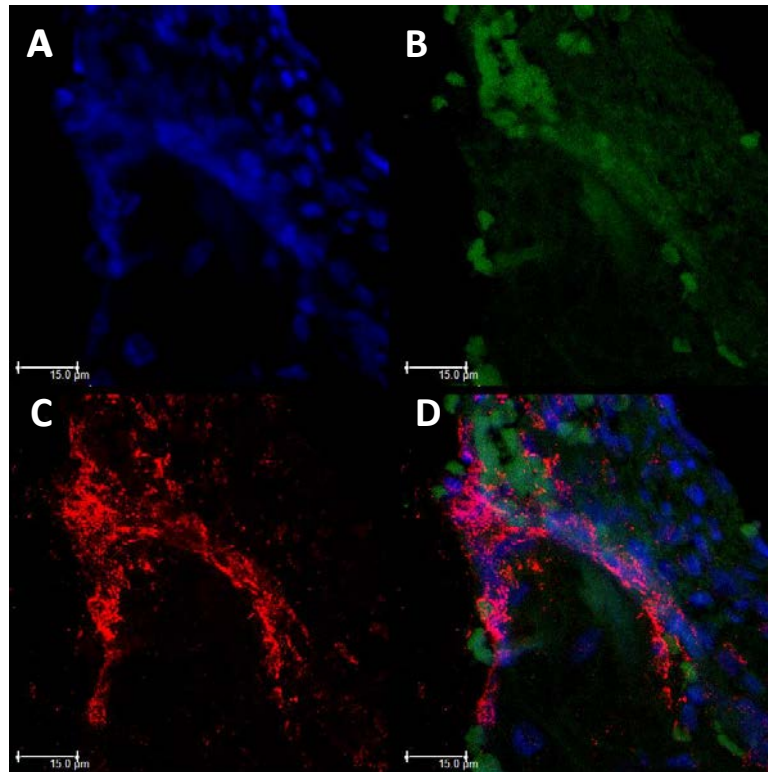
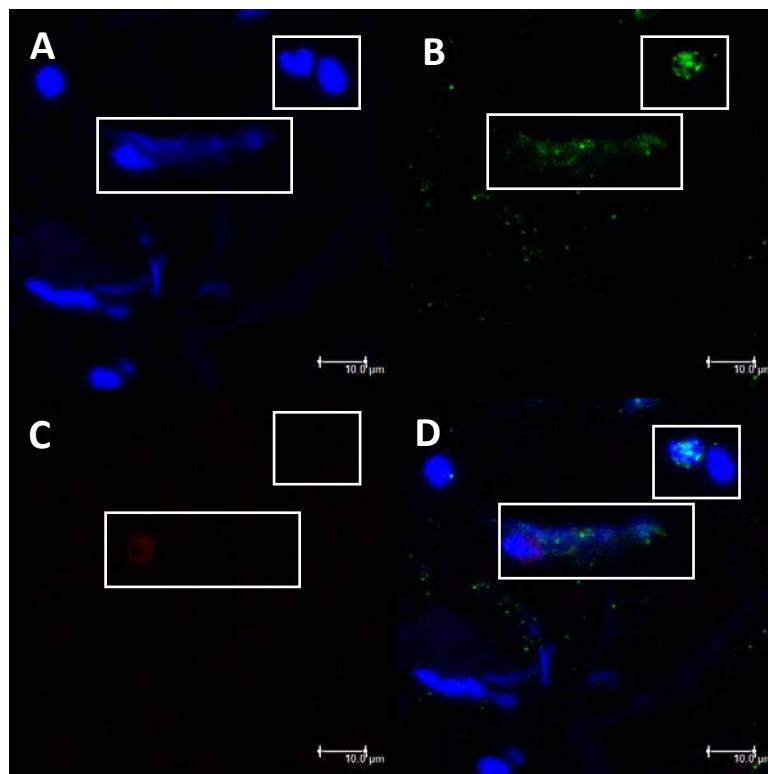


Fig. 3



Figures 2 and 3: Confocal immunofluorescence of NETs identified in lesions of patients with Paracoccidioidomycosis. Tissue was stained with DAPI (A), labeled with anti-elastase antibody followed by FITC-conjugated secondary antibody (B) and anti-histone secondary antibody followed by Texas Red (C). In the last frame, the overlapping images (D).

Fig. 4

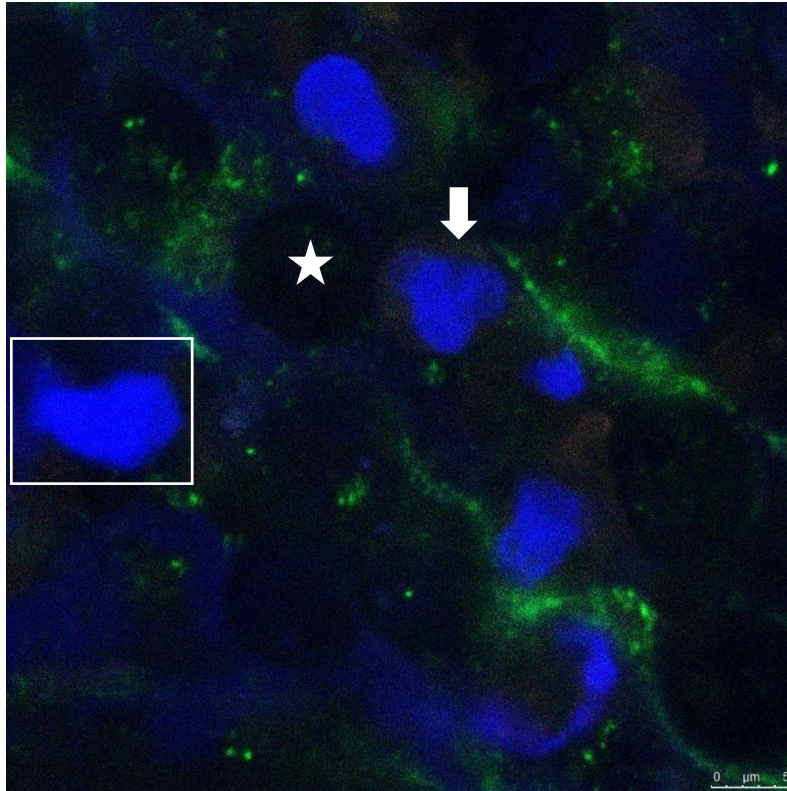
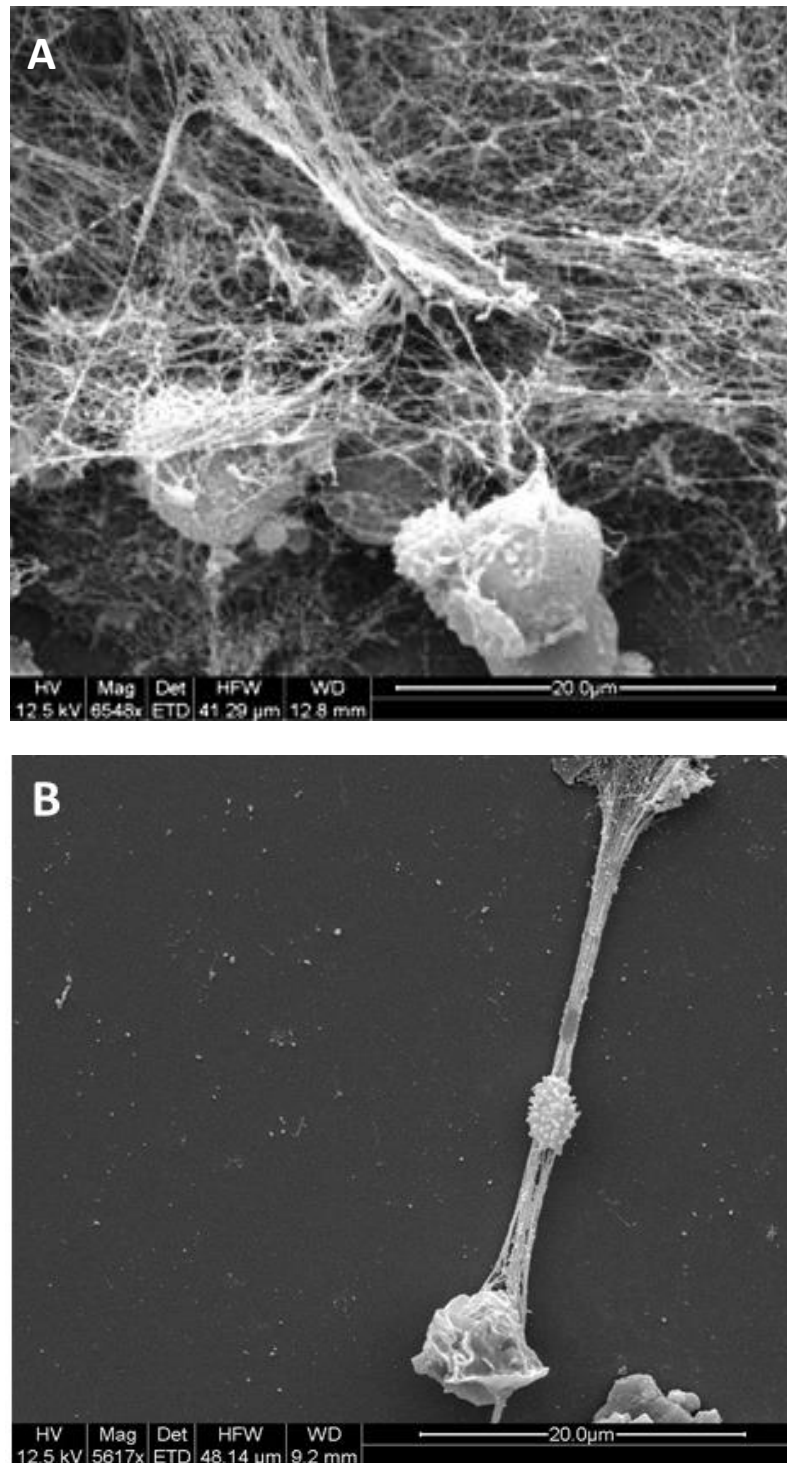


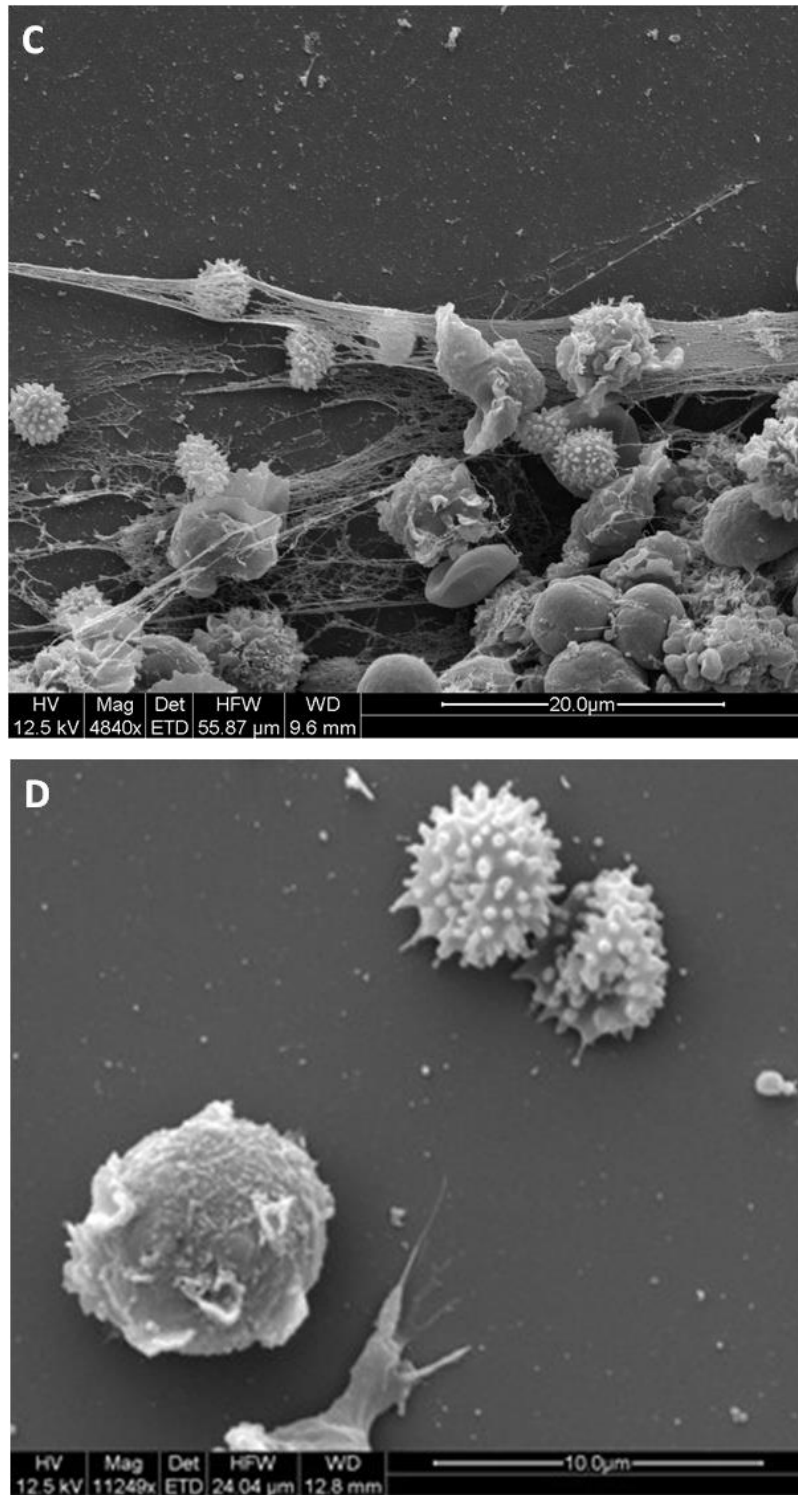
Figure 4: Confocal Microscopy from NETs induced by PMN incubation with *P. brasiliensis* for two hours (50:1 ratio). Cells were stained with DAPI (blue), anti-elastase ab (FITC-green) and anti-histone ab (Texas Red-red). The image represents the overlay of the three stains.

Fig. 5



Figures 5: Scanning electron microscopy from neutrophils challenged with *P. brasiliensis* (50:1 ratio) in different periods of incubation showing NETs release. (A) PMNs activated with PMA (100ng/mL). (B) PMNs challenged with Pb 18 for one hour.

Fig. 5



Figures 5: Scanning electron microscopy from neutrophils challenged with *P. brasiliensis* (50:1 ratio) in different periods of incubation showing NETs release. (C) PMNs challenged with Pb 18 for two hours. (D) PMNs challenged with Pb 18 and treated with DNase (100U/mL).

Fig. 6A

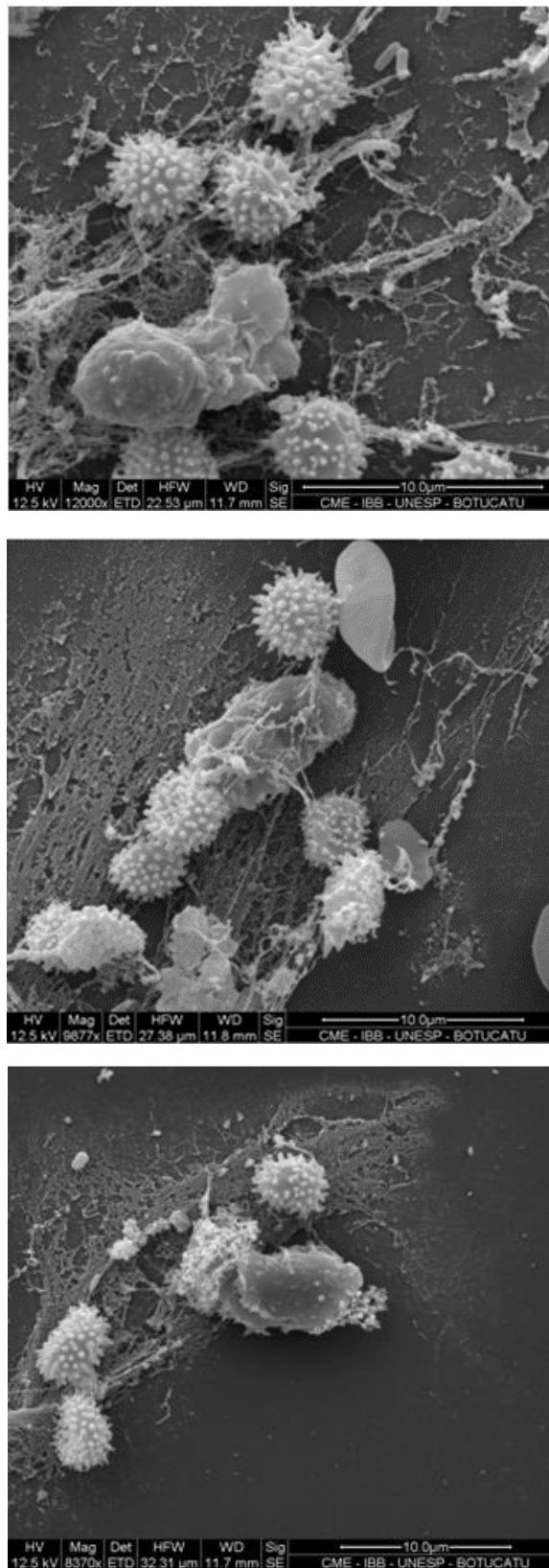


Figure 6A: Scanning electron microscopy from patients' neutrophils challenged with Pb 18 (50:1 ratio)

Fig. 6B

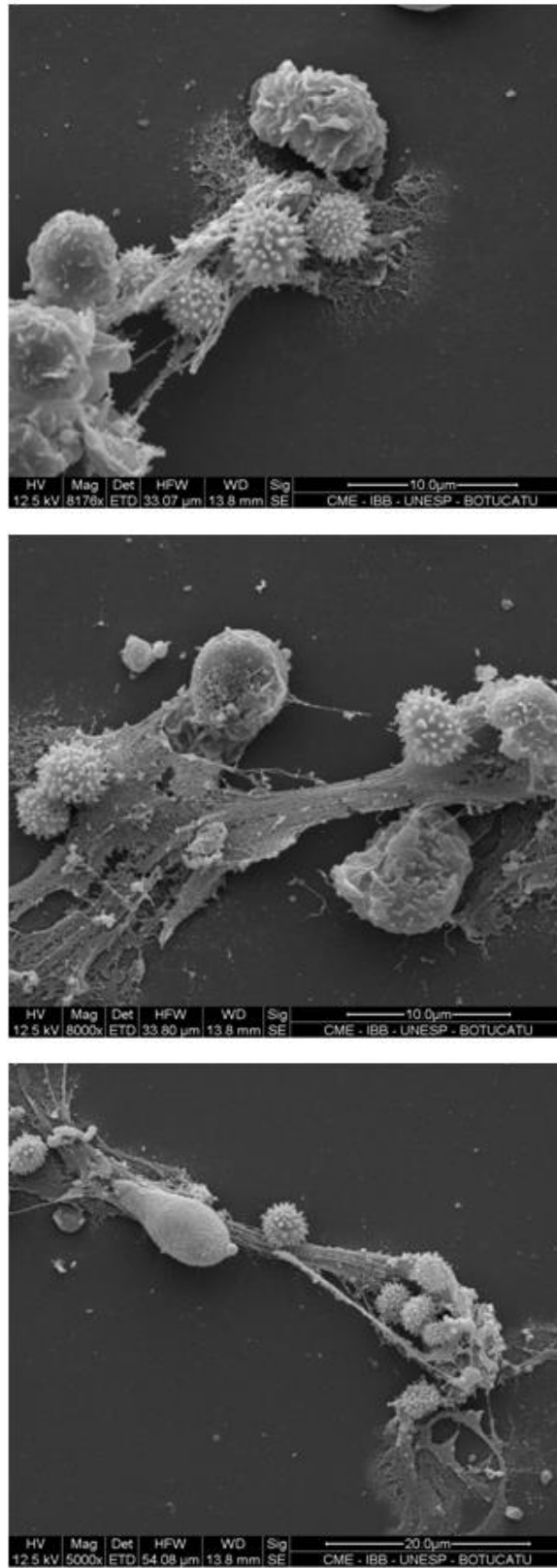


Figure 6B: Scanning electron microscopy from patients' neutrophils challenged with *Pb 265* (50:1 ratio).

Fig. 7

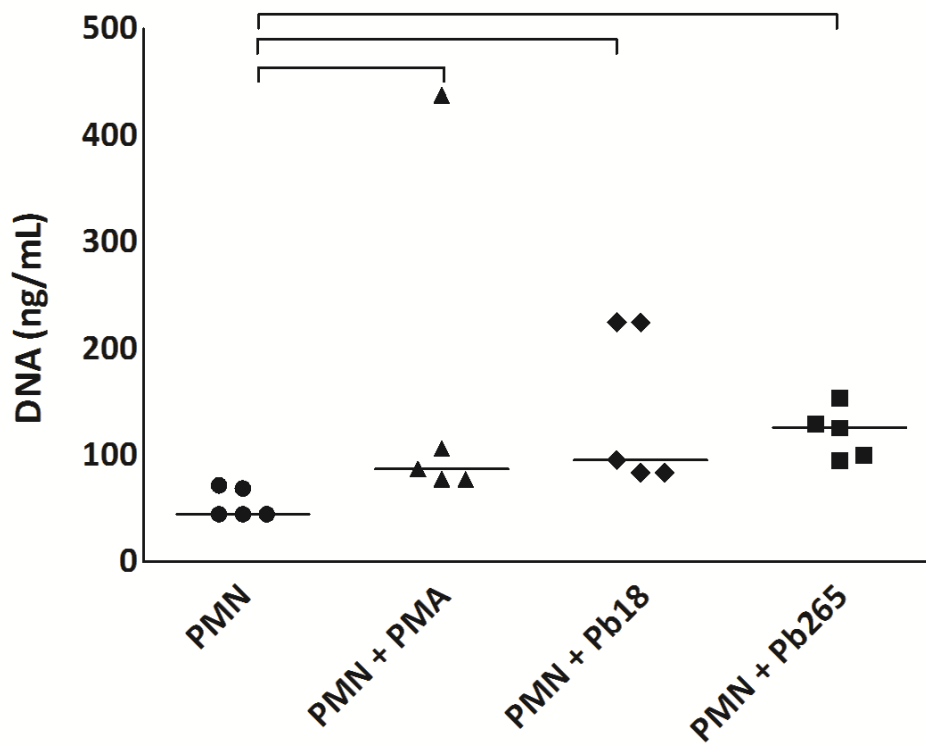


Figure 7: Quantification of NETs in vitro. Cells were stimulated with PMA and challenged with Pb 18 and Pb 265. Supernatants were collected, and DNA were quantified by Picogreen dsDNA kit (p=0.0167).

Anexos



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

Pacientes

Eu, _____, RG n° _____, declaro que fui informado e esclarecido sobre o projeto de pesquisa "**Identificação de NETs (neutrophil extracellular traps) em lesões tegumentares de pacientes com paracoccidiodomicose**".

Fui informado que o referido projeto tem por finalidade esclarecer detalhes envolvidos quando da interação das minhas células de defesa com o fungo causador da minha doença, avaliando o papel de algumas substâncias que podem estimular as células humanas para a destruição do fungo. Fui informado que no caso da biópsia, que poderei ser submetido é de rotina quando ocorre o aparecimento de lesão. Fui informado também, que junto com a coleta de sangue para os exames, será retirado um pouco de sangue que **deverá ser colocado em tubo estéril e heparinizado e enviado ao laboratório da disciplina de Patologia, onde será desenvolvido tal estudo**. Portanto, nenhum ato a que serei submetido é diferente da rotina. Ficou claro para mim que o projeto de pesquisa não muda em nada o tratamento a que serei submetido e previsto para o meu caso e que o Departamento habitualmente pratica.

Fui esclarecido que minha participação no referido projeto é voluntária e que dele posso não participar segundo minha vontade e dele me retirar sem que exista qualquer tipo de prejuízo para o meu tratamento e seguimento nesse serviço, ou no Departamento de Dermatologia, ou nesse Hospital.

O trabalho será desenvolvido pela estudante de Pós-Graduação em Patologia **Amanda Manoel Della Coletta**, sob orientação da **Prof. Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio** do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB).

Fui esclarecido que qualquer dúvida que eu ou meus familiares diretos possam ter, posso procurar a pesquisadora responsável, no Depto. de Patologia desta Faculdade, no telefone e endereço relacionados abaixo.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Portanto, dou meu consentimento livre e esclarecido.

Este termo será elaborado em duas vias, sendo uma para arquivo do pesquisador e outra para ser entregue ao participante da pesquisa.

Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3811-6143.

Botucatu, de de

Assinatura do Voluntário

Amanda Manoel Della Coletta

Aluna de Mestrado PG em Patologia

Depto. de Patologia – FMB – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio

Orientadora

Depto. de Patologia – FMB – UNESP – Botucatu

Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio

Depto. de Patologia – FMB - UNESP - Botucatu-SP

Telefone: 14-38116238 e-mail: ladiasmelicio@fmb.unesp.br



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone: (14) 3880-1608 / 3880-1609
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
kleber@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: smolina@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 08 de outubro de 2014

Of. 138/2014-CEP

Ilustríssima Senhora
Profª Drª Luciane Alarção Dias Melicio
Departamento de Patologia da Faculdade de
Medicina de Botucatu - UNESP.

Prezada Dra Luciane,


Com referência ao Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 3906/2011) "Identificação de NETs (neutrophil extracellular traps) em lesões tegumentares de pacientes com paracoccidiodomicose", aprovado por este CEP em 04/07/2011, informo que AUTORIZEI, em 03/10/2014 a mudança de nomenclatura do estudo, bem como sua autoria, na seguinte conformidade:

Novo Título: "Identificação de Neutrophil Extracellular Traps em lesões tegumentares de pacientes com paracoccidiodomicose e análise da formação de NETs in vitro por neutrófilos humanos desafiados com Paracoccidiodoides brasiliensis".

Autor: Amanda Manoel Della Coletta - **Objetivo:** Dissertação de Mestrado.

Orientador: Profª Drª Luciane Alarção Dias Melicio.

Atenciosamente,


Profª Drª Silvana Andréa Molina Lima
Coordenadora do CEP-FMB-UNESP.